



# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

**Fitonanopartículas de plantas nativas del Valle de  
Mexicali: Caracterización y evaluación de sus  
propiedades antimicrobianas e insecticidas.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA  
**EUGENIA DEL CARMEN LEÓN JIMÉNEZ**

Director  
**DR. DANIEL GONZÁLEZ MENDOZA**  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Asesor  
**DR. ÍVÁN DE LA CRUZ CHACÓN**  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Febrero de 2020



## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todas aquellas personas que brindaron su tiempo, conocimientos y apoyo para la elaboración de este trabajo de investigación, y que impulsaron su realización; a mi director de tesis el Dr. Daniel González Mendoza, investigador del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC (ICA-UABC), por invitarme a trabajar con él y enseñarme la importancia de la biotecnología aplicada a un campo novedoso y casi inexplorado como la nanotecnología; al Dr. Iván de la Cruz Chacón investigador del Instituto de Ciencia Biológicas de la UNICACH (ICBIOL-UNICACH), por su acompañamiento y asesoramiento durante la redacción de la tesis, que me ayudó siempre a mantener el enfoque biológico del trabajo; y especialmente al Dr. Benjamín Valdéz Salas, del Instituto de Ingeniería de la UABC, por el apoyo recibido en la caracterización de las fitonanopartículas como parte del 21<sup>a</sup>. Convocatoria Interna de Investigación de la Universidad Autónoma de Baja California, y al Dr. Federico Gutiérrez Miceli, investigador del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG), quien me invitó a conocer y trabajar con el Dr. Daniel.

A la secretaría de Fomento Agropecuario (SEDAGRO) y a la Universidad Autónoma de Baja California, por el financiamiento del proyecto “Evaluación de insecticidas convencionales, biorracionales y microorganismos entomopatógenos para el control del piojo harinoso en la producción de algodón en el Valle de Mexicali”.

A Dios que, aunque muchas veces he perdido mi camino y objetivo, siempre está conmigo a cada paso dándome la dirección correcta, y me ha permitido ir a lugares que jamás pensé llegar; a mis papás por su paciencia, apoyo y amor incondicional, que me han impulsado a lograr mis objetivos, a mi hermano que me ha acompañado en mis locuras, y aunque yo debería ser un ejemplo para él, ha sido al contrario, siempre es has sido tu un ejemplo y motivación, gracias por ser un regalo para mi vida y estar ahí.

## **DEDICATORIA**

Dedicada a Dios, mis papás, hermano, amigos, familiares y todas las personas que han estado a mi lado como un apoyo y motivación, quienes nunca han perdido la fe en mí y siempre han apoyado mis locuras; para aquellas personas que se encuentran siempre en mi corazón y aunque ya no estén físicamente a mi lado, siempre estarán conmigo.

# INDICE GENERAL

I. RESUMEN .....	X
II. INTRODUCCIÓN .....	1
III. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 Nanotecnología .....	4
3.2 Aplicaciones de la nanotecnología en Biología .....	5
3.3 Nanopartículas .....	6
3.4 Métodos para la síntesis y caracterización de nanopartículas.....	7
3.4.1 Caracterización morfológica.....	8
3.4.2 Caracterización estructural.....	8
3.4.3 Caracterización del tamaño de partículas y de área de superficie. ....	9
3.4.4 Caracterización óptica .....	9
3.5 Nanopartículas metálicas .....	9
3.6 Síntesis verde de nanopartículas. ....	10
3.6.1 Características de mezquite ( <i>Prosopis juliflora</i> ). ....	10
3.6.1.1 Clasificación taxonómica. ....	10
3.6.1.2 Características del género <i>Prosopis</i> . ....	11
3.6.1.3 Características de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw) DC. 1825 .....	11
3.6.1.4 Distribución y hábitat .....	12
3.6.1.5 Uso de <i>Prosopis juliflora</i> como plaguicida. ....	12
3.6.2 Características de cachanilla ( <i>Pluchea sericea</i> (Nutt). Caville). ....	13
3.6.2.1 Clasificación taxonómica. ....	13
3.6.2.2 Síntesis de género <i>Pluchea</i> Cass.....	13
3.6.2.3 Características de <i>Pluchea sericea</i> (Nutt). ....	14
3.6.2.4 Distribución y Hábitat.....	14
3.6.2.5 Uso de la cachanilla como plaguicida.....	15
3.7 Problemas del uso de plaguicidas químicos en el medio ambiente.....	15
3.7.1 Resistencia de <i>Phenacoccus solenopsis</i> Tinsley a los insecticidas. ....	16
3.7.1.1 Clasificación Taxonómica <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	16
3.7.1.2 Características generales del género <i>Phenacoccus</i> .....	17
3.7.1.3 Características generales de <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	18
3.7.1.4 Distribución y características del hábitat.....	19
3.7.1.5 Reportes de resistencia a los insecticidas de <i>P. solenopsis</i> . ....	20
3.7.2 Resistencia a los antibióticos de las Bacterias. ....	21
3.7.2.1 Resistencia a antibióticos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	22
3.7.2.2 Resistencia a antibióticos de <i>Escherichia coli</i> .....	25
3.7.2.3 Patogenicidad de <i>Bacillus cereus</i> . ....	29

<b>IV. ANTECEDENTES .....</b>	<b>32</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	34
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	34
<b>VI. HIPÓTESIS .....</b>	<b>35</b>
<b>VII. ZONA DE ESTUDIO.....</b>	<b>36</b>
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
8.1 Recolecta del material .....	37
8.1.1 Material vegetal .....	37
8.1.2 Recolecta <i>Phanacoccus solenopsis</i> Tinsley.....	38
8.2 Síntesis verde de fitonanopartículas.....	38
8.2.1 Obtención del extracto acuoso .....	38
8.2.2 Preparación de soluciones metálicas .....	39
8.2.3 Síntesis de fitonanopartículas .....	39
8.3 Caracterización fisicoquímica de las fitonanopartículas. ....	40
8.4 Evaluación insecticida de las fitonanopartículas.....	41
8.4.1 Ensayo biológico de <i>Phanacoccus solenopsis</i> Tinsley.....	41
8.4.2 Cálculo de la severidad en <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	42
8.4.3 Cuantificación de la Viabilidad celular en <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	43
8.4.4 Cálculo de Mortalidad de <i>P. solenopsis</i> Tinsley. ....	45
8.4.6 Análisis estadístico.....	46
8.5 Evaluación antimicrobiana de las fitonanopartículas. ....	46
8.5.1 Establecimiento de los tratamientos .....	46
8.5.2 Medios para reactivación de la Cepas.....	47
8.5.3 Preparación medio Agar Nutritivo y elaboración antibiogramas .....	47
8.5.4 Prueba de Inhibición bacteriana de las fitonanopartículas .....	48
8.5.5 Análisis estadístico.....	48
<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
9.1 Síntesis de fitonanopartículas.....	49
9.2 Caracterización de las fitonanopartículas.....	49
9.2.1 Caracterización óptica con espectrometría UV-VIS.....	49
9.2.2 Caracterización morfológica con microscopia de barrido (SEM).....	51
9.2.3 Caracterización estructural con microscopía de barrido con análisis de energía dispersa de rayos X (SEM-EDX) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). ....	52

9.2.4 Caracterización de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS).....	55
9.3 Evaluación insecticida de las fitonanopartículas.....	57
9.3.1 Severidad en <i>Phenacoccus solenopsis</i> Tinsley.....	57
9.3.1.1 Análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía).....	58
9.3.2 Viabilidad celular en <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	59
9.3.3 Mortalidad de <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	61
9.3.3.1 Análisis de varianza de la mortalidad de los tratamientos.....	63
9.3.4 Análisis estadístico para determinar la relación de la mortalidad con la severidad y el tiempo.....	64
9.3.5 Cuantificación de cobre en <i>Phenacoccus solenopsis</i> Tinsley.....	64
9.4 Evaluación antimicrobiana de las fitonanopartículas.....	65
9.4.1 Inhibición bacteriana de las fitonanopartículas.....	65
9.4.2 Análisis estadístico.....	65
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
<b>XI. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>XII. REFERENCIAS DOCUMENTALES .....</b>	<b>76</b>
<b>XIII. ANEXOS.....</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios realizados sobre la resistencia a insecticidas de <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	21
Cuadro 2. Estudios de resistencia a antibióticos de <i>K. pneumoniae</i> .....	25
Cuadro 3. Estudios de resistencia a antibióticos de <i>Escherichia coli</i> .....	28
Cuadro 4. Estudios de evaluación a la resistencia de antibióticos de <i>Bacillus cereus</i> .....	31
Cuadro 5. Valores de severidad (SE) de acuerdo al número de patas del insecto que no se movían.....	42
Cuadro 6. Comparación múltiple de los tratamientos contra el grupo control usando el método de Dunnett.....	59
Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de Abbott cada 24 horas para <i>P. solenopsis</i> Tinsley de cada tratamiento y el control.....	62
Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad de Abbott corregida de <i>P. solenopsis</i> Tinsley para cada uno de los tratamientos.....	62
Cuadro 8. Comparación múltiple de los tratamientos contra el grupo control con el método de Dunnett.....	63
Cuadro 10. Prueba de Tukey para mortalidad, severidad y tiempo, de todos los procedimientos de comparación múltiple por parejas.....	64
Cuadro 11. Tablas de contingencia para cada cepa bacteriana evaluada con los tratamientos, para prueba de $X^2$ .....	66
Cuadro 12. Resultados del programa SigmaPlot12® para el método de Dunnett de comparación múltiple de los tratamientos contra los controles para <i>E. coli</i> .....	66
Cuadro 13. Resultados de la prueba de comparación múltiple con el método de Dunnett para las fitonanopartículas de mezquite y cachanilla contra los extractos acuosos para <i>K. pneumoniae</i> .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arbusto de mezquite (izquierda) y rama con hojas (derecha) ejemplar herbario ( Gallaber y Merlin, 2010; en línea, NYBG, 1992).....	11
Figura 2. Mapas de distribución de <i>Prosopis juliflora</i> (En línea Red Naturalista, 2011).....	12
Figura 3. Planta (izquierda), flores (esquina superior derecha) y hojas de <i>Pluchea sericea</i> (Nutt), (En línea Southwest Desert Flora, 2017).....	14
Figura 4. Mapa de distribución de <i>Pluchea sericea</i> (Nutt), (En línea Red Naturalista, 2018).....	15
Figura 5. Severidad del daño provocado por <i>P. solenopsis</i> en plantas de algodón del Valle de Mexicali (León, inédito, 2018).....	18
Figura 6. Adultos de <i>P. solenopsis</i> , izquierda hembras y a la derecha macho.....	19
Figura 7. Mapa de distribución de <i>Phenacoccus solenopsis</i> Tinsley (CABI, 2018)...	20
Figura 8. Recolecta de material vegetal y laboratorio de biotecnología, ICA, UABC (izquierda), recolecta <i>P. solenopsis</i> en parcela ejido Cuernavaca (derecha).....	36
Figura 9. Hojas secas y molidas de <i>P. juliflora</i> y <i>P. sericea</i> , con el molino para café marca KRUPS®. ....	37
Figura 10. Caja Petri con hembras de <i>P. solenopsis</i> recolectadas (izquierda), plantas de algodón con colonias del insecto (esquina superior derecha) y plantas sanas arrancadas de raíz (esquina inferior derecha).....	38
Figura 11. Extractos acuosos de mezquite y cachanilla sin centrifugar (esquina superior izquierda), extractos centrifugados (en medio y derecha). ....	39
Figura 12. Baño María durante la síntesis, y fitonanopartículas de mezquite y cachanilla. ....	40
Figura 13. Espectrofotómetro HACH DR-6000 (izquierda), pantalla del aparato donde se calibra el rango de lectura. ....	40
Figura 14. Monta de ensayo biológico. Placa Petri con papel secante (A), hojas de algodón sanas lavadas con agua destilada (B), hoja de algodón en placa Petri (C). 41	
Figura 15. Placa Petri con <i>P. solenopsis</i> (izquierda), evaluación insecticida Fitonanopartículas (centro), y cámara bioclimática BIOTRONETTE MARK III™(derecha). ....	42
Figura 16. Tinción vital; preparación de las alícuotas (A y B), alícuotas con azul de Evans (C). ....	43

Figura 17. Obtención del sobrenadante de las alícuotas (izquierda), y lectura del espectrofotómetro (derecha). .....	44
Figura 18. Alícuotas, digestión y lectura de las muestras en el espectrofotómetro, imagen (centro) de lectura en el espectro del extracto acuoso de mezquite ( <i>P. juliflora</i> ). .....	46
Figura 19. Absorción de las fitonanopartículas a evaluar en los discos de difusión Baeur-Kirby para cada tratamiento. ....	47
Figura 20. Evaluación de la inhibición bacteriana usando discos de difusión Baeur-Kirby en cepas bacterianas. ....	48
Figura 21. Diferencias entre el extracto acuoso de hojas de mezquite con las fitonanopartículas de cobre y zinc (A) y extracto acuoso cachanilla con las fitonanopartículas de mezquite cobre y zinc (B). ....	49
Figura 22. Comparación de curvas de absorción del extracto acuoso de mezquite (rojo) con las fitonanopartículas de zinc (azul) y cobre (negro). ....	50
Figura 23. Curvas de absorbancia de espectrometría UV-VIS de las fitonanopartículas de zinc (azul) y cobre (negro) con el extracto acuoso de cachanilla ( <i>P. sericea</i> Nutt.) (rojo). ....	50
Figura 24. Análisis SEM para determinar la forma de las fitonanopartículas, fitoNPs-Cu de mezquite (A), fitoNPs-Cu cachanilla (B), fitoNPs-Zn mezquite (C), y fitoNPs-Zn cachanilla (D). ....	51
Figura 25. Análisis de microscopía de barrido de electrones y difracción de rayos X (SEM-EDX) para fitoNPs-cobre de <i>Prosopis juliflora</i> Sw. (A) y <i>Pluchea sericea</i> Nutt (B). ....	52
Figura 26. Análisis SEM-EDX de fitonanopartículas de mezquite ( <i>P. juliflora</i> Sw.) con zinc (A) y fitonanopartículas de cachanilla ( <i>Pluchea sericea</i> Nutt.) con zinc (B). .....	53
Figura 27. Espectroscopia FTIR de extracto acuoso de <i>P. sericea</i> Nutt (B), fitonanopartículas de Cobre (C) y Zinc (A). ....	54
Figura 28. FTIR (espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier) múltiple de extracto acuoso y fitonanopartículas de <i>P. juliflora</i> Sw., de cobre y zinc. ....	54
Figura 29. Distribución de tamaño de partícula para las fitonanopartículas de cobre de <i>P. juliflora</i> Sw., (A) y <i>P. sericea</i> Nutt (B) usando DLS. ....	55
Figura 30. Distribución de tamaño de partículas usando DLS (Dispersión dinámica de luz), de las fitonanopartículas de <i>P. juliflora</i> Sw de zinc (A), y fitonanopartículas de <i>P. seicea</i> Nutt (B). ....	56

Figura 31. Porcentaje de severidad (SE) en horas y días de los tratamientos contra <i>P. solenopsis</i> .....	57
Figura 32. Promedios de severidad del grupo control y los tratamientos evaluados en <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	58
Figura 33. En orden descendente se muestra la viabilidad celular de <i>P. solenopsis</i> Tinsley a los tratamientos.....	60
Figura 34. Alícuotas de cada tratamiento evaluado de <i>P. solenopsis</i> teñidos con azul de Evans.....	60
Figura 35. Muestras de <i>P. solenopsis</i> de los distintos tratamientos evaluados al finalizar el ensayo; control (A), fitoNPs-Zn cachanilla (B), fitoNPs-Cu mezquite (C), fitoNPs-Cu cachanilla (D). .....	61
Figura 36. Promedio de la mortalidad corregida de los tratamientos evaluados contra <i>P. solenopsis</i> Tinsley.....	63
Figura 37. Concentración de cobre en <i>P. solenopsis</i> del tratamiento control (A) y las fitoNPs-Cu de Mezquite (B) y Cachanilla(C).....	65
Figura 38. Promedios de diámetro de halo inhibitorio de cada tratamiento evaluado para <i>E. coli</i> .....	67
Figura 39. Promedios de diámetro de halo inhibitorio en cada tratamiento evaluado para <i>K. pneumoniae</i> .....	68
Figura 40. Promedios de diámetro de halo inhibitorio en cada tratamiento evaluado para <i>B. cereus</i> .....	69

## RESUMEN

La resistencia a plaguicidas que presentan bacterias que causan enfermedades graves para el humano, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, e insectos como *Phenacoccus solenopsis* Tinsley, el cual es una especie invasiva en más de 200 especies de plantas; son problemas graves a nivel mundial, pues representan un reto a superar, como también la búsqueda de alternativas que no causen un efecto negativo en el ambiente o contaminen ecosistemas; por lo cual el estudio se enfocó a investigar el efecto plaguicida de las fitonanopartículas de cobre y zinc usando el método de síntesis verde extractos acuosos de hojas de mezquite (*Prosopis juliflora*) y cachanilla (*Pluchea sericea*), caracterizarlas y probar sus efectos contra los organismos antes mencionados. Los resultados mostraron que las fitoNPs-Zn (fitonanopartículas zinc) de mezquite y cachanilla tienen un tamaño promedio de 51.25 y 53.44 nm, y una forma elipsoidal y esférica respectivamente; y las fitoNPs-Cu de un tamaño de 33.8 (mezquite) y 68.10 (cachanilla), con forma esférica irregular y de flor respectivamente. Los resultados de la evaluación insecticida y antimicrobiana muestran que las fitoNPs-Zn tienen un efecto alto en la mortalidad de *P. solenopsis* y un efecto antimicrobiano, inhibiendo a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *B. cereus*; sin embargo, las fitoNPs-Cu mostraron una severidad y reducción de la viabilidad celular significativa contra *P. solenopsis*, y efecto antimicrobiano inhibiendo a *E. coli*.

**Palabras Clave:** Síntesis verde, fitonanopartículas, mezquite, cachanilla, y efecto insecticida y antimicrobiano.

## I. INTRODUCCIÓN

Existen en el mundo una amplia gama de plaguicidas químicos que ayudan al control de insectos, nematodos, hongos o bacterias considerados plagas, que causan grandes pérdidas económicas en cultivos y problemas serios de salud pública; uno de los problemas principales que tiene su utilización, es la resistencia que las plagas pueden adquirir a estos químicos, así como la contaminación al suelo, aire y agua (Bolívar *et al.*, 2009); el descubrimiento de los antibióticos en el siglo XX y la aparición de los insecticidas organofosforados en la década de 1940, ocasionaron un gran impacto sobre el avance en la medicina y agricultura, pero el mal uso de estos ha provocado la resistencia de los organismos considerados plagas (Silva *et al.*, 2012; Cabrera *et al.*, 2007). Un ejemplo es el insecto *Phenacoccus solenopsis* Tinsley, del orden Hemiptera que se ha reportado con alta resistencia a insecticidas como organofosforados y piretroides, entre otros; y es capaz de heredar a su descendencia los mecanismos de resistencia a insecticidas (Afzal y Shad, 2015; Saddiq *et al.*, 2014); este insecto llamado comúnmente piojo harinoso es considerado una plaga de importancia económica, pues es un polífago altamente invasivo, el cual se encuentra en más de 200 especies de plantas, con mayor presencia en especies de las familias Malvaceae, Solanaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Amaranthaceae y Curcubitaceae, provocando daño a la planta hospedera, por la extracción de su sabia, el amarillamiento o mal formación de las hojas, la pérdida de vigor, follaje y muerte (Arya *et al.*, 2018; CABI, 2018).

Algunas bacterias se consideran plagas y presentan resistencia a múltiples bactericidas (antibióticos, antisépticos y antimicrobianos), llegando a ser un problema de salud pública, la resistencia que presentan es ahora reconocida como una crisis en el mundo (Navon-Venezia, 2017), por la Organización Mundial de la Salud (OMS), pronunciándola como un gran reto a superar (Kidd *et al.*, 2017). La resistencia que presentan tiene origen intrínsecamente genético o es adquirida, expresándose fenotípicamente por mecanismos bioquímicos (Sussmann *et al.*, 2002), una de las consecuencias más importantes es que no se puede dar un tratamiento específico para el control o la erradicación de estos organismos, lo cual aumenta la morbilidad y mortalidad (García, 2003). Como es el caso de *Klebsiella pneumoniae*, un bacilo

Gram negativo, considerado un patógeno oportunista; la cual es catalogado con enfermedades de alto riesgo en humano (Kidd *et al.*, 2017); *Escherichia coli*, la cual tiene resistencia a varios antibióticos (Cabrera *et al.*, 2007), y *Bacillus cereus* un bacilo Gram positivo, que provoca envenenamiento del humano por consumir alimentos infectados por esta bacteria (Bottone, 2010), lo cual hace que estos organismos sean importantes para la salud pública (Pérez-Portoundo *et al.*, 2011).

La Nanotecnología es un campo interdisciplinario de investigación emergente, especialmente en Biología y Biotecnología (Raja *et al.*, 2012), que tiene como propósito la creación de nanomateriales o nanopartículas con características novedosas (Záyago y Foladori, 2009). Las nanopartículas debido a su tamaño tienen características químicas, físicas y ópticas de gran interés, descritas frecuentemente por Zanella (2012) como átomos artificiales; su producción o síntesis puede llevarse a cabo por distintos métodos dentro de dos clases *Bottom up* y *Top-Down*, la mayoría de ellos costosos, sin embargo, en la clase *Bottom up* donde se obtienen nanopartículas a partir de sustancias simples, se encuentra el método de síntesis biológica, basado en la química verde, que usa organismos como hongos, plantas o bacterias para la síntesis de nanopartículas, siendo las plantas las mejores candidatas y con las cuales se pueden obtener nanopartículas a gran escala; otra ventaja de utilizar plantas es que las nanopartículas obtenidas son más estables, variadas en forma y tamaño, con diversas propiedades, nombradas también fitonanopartículas (Khan *et al.*, 2017; Iravani, 2011); este método es amigable con el medio ambiente, de bajo costo de producción y mínimo tiempo requerido; las fitonanopartículas (fitoNPs) mayormente estudiadas son las de plata (Raja *et al.*, 2012) y su efecto antimicrobiano, pero muy poco sus propiedades insecticidas, también se pueden usar diversos metales, como el cobre o el zinc que son micronutrientes y tienen propiedades bactericidas e insecticidas (Hernández-Sierra *et al.*, 2008). Dos ejemplos de plantas que se han utilizado para la síntesis verde de fitonanopartículas usando plantas son el mezquite y la cachanilla.

El mezquite (*Prosopis juliflora* Sw.) es un árbol o arbusto espinoso perteneciente a la familia Fabaceae, esta planta es nativa de América; los metabolitos secundarios que posee, como alcaloides y sus derivados son usados de

manera medicinal pues tienen propiedades analgésicas y bactericidas, y sus saponinas tienen actividad insecticida y antimicrobiana (Gallaber y Merlin, 2010; Pasiecznik *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2013), Raghavendra *et al.* (2009), usaron alcaloides de Mezquite contra *Alternaria alternata* probando que los extractos tienen mayor efecto que los fungicidas comerciales, Raja *et al.* (2012), realizaron la síntesis de fitonanopartículas de extractos de mezquite y probaron su actividad antimicrobiana, teniendo resultados positivos. La cachanilla (*Pluchea sericea* Nutt), es una planta siempre verde que crece en suelos salinos y desérticos de Baja California, Sonora y Chihuahua, y parte del sur de E.U.A, y crece como arbusto aromático; Villaseñor y Villarreal, 2006); Hussain *et al.* (2013) menciona que los metabolitos de cachanilla tienen diversas propiedades biológicas como anticancerígeno, antihistamínico, antioxidante, antimicrobiano, larvicida y citotóxico, atribuyendo su acción antimicrobiana a los flavonoides y grupos fenólicos; Abdelmoteleb *et al.* (2018), realizaron síntesis verde de fitonanopartículas de esta planta donde probaron su efecto antimicrobiano con buenos resultados.

La resistencia a plaguicidas que presentan los insectos como *P. solenopsis* y las bacterias como *K. pneumoniae*, *E. coli* y *B. cereus*, así como el daño al medio ambiente que provoca el uso de sustancias químicas, hace necesaria la búsqueda de alternativas eficientes para el control de estos organismos. Una alternativa viable, novedosa y poco estudiada, es la síntesis verde usando extractos acuosos de mezquite y cachanilla como agentes reductores de metales como el cobre y zinc, con las que se podría obtener fitoNP-Cu y fitoNPs-Zn de ambas plantas, con posibles propiedades insecticidas y antimicrobianas, a las cuales no existe resistencia por parte de estos organismos.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Nanotecnología.

La Nanociencia y la Nanotecnología se presentan como un área nueva de investigación, donde convergen varias ramas del conocimiento lo que permite estudiar fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular (Mendoza y Rodríguez, 2007); y puede ser aplicada en las áreas de Física, Medicina, Biología, medio ambiente, Ingeniería, entre otras (Sánchez *et al.*, 2009). El prefijo nano (del griego nanno que significa enano); en la palabra Nanotecnología significa una millonésima ( $1 \times 10^{-9}$ ); la cual se refiere a las diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de una millonésima parte de metro, aunque el término es relativamente nuevo, las estructuras funcionales de dimensiones nanométricas han existido en la tierra desde el mismo origen de la vida (Poole y Owens, 2003).

La Nanotecnología es el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras manipulando el tamaño y forma, en escala nanométrica, que resulta en estructuras o sistemas con características novedosas o superiores (Záyago y Foladori, 2009); actualmente las aplicaciones de la nanotecnología se encuentran en las áreas de aplicación de fármacos, producción directa de hidrógeno, compuestos con nanotubos, implantes que favorezcan el crecimiento celular y nanopartículas con función de catalizadores, entre muchas otras; por lo que la nanotecnología promete soluciones vanguardistas y más eficientes para los problemas de la ciencia (Manrique, 2009).

La palabra Nanotecnología fue introducida dentro del mundo científico por primera vez gracias a Norio Taniguchi en 1974 durante una conferencia internacional de producción industrial realizada en Tokio (Tolochko, 2009). En los años 80 comenzó el auge de la Nanotecnología, gracias al desarrollo en la gama de microscopios de sonda de barrido, logrando imágenes a escala atómica. En 1991 Sumio Iijima descubrió los nanotubos de carbono usados como biosensores de excelentes propiedades mecánicas y eléctricas; hoy en día hay más de 3 mil productos derivados de la Nanotecnología, la mayoría de ellos son de uso industrial, pero las investigaciones más avanzadas se encuentran en el campo de la medicina y

la biología (Sánchez *et al.*, 2009). En la actualidad existen muchas investigaciones y desarrollo de materiales en la Nanotecnología.

## **2.2 Aplicaciones de la nanotecnología en Biología.**

La naturaleza explota de manera sostenible los métodos para la creación a nanoescala de materia inorgánica con una gran variedad de aplicaciones; bajo esta perspectiva existen avances recientes en la biofuncionalización de las nanopartículas con aplicaciones potenciales en catálisis y el almacenamiento de energía, hasta la plasmónica y la biosensibilidad (Briggs y Knecht, 2012).

En 1986 Erick Drexler publica su primer artículo titulado: “Ingeniería Molecular: Un enfoque al desarrollo de capacidades de manipulación molecular”; donde explica la idea de la manufacturación molecular, creando nanomáquinas con especificaciones atómicas equivalentes a las proteínas, que podrían ser más específicas y acelerar reacciones (Devon *et al.*, 2007). Las proteínas a través de sus interacciones con otras macromoléculas y compuestos inorgánicos controlan la estructura y función de todos los tejidos biológicos duros o blandos de un organismo. La biomimética molecular es un campo emergente, la cual es una tecnología híbrida que se desarrolla usando herramientas de la Biología Molecular y Nanotecnología; en la cual se crean a través de la Ingeniería Genética polipéptidos que se enlazan específicamente a compuestos orgánicos selectos para aplicaciones específicas (Sarıkaya *et al.* 2003).

La Biología Sintética es el rediseño de moléculas biológicas, estructuras y organismos, es una de las más poderosas tecnologías emergentes hoy en día; la modificación de estructuras biológicas ha empezado a perseguir una gran variedad de objetivos en la Nanotecnología; pero la Biología Sintética podría proveer de herramientas y entendimiento necesario para desarrollar nanobiotecnologías de una manera más sistemática y ampliar el alcance de lo que podría lograr (Ball, 2004).

Una tecnología híbrida es la Nanobiotecnología, como su nombre lo indica es la unificación de la Biotecnología y la Nanotecnología; significando el uso de esta disciplina en la creación de máquinas a nanoescala mediante la imitación o incorporación de sistemas biológicos a nivel molecular, o la construcción de nano herramientas para el estudio o cambio natural de las propiedades estructurales

átomo por átomo; la Nanobiotecnología puede tener la combinación de la microtecnología clásica con la Biología Molecular (May, 2005).

### **2.3 Nanopartículas.**

Las nanopartículas siempre han existido pues se producen de manera natural en el ambiente, ya sean por incendios forestales o por erupciones volcánicas (Gutiérrez-Praena, *et al.*, 2009); algunas civilizaciones antiguas ya utilizaban sus propiedades; la cultura egipcia empezó a usarlas desde hace más de 4000 años, usando métodos químicos para su síntesis; el pigmento azul egipcio fue el primer pigmento sintético creado usando  $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$  y  $\text{SiO}_2$  en el siglo III a. de C., también usaron nanopartículas de oro como coloides creyendo tenían propiedades de rejuvenecimiento y medicinales, otra civilización en usar la nanopartículas fue la China, con fines terapéuticos como también en colorantes inorgánicos y para la creación de porcelanas; la síntesis química de nanopartículas fue usada también por los Mesopotámicos que hicieron cristales usando metales; con lo cual se puede decir que con estas culturas se comenzó la era de las nanopartículas metálicas; el primer estudio sistemático sobre las nanopartículas lo realizó Faraday en 1857, donde presentó un estudio de la síntesis y propiedades coloidales del oro AuNPs (Gutiérrez, 2006).

Debido a sus propiedades físicas y químicas, las nanopartículas son con frecuencia descritas como átomos artificiales (Zanella, 2012). Las nanopartículas se pueden clasificar en tres criterios, el primero se basa de acuerdo a los materiales que se usan para su creación, los cuales son, materiales basados en carbón, compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos y compuestos bases, este último se compone de conjuntos de nanopartículas creando estructuras más complejas; el segundo criterio se basa en la dimensión, la cual depende del movimiento del electrón a lo largo de las dimensiones de las nanopartículas, que las clasifica de la siguiente forma: 0D atrapado en un espacio sin dimensiones, mientras que el 1D tiene electrones que se pueden mover a lo largo del eje X el cual es menos de 100 nm; igualmente 2D y 3D que tienen un movimiento del electrón a lo largo del eje X-Y y el eje X-Y-Z respectivamente. Y el último criterio basado en su origen, el cual puede ser incidental, que es producido como consecuencia de un proceso industrial como por

ejemplo humos de soldaduras o incendios forestales; las que son diseñadas y creadas por el humano con propiedades específicas para su aplicación; y las que se producen de manera natural, las cuales pueden encontrarse dentro de los organismos ya sean insectos, plantas, animales y el ser humano (Jeeranandam *et al.*, 2018).

#### **2.4 Métodos para la síntesis y caracterización de nanopartículas.**

Varios métodos son empleados para la síntesis de nanopartículas, en la cual manipulando las condiciones de síntesis se logra controlar el tamaño y forma de estas, y confiere los medios para adaptar las propiedades para una aplicación específica (Zanella, 2012). Estos métodos se dividen en dos clases.

a) Síntesis clase *Top-down* (de arriba hacia abajo): este método emplea un enfoque destructivo, comenzando por una larga molécula, la cual es descompuesta en pequeñas unidades y estas son convertidas en nanopartículas, como la molienda mecánica, grabado químico, ablación laser, explosión eléctrica y Sputtering (Khan *et al.*, 2017).

b) Síntesis clase *Bottom-up* (de abajo hacia arriba): este enfoque empleado en reversa o contrario al otro, usa sustancias relativamente simples para la formación de nanopartículas, esta clase también es llamada enfoque de construcción; un ejemplo serían las técnicas de sedimentación y de reducción, como es el método coloidal, reducción fotoquímica y radioquímica, irradiación con microondas, utilización de dendrimeros, síntesis solvotermal, método sol-gel y síntesis biológica (Zanella, 2012; Khan *et al.*, 2017).

Para la caracterización de las nanopartículas, diferentes técnicas se han utilizado para el análisis de varias propiedades fisicoquímicas, estas técnicas incluyen microscopía de energía dispersa de rayos-X (EDX), espectrometría de fotoelectrones de rayos X (XPS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopio electrónico de transmisión (TEM), entre muchas otras; los criterios que se usan para la caracterización de las nanopartículas son: la morfología, estructura, tamaño de partícula y área de superficie, y su óptica (Khan *et al.*, 2017).

#### **2.4.1 Caracterización morfológica.**

Esta caracterización es importante debido a que la forma influye en más de una de las propiedades de las nanopartículas, para hacerla se realizan análisis microscópicos como microscopía electrónica de barrido (SEM). La microscopía de electrónica de barrido proporciona datos sobre la morfología de las nanopartículas, pero también sobre su dispersión en matriz que las contenga; esta técnica emplea un haz de electrones que barre e interacciona con la muestra en una superficie determinada, lo cual permite detectar las señales eléctricas encontradas por los detectores mostrándolas como imágenes en un monitor (Bernardo, 2018).

#### **2.4.2 Caracterización estructural.**

Las características estructurales de las nanopartículas se encuentran en primer lugar a la hora de hacer la caracterización, ya que esta nos dice la naturaleza de la composición de los enlaces en los materiales y proporciona información diversa sobre los componentes generales de las nanopartículas, los estudios que ayudan a la determinación de las características se pueden realizar por microscopía electrónica de barrido con análisis de energía dispersa de rayos-X (SEM-EDX) y espectroscopía infrarroja de transformadas de Fourier (FTIR). La microscopía electrónica de barrido con análisis de energía dispersa de rayos-X nos permite determinar la posición, el tamaño, la forma y los elementos que se encuentran en la muestra (Nuspl *et al.* 2004), cuando los elementos son bombardeados con electrones, ellos liberan rayos X en frecuencias características de cada elemento, obteniendo así las partículas que componen a la muestra; este análisis es una técnica no destructiva (Hues y Lovejoy, 2008); la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es el resultado de la combinación de la microscopía infrarroja con la microscopía óptica; la imagen óptica generada permite delimitar un área de estudio y se usa a la radiación del infrarrojo medio para detectar los movimientos vibracionales en los enlaces de las moléculas presentes en muestras de origen biológico, los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado por los enlaces, conocidos como vibraciones de tensión o flexión (Barraza-Garza; 2013).

### **2.4.3 Caracterización del tamaño de partículas y área de superficie.**

Como su nombre indica esta caracterización permite conocer el tamaño de las nanopartículas que se obtuvieron, este análisis se puede realizar por el estudio de *Dynamic light scattering* (DLS); la cual utiliza el movimiento browniano de las partículas para medir su tamaño; este movimiento causa fluctuaciones en la intensidad total de dispersión de la luz que es relativa a la velocidad de las partículas. Debido a que las partículas de mayor tamaño se mueven más lentas que las de tamaño pequeño; las fluctuaciones en la intensidad rinden información sobre el tamaño de partícula; la velocidad de la dispersión es medida calculando el coeficiente de difusión, por el cual se obtiene el tamaño de las partículas (Khan *et al.*, 2017; Kissa, 1999).

### **2.4.4 Caracterización óptica.**

Las propiedades ópticas son importantes pues se pueden conocer los mecanismos de los procesos fotoquímicos; esta caracterización tiene como base la ley de Beer-Lambert y los principios básicos de la luz; la cual brinda información acerca de la absorción, reflectancia y fosforescencia de las nanopartículas; para el estudio de estas propiedades ópticas se utilizan técnicas como la espectrometría UV-VIS (Khan *et al.*, 2017). La espectrometría UV-VIS permite comparar la radiación absorbida o reflejada de una solución que contiene una cantidad determinada de soluto con otra que tiene una cantidad conocida del mismo soluto; la radiación electromagnética causada por el espectro UV-VIS en la muestra a analizar son las transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y moleculares, cuando la radiación incide en la muestra que estamos analizando, un átomo o conjunto de átomos absorben la radiación; conociendo a estos como cromóforos, los cuales serán distintos dentro de una misma molécula para cada técnica espectroscópica (Bernardo, 2018).

### **2.5 Nanopartículas metálicas.**

Hay numerosas metodologías para la síntesis de nanopartículas de metales, que son dependientes de requerimientos especiales, pues las propiedades de estas dependen de la forma o tamaño, del interés de su aplicación como actividad antimicrobiana o insecticida, incluso estas nanopartículas son utilizadas para la purificación del agua y como partículas esenciales para la vida; las nanopartículas

que más se han estudiado y usado son las Ag-NPs (nanopartículas de plata), como agentes antimicrobianos por las propiedades que tiene la plata (Raja *et al.*, 2012). Pero también se ha realizado la síntesis de otros metales como cobre, oro y zinc (Hernández-Sierra *et al.*, 2008); al tener propiedades sobre la actividad biológica, han sido estudiadas como agentes antimicrobianos (Usman *et al.*, 2013).

## **2.6 Síntesis verde de nanopartículas.**

Las investigaciones recientes se han enfocado en buscar y desarrollar métodos eficientes para la síntesis de nanopartículas usando la química verde; donde se pretende encontrar una técnica ecológica para la producción de nanopartículas bien caracterizadas. Esta es una síntesis de la clase *Bottom-up* de tipo biológico, que usa organismos (hongos, plantas o bacterias) para la obtención de nanopartículas; siendo las plantas las mejores candidatas debido a la acción de los metabolitos que contienen y con las cuales se puede realizar biosíntesis de nanopartículas a gran escala; otra de las ventajas es que las nanopartículas son más estables y la síntesis se lleva a cabo de forma más rápida en comparación con el uso de microorganismos, además de que son más variadas en forma y tamaño.

Existe mucho interés en investigar y conocer los mecanismos de captación de los iones metálicos y la bio-reducción, comprendiendo así los posibles mecanismos para la formación de nanopartículas usando plantas, conocidas también como fitonanopartículas (Iravani, 2011). Dos de los ejemplos de plantas que se han utilizado para la síntesis verde de fitonanopartículas son el mezquite (*Prosopis juliflora* Sw.) y cachanilla (*Pluchea sericea* (Nutt) Caville) donde se han obtenido fitonanopartículas de plata de estas dos plantas, para el control de hongos fitopatógenos como *Fusarium solani* y como antimicrobiano (Abdelmoteleb *et al.*, 2016a; Abdelmoteleb *et al.*, 2018b).

### **2.6.1 Características de mezquite (*Prosopis juliflora*).**

#### **3.6.1.1 Clasificación taxonómica.**

Reino: Plantae

Subfilo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae  
Subfamilia: Mimosideae  
Tribu: Mimoseae  
Género: *Prosopis*  
Especie: *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (1825).

### 3.6.1.2 Características del género *Prosopis*.

Son árboles o arbustos espinosos, de tamaño mediano de la familia fabaceae, con especies encontradas en África, Asia y América, en el cual se reconocen 44 especies (Gallaber y Merlin, 2010), que poseen con hojas bipinnadas, provistos generalmente de un par de espinas, de folíolos pequeños; las flores de cáliz acampanado, corola de cinco pétalos libres o levemente unidos (Rzedowski, 1988). Este género tiene gran importancia en la conservación arbórea y arbustiva de zonas áridas y semiáridas; creciendo en lugares con una lluvia anual de 250 a 1250 mm, teniendo un desarrollo óptimo a temperatura en un rango de 20°C a 30°C.

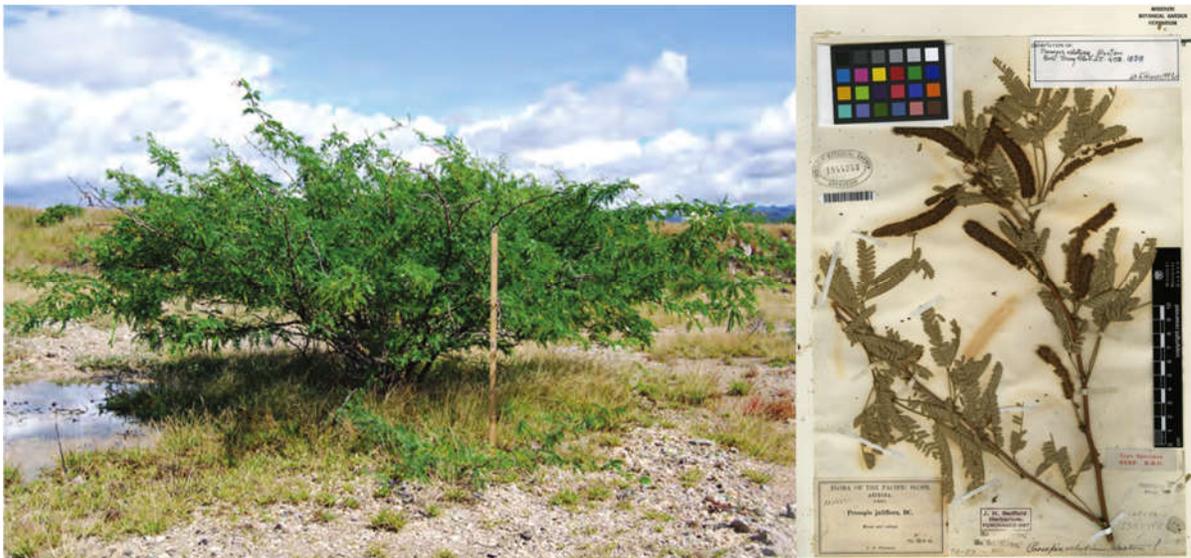


Figura 1. Arbusto de mezquite (izquierda) y rama con hojas (derecha) ejemplar herbario ( Gallaber y Merlin, 2010; en línea, NYBG, 1992).

### 3.6.1.3 Características de *Prosopis juliflora* (Sw) DC.

Esta especie crece como arbusto o un árbol de pequeño tamaño, raramente pasa de los 10 m de alto; se encuentra en zonas riparias con acceso a aguas subterráneas poco profundas, crece como matorral, su corteza es rugosa de color gris a café oscuro y de sabor amargo, el cual es muy duro con bastante resina; los tallos más

viejos, brotes cortos llamados braquiblastos que se desarrollan en los nodos, produciendo hojas pinnadas con espinas, de 1 a 3 pares de pinnas, de un tamaño de 3 a 11 cm; inflorescencias en forma de racimos de color amarillo, legumbre dehiscente de dos suturas (Gallaber y Merlin, 2010).

#### 3.6.1.4 Distribución y hábitat.

*Prosopis juliflora* puede sobrevivir en lugares donde durante el día las temperaturas se encuentren en los 50°C, y temperaturas del suelo de más de 70°C, esta especie se puede encontrar generalmente en zonas costeras, a lado de ríos o en valles secos, le gustan los suelos altamente salinos y alcalinos; el mezquite es nativo de América donde se encuentra mayormente concentrada; sin embargo se expandió a más continentes como África, Asia y Oceanía, por introducción producida por el hombre, por lo cual se considera una especie invasora (Pasiiecznik *et al.*, 2004; Gallaher y Merlin, 2010).

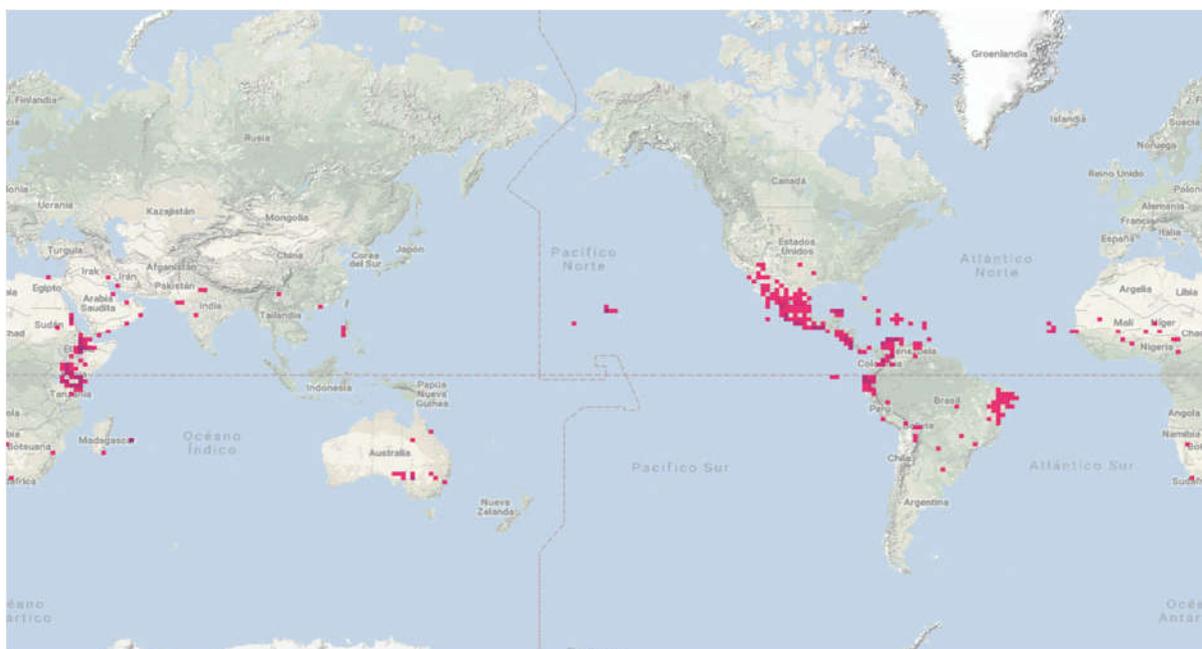


Figura 2. Mapas de distribución de *Prosopis juliflora* (En línea Red Naturalista, 2011)

#### 3.6.1.5 Uso de *Prosopis juliflora* como plaguicida.

Se sabe que los metabolitos secundarios del Mezquite como alcaloides y sus derivados son usados de manera medicinal pues tienen propiedades analgésicas y bactericidas; y sus saponinas tienen actividad insecticida y antimicrobianas (Ibrahim

*et al.*, 2013). Raghavendra *et al.*, (2009) usaron alcaloides de *P. juliflora* contra *Alternaria alternata* probando que los extractos tenían mejor efecto que los fungicidas comerciales.

## **2.6.2 Características de Cachanilla (*Pluchea sericea* (Nutt). Caville).**

### **3.6.2.1 Clasificación taxonómica.**

Reino: Plantae

Filo: Trachcophyta

Subfilo: Angiospermaee

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Inuleae

Género: *Pluchea*

Especie: *Pluchea sericea* (Nutt).

### **3.6.2.2 Síntesis de género *Pluchea* Cass.**

Este género, pertenece a la tribu Inuleae de la familia Asteraceae, comprende alrededor de 40 a 80 especies, la mayoría se encuentra distribuida en el continente americano, pero también se puede encontrar en el continente Africano, Asiático y Oceánico. El género registra nueve especies en México, donde tiene una amplia distribución, ya que se ha encontrado en 30 estados; los estados de Oaxaca y Veracruz contienen el mayor número de especies (Villaseñor y Villarreal, 2006).



Figura 3. Planta (izquierda), flores (esquina superior derecha) y hojas de *Pluchea sericea* (Nutt)), (En línea Southwest Desert Flora, 2017).

### 3.6.2.3 Características de *Pluchea sericea* (Nutt).

La Cachanilla (*P. sericea*) como es comúnmente conocida, es una planta siempre verde que crece en los suelos salinos y desérticos de Baja California, Sonora y Chihuahua y parte del sur de E.U.A; esta planta crece como arbusto aromático y alcanza una altura de 50 hasta 120 cm, tallos densamente subesentes, los tricomas no glandulares, seríceos; con hojas sésiles, lineares o lanceoladas, de 1 a 6 cm de largo y 2-7 mm de ancho, base truncada, márgenes enteros, ápice agudo o acuminado; flores con una corola de 5-6 mm de color rosado a púrpura; (Villaseñor y Villarreal, 2006; Ail-Catzim *et al.*, 2015).

### 3.6.2.4 Distribución y hábitat.

Habita en dunas costeras, matorrales xerófilos, vegetaciones halófilas o riparia, en suelos inundables o como parte de la vegetación acuática, se sabe que su floración es de marzo a diciembre (Villaseñor y Villarreal, 2006).

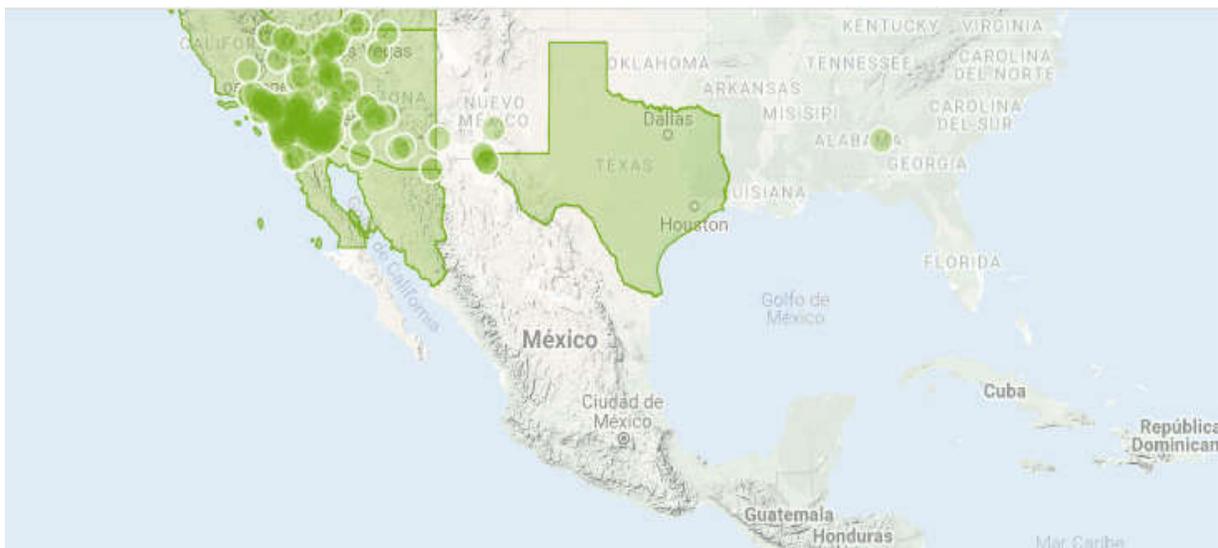


Figura 4. Mapa de distribución de *Pluchea sericea* (Nutt.), (en línea Red Naturalista, 2018).

### 3.6.2.5 Uso de la Cachanilla como plaguicida.

Ail-Catzim *et al.*, (2015), identificaron los metabolitos secundarios de *P. sericea*, evaluando su capacidad insecticida y repelente contra *Bemisia tabaci* (Genn.), Hussain *et al.*, (2013), menciona que los compuestos aislados de la cachanilla tienen diversas propiedades biológicas como anticancerígeno, antihistamínico, antioxidante, antimicrobiano, larvicida y citotóxico; contribuyendo su acción antimicrobiana a los flavonoides y grupos fenólicos; Abdelmoteleb y colaboradores (2016) realizaron síntesis verde de fitonanopartículas las cuales mostraron su efecto antimicrobiano.

### 2.7 Problemas del uso de plaguicidas químicos en el medio ambiente.

Con la Revolución Verde que se dio entre los años 60 y 80, se tuvo como objetivo aumentar la producción la productividad agrícola para la producción de alimentos; para lo cual fue necesario el desarrollo y uso de fertilizantes y plaguicidas; como parte de esta estrategia la industria química lanzó productos como fármacos para el control de enfermedades y agroquímicos usados para combatir plagas y hierbas nocivas para los cultivos; pero el uso continuo de estos químicos ha provocado el deterioro de los ecosistemas, limitaciones para el control de plagas, acumulación en los alimentos y resistencia de las plagas a estos químicos. Los plaguicidas consisten en: bactericidas, fungicidas y herbicidas. El uso de insecticidas provoca la pérdida de insectos polinizadores y depredadores de insectos plaga, así como su uso continuo crea resistencia en las plagas, las cuales aumentan año con año (Massieu, 1991).

Los plaguicidas se pueden definir como toda sustancia o mezcla de sustancias químicas, destinadas a prevenir, destruir y controlar una plaga; su uso ha beneficiado el rendimiento de los cultivos y el control de enfermedades transmitidas por vectores, pero representan un gran riesgo para el medio ambiente (González *et al.*, 2010). El uso de plaguicidas no solo ocasiona daño al ambiente o a los ecosistemas, sino también al ser humano pues le ocasiona daños a la salud por la alta toxicidad de las sustancias, y por si fuera poco algunas sustancias pueden permanecer en el ambiente aun después de su aplicación (Arellano y Rendón, 2016).

En México no hay datos precisos sobre la cantidad de plaguicidas que se consumen, pero los estados en los que se concentra su uso son Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca, donde se estima se aplica el 80% de plaguicidas en el país (González *et al.*, 2010).

### **2.7.1 Resistencia de *Phenacoccus solenopsis* Tinsley a los insecticidas.**

Los insectos se encuentran bajo diferentes factores de estrés causado por el ambiente, y en otros casos por el uso de insecticidas; por lo tanto, los insectos usan mecanismos fisiológicos y genéticos para resistir la toxicidad de los insecticidas químicos, en muchas ocasiones la resistencia que presentan está asociada a la sobre expresión de enzimas de desintoxicación o inducción de mutaciones específicas (Kliot y Ghanim, 2012). Uno de los insectos de importancia económica en todo el mundo que causa grandes pérdidas económicas en los cultivos es *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Ibrahim *et al.*, 2015).

### **3.7.1.1 Clasificación Taxonómica *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (CABI, 2018).**

Dominio: Eucariota

Reino: Metazoa

Filo: Arthropoda

Subfilo: Uniramia

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Super familia: Coccoidea

Familia: Pseudococcidae

Género: *Phenacoccus*

Especie: *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley).

### **3.7.1.2 Características generales del género *Phenacoccus*.**

El piojo harinoso (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) es un insecto de cuerpo suave perteneciente a la familia Pseudococcidae del orden Hemiptera; el género *Phenacoccus* comprende alrededor de 5000 especies alrededor del mundo (Arif *et al.*, 2009); el género *Phenacoccus* se identifica basado en las hembras adultas, siguiendo características como las antenas, cada una con 9 segmentos, patas bien desarrolladas, (tarsales) usualmente con un dentículo bien desarrollado; poros translúcidos ausente de la coxa posterior, pero algunas veces presente en femúr y tibia posterior; cerarii (estructuras de setas y poros triloculares) numerados de 1 a 18 pares, cada uno con una seta lanceolada y poros triloculares, a menudo en áreas de prostrucción membranosa; setas dorsales usualmente cortas y lanceoladas; algunas veces con poros triloculares similares a fosos setales; círculo usualmente entre los segmentos abdominales III Y IV; poroso de discos multiloculares presentes en hileras ventrales y algunas veces dorsales; poros quinqueloculares (con cinco lóculos o compartimientos) generalmente presentes en dorso y ventralmente, los ductos dorsales son frecuentemente más grandes que los ductos ventrales, pero algunas veces ambos son iguales; ductos del cerco oral ausentes; ojos sin poros discoidales asociado (Hodgson *et al.*, 2008).

### 3.7.1.3 Características generales de *Phenacoccus solenopsis* Tinsley.

El Piojo harinoso (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) es un insecto de importancia económica, el cual invade a más de 200 especies de plantas diferentes (Azfal y Shad, 2015; Arya *et al.*, 2018), considerándolo una plaga seria, con mayor presencia en especies de las familias Malvaceae, Solanaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Amaranthaceae y Curcubitaceae; el daño que provoca a la planta es debido a la extracción de la sabia de las plantas, provocando el amarillamiento o mal formación de las hojas, causando la pérdida de vigor, follaje y muerte; también al alimentarse del floema afecta el crecimiento, lo cual induce a que las flores y frutos sean de menor tamaño al que normalmente produce la planta hospedera (CABI, 2018).



Figura 5. Severidad del daño provocado por *P. solenopsis* en plantas de algodón del Valle de Mexicali (León, inédito, 2018).

*P. solenopsis* es un insecto que se reproduce de manera ovovivípara, con un periodo corto de incubación; existe dimorfismo sexual entre hembras y machos, habiendo diferencias morfológicas, las cuales se pueden distinguir desde el tercer estadio en adelante. Las hembras tienen tres estadios antes de convertirse en adultas; por otro lado, los machos inmaduros se reconocen por la construcción de un

capullo filamentososo sedoso después de la segunda muda y sufren dos mudas más dentro del capullo con estadios pre-pupa y pupa, para después emerger como adultos alados. Los machos adultos tienen vida corta y no se alimentan; mientras que las hembras tienen un tiempo de vida relativamente mayor, dependiendo de su estatus de reproducción y la temperatura (Waqas *et al.*, 2019); debido a que este insecto está recubierto de una cera hidrofóbica, son de tamaño pequeño, se alimentan de todas las partes de las plantas y se reproducen de manera rápida, adquieren la capacidad de dispersarse en grandes áreas (CABI, 2018).



Figura 6. Adultos de *P. solenopsis*, izquierda hembras y a la derecha macho.

#### **3.7.1.4 Distribución y características del hábitat.**

El piojo harinoso se encuentra distribuido en los trópicos y subtrópicos en todo el mundo (Fand y Suroshe, 2015), es nativo de E.U.A teniendo como origen los estados de Arizona, California, Colorado y Nuevo México; al ser un insecto polífago invadiendo una gran variedad de especies de plantas, existe un gran rango de hábitats en los cuales sobrevive, desde las áreas áridas y secas a regiones tropicales, resistiendo temperaturas altas por arriba de los 40°C; encontrándose presente en los cinco continentes. Sin embargo, en áreas lluviosas o de humedad alta hay un efecto negativo sobre las poblaciones de estos insectos (CABI 2018).



Figura 7. Mapa de distribución de *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (CABI, 2018).

### 3.7.1.5 Reportes de resistencia a los insecticidas de *P. solenopsis*.

Una plaga agronómica importante es *Phenacoccus solenopsis* Tinsley conocido comúnmente como el piojo harinoso, el cual se ha reportado presenta resistencia a insecticidas y ataca e invade cultivos de importancia económica (Fand y Suroshe, 2015) en el cuadro 1, se encuentran los estudios sobre la resistencia del insecto.

Cuadro 1. Estudios realizados sobre la resistencia a insecticidas de *P. solenopsis* Tinsley.

Autores	Investigación	Resistencia a insecticidas
Saddiq <i>et al.</i> , (2014)	Resistencia de <i>P. solenopsis</i> a organofosforados y piretroides.	Organofosforados y Piretroides.
Afzal y Shad (2015)	Herencia y mecanismos de resistencia a Benzoato de emamectina en <i>P. solenopsis</i> .	Benzoato de emamectina.
Afzal <i>et al.</i> (2015)	Resistencia genética y mecanismos preliminares a Clorpirifós en <i>P. solenopsis</i> .	Organofosforado
Saddiq <i>et al.</i> (2015)	Monitoreo de resistencia de <i>P. solenopsis</i> a nuevos insecticidas químicos en Punjab, Pakistán.	Neonicotinoides Emamectina Oxadiacina

### 2.7.2 Resistencia a los antibióticos de las bacterias.

Con el descubrimiento de los antibióticos, las bacterias como todos los seres vivos muestran mecanismos de defensa, los cuales les permiten sobrevivir a diversas presiones ambientales; una de estas es la resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias, la cual se manifiesta de manera natural gracias a la genética y evolución bacteriana (Cabrera, 2007). Después de más de setenta años de usar antibióticos para el control de enfermedades infecciosas, la resistencia que presentan las bacterias a estos es ahora reconocida como una crisis en la medicina a nivel mundial (Navon-Venezia, 2017). Se ha definido la resistencia como: una cepa resistente que es capaz de sobrevivir y multiplicarse en concentraciones de antibióticos mayores a las dosis normales para su control (García, 2003). La Organización Mundial de la Salud pronuncia que un gran reto a nivel mundial es el control de las cepas bacterianas resistentes a los antibióticos o bactericidas (Kidd *et al.*, 2017).

La resistencia que presentan las cepas bacterianas tiene origen intrínsecamente genético o es adquirida, expresándose fenotípicamente por mecanismos bioquímicos; por lo cual la resistencia se puede analizar desde el ambiente biológico y el bioquímico. En el biológico la resistencia depende de que los genes de resistencia aparezcan y se conserven, en el cual ocurre la modificación del genoma, estos cambios pueden ser clasificados en micro-evolutivos, los cuales son resultado de mutaciones únicas que suceden en nucleótidos pareados, y los cambios macro-evolutivos que afectan segmentos del ADN. Y desde el punto de vista bioquímico existen tres mecanismos básicos por los cuales la bacteria puede hacerse resistente a un antibiótico, los cuales son: la inactivación del antibiótico, la alteración del sitio blanco del antibiótico y las barreras de permeabilidad, los cuales pueden actuar al mismo tiempo (Sussmann *et al.*, 2002). Una de las consecuencias más importantes de la resistencia bacteriana es que no haya efecto antimicrobiano o bactericida en las cepas a tratar y que en consecuencia haya un aumento en la morbilidad y mortalidad (García, 2003).

Una de las cepas bacterianas que presentan altos índices de resistencia a antimicrobianos, lo cual limita las opciones terapéuticas para tratar las infecciones causadas por este organismo es *Klebsiella pneumoniae*, la cual es catalogada con alto riesgo de enfermedades por el tipo de infecciones que causa en el humano (Kidd *et al.*, 2017). Otro ejemplo es *Escherichia coli*, que a finales de los años cincuenta y comienzo de los sesenta se descubrió tenía resistencia a varios antibióticos (Cabrera *et al.*, 2007). Y finalmente *Bacillus cereus* es un bacilo Gram positivo que produce toxinas como hemolisinas, fosfolipasas y tres enterotoxinas que provocan el envenenamiento del ser humano por consumir alimentos infectados por *B. cereus*, la cual se ha visto que presenta resistencia a los bactericidas y antibióticos, provocando no se pueda emplear un tratamiento adecuado contra esta bacteria (Bottone, 2010).

### **3.7.2.1 Resistencia a antibióticos de *Klebsiella pneumoniae*.**

#### **3.7.2.1.1 Clasificación taxonómica**

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Género: *Klebsiella*

Especie: *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan, 1887).

### **3.7.2.1.2 Características del género *Klebsiella*.**

La clasificación de especies del género *Klebsiella* se hacía históricamente, basada en su origen o su capacidad patogénica, posteriormente se propuso utilizar características como el tipo de sustrato que utilizan y la actividad enzimática, creando una gran confusión que prevalece en la nomenclatura de este género; este género fue nombrado en honor del microbiólogo alemán Edwin Klebs propuesto por Trevisan en 1885, el cual también describió a la especie *Klebsiella pneumoniae* en 1887; el género es bien conocido por ser enterobacterias, las cuales llevan a cabo la fijación del nitrógeno, en el cual es producido amonio a partir de dinitrógeno gaseoso; las especies pertenecientes al género *Klebsiella* se encuentran ampliamente distribuidos en el agua, suelo, plantas y aguas residuales, en las plantas se encuentran las especies del género asociadas de manera natural sin causar ninguna enfermedad, algunas se han aislado de plantas de arroz y otras plantas, las especies de este género se consideran patógenos oportunistas, que pueden causar enfermedades en los humanos, su contacto puede ocurrir de diversas maneras, provocando daños a la salud pública ya que causa infecciones en vías urinarias, septicemia y neumonía, originando morbilidad y mortalidad severa en pacientes hospitalizados (Martínez *et al.*, 2004). Este género es fácilmente dividido en serotipos de diferentes antígenos encapsulados, los cuales comprenden organismos no motiles y Gram negativos (Cowan *et al.*, 1960).

### **3.7.2.1.3 Características de la especie *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan, 1887).**

*Klebsiella pneumoniae* ha sido un organismo utilizado como modelo en Microbiología, para el estudio de la manera en cómo lleva a cabo la fijación de nitrógeno; fue aislada de los pulmones de pacientes que murieron de neumonía en 1882 por Carl Friedlander, y fue descrita en 1887 por Trevisan; es un bacilo Gram negativo de los más comunes que se encuentran de manera natural en el ambiente,

es anaerobio facultativo, no motil, fermentador de lactosa, con forma barra, que se encapsula formando una capa de polisacárido presente fuera de la pared celular de la bacteria (Martínez *et al.*, 2004; Cowan *et al.*, 1960; Bengoechea y Pessoa, 2019; Ko *et al.*, 2002).

Es considerada como un patógeno oportunista que coloniza las membranas mucosas sin causar daño, sin embargo, de las mucosas, la bacteria puede diseminarse a otros tejidos causando infecciones como neumonía, sepsis e infecciones en la sangre, artritis en humanos, mastitis en bovinos, rinitis crónica atrófica e inclusive diarreas hemorrágicas que afectando a neonatos, individuos mayores e inmunocomprometidos; la cual puede tener una alta morbilidad y mortalidad en los individuos que la adquieren, pues presenta resistencia al múltiples antibióticos (Martínez *et al.*, 2004; Bengoechea y Pessoa, 2019).

#### **3.7.2.1.4 Resistencia a los antibióticos de *K. pneumoniae*.**

Al ser una bacteria Gram negativa, presenta una resistencia a los antisépticos y bactericidas; pues la membrana externa actúa como una barrera que limita la entrada a diferentes antibacterianos, las moléculas hidrofóbicas se difunde a través de la bicapa de la membrana al contrario de las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular que pasan fácilmente a través de las porinas (Cabrera *et al.*, 2007). Esta bacteria es causante de importantes infecciones en el mundo, resistente a múltiples antibióticos, la cual presenta resistencia del tipo biológico ya que activa genes para resistir a los antibióticos utilizados para su control (Kidd *et al.*, 2017). A continuación, se muestra en el cuadro 2 los antibióticos a los que *Klebsiella pneumoniae* es resistente.

Cuadro 2. Estudios de resistencia a antibióticos de *K. pneumoniae*.

AUTORES	ESTUDIO	ANTIBIÓTICOS
Chen <i>et al.</i> (2011)	Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection and Classification of <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase Gen (bla <sub>KPC</sub> ) Variants.	Carbapenemicos (β-lactámicos)
Cheik <i>et al.</i> (2017)	DI-063 Evolution of consumption of three antibiotics classes and of the resistance of <i>Klebsiella pneumoniae</i> to these classes.	Penicilinas Cefalosporinas Quinolonas
Kidd <i>et al.</i> (2017)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence.	Polimixinas AMPs (Péptidos antimicrobianos)
Navon-Venezia <i>et al.</i> (2017)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> : A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance.	Carbapenemicos Tigeciclina Polimixinas Quinolonas

### 3.7.2.2 Resistencia a antibióticos de *Escherichia coli*.

#### 3.7.2.2.1 Clasificación Taxonómica

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli* (Escherich, 1885).

### **3.7.2.2.2 Características del género *Escherichia*.**

El primer aislamiento de este género se realizó en heces de un niño, en el año 1885 realizado por el pediatra Theodor Escherich, siendo la primera especie encontrada de este género la *Escherichia coli*; la cual es común que se encuentre en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, hay cepas de *E. coli* que son comensales inofensivos del tracto digestivo y otros que son patógenos para humanos y animales. El análisis comparativo de secuencias de ARN ribosomal 5S y 16S sugieren que *Escherichia* y *Salmonella* divergieron de un ancestro en común entre 120 y 160 millones de años, lo cual coincide con el origen de los mamíferos (Welch, 2006). Este género comprende cepas que pueden fermentar glucosa, y alrededor del 90% de las bacterias fermenta lactosa en 1 o 2 días, al realizar la prueba IMVIC (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato) como resultado se obtiene la producción de indol a partir de triptófano y es positivo para rojo de metilo, acetil-metil-carbinol no es formado y el citrato no es utilizado como la única fuente de carbono (Gordon *et al.*, 1973); son bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae, las cuales se pueden tener flagelos y se encapsulan, crece en condiciones aerobias o anaerobias (Nataro y Kaper, 1998).

### **3.7.2.2.3 Características de la especie *Escherichia coli*.**

*Escherichia coli* es una de las más abundantes bacterias anaerobias en la flora intestinal del ser humano (Jaureguy *et al.*, 2008). Esta especie es organismo modelo usado desde hace 120 años, en el cual se realizan experimentos para el estudio de la evolución, adaptación y especiación de las bacterias (Walk *et al.*, 2009); *Escherichia coli* fue llamada originalmente "*Bacterum coli*"; esta bacteria es común que habite en el tracto digestivo de animales y humanos; las cepas de *E. coli* son comensales inofensivos, sin embargo, cuando el hospedero se encuentra débil o inmunocomprometido estas pueden provocar enfermedades infecciosas, otras cepas son patógenas; la patogenicidad de *E. coli* se divide dentro de dos tipos de cepas las que causan enfermedades del tracto digestivo y otras capaces de causar infecciones en sitios externos al que habitan comúnmente (Welch, 2006).

Las infecciones que provocan las cepas patógenas de *Escherichia coli* se puede limitar a superficies mucosas, infecciones en las vías urinarias, sepsis y meningitis,

diarreas entéricas, y osteomielitis asociada a la bacteriemia (Jaureguy *et al.*, 2008); una vía principal para la transmisión de las cepas patógenas de *E. coli* entre hospederos es por la ruta fecal y oral (Walk *et al.*, 2009); para la identificación de las cepas patógenas de esta especie se usan métodos bioquímicos, serotipos, ensayos fenotípicos basados en las características de virulencia y métodos de detección moleculares, al ser *E. coli* un bacilo Gram negativo se puede aislar de manera fácil en medio selectivos a una temperatura media de 37°C en condiciones aeróbicas en medios MacConkey o agar eosina azul de metileno, los cuales son medios selectivos para el crecimiento de miembros de la familia Enterobacteriaceae, los cuales son identificados por reacciones bioquímicas usando la prueba API 20E multitest strip; de acuerdo al esquema modificado de Kuffman, los serotipos de *E. coli* se basan en sus perfiles antígenos de superficie que se clasifican en O somático, H flagelar y K capsular; una combinación específica de los antígenos O y H definen el serotipo de un aislado de *E. coli* de serotipos específicos que pueden ser asociados a otras enfermedades clínicas; los ensayos fenotípicos basados en las características de virulencia son para diferenciar las cepas no patógenas de las patógenas de la flora normal intestinal, debido a que los serotipos se correlacionan no es suficiente para identificar a la cepas patógenas, para lo cual se usa el ensayo de adherencia HEp-2, el cual diferencia las cepas patógenas. El primer método molecular desarrollado para la detección de un patógeno molecularmente fue la de *E. coli* el cual es uno de los más populares y utilizados para diferenciar entre la cepas patógenas y no patógenas de esta especie usando métodos de PCR y sondas de ADN.

#### **3.7.2.2.4 Resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli*.**

A finales de la década de 1950 e inicios de 1960 se descubrió la resistencia a múltiples antibióticos en *E. coli*, el uso indiscriminado de antimicrobianos ha provocado su resistencia, creando un serio problema de salud a nivel mundial (Cabrera *et al.*, 2007). En el cuadro 3 se mencionan los antibióticos a los que presenta resistencia *E. coli* y los estudios que se llevaron a cabo para determinarlos.

Cuadro 3. Estudios de resistencia para antibióticos de *Escherichia coli*.

Autores	Estudio	Antibióticos
Sáenz <i>et al.</i> (2001)	Antibiotic resistance in <i>Escherichia coli</i> isolates obtained from animals, food and humans in Spain	Ác. Nalidíxico Ciprofloxacina Gentamicina Trimetropina/ sulfametoxol
Furtula <i>et al.</i> (2010)	Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of <i>E. coli</i> isolates in poultry litter trials.	Penicilina Eritromicina Tilosina Clindamicina Novobiocina
Liu <i>et al.</i> (2009)	Antibiotic sensitivity profiles determinate with <i>E. coli</i> gene Knock out collection: Generating an Antibiotic Bar Code.	Rifampicina Triclosán Nitrofurantoína Aminoglucósidos β-lactámicos
De kraker <i>et al.</i> (2011)	Mortality and hospital stay associated with resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> Bacteremia: Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe.	Cefalosporinas de tercera generación.
Bryce <i>et al.</i> (2016)	Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by <i>Escherichia coli</i> and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis.	Ampicilina Trimetoprima Cotrimoxazol

### **3.7.2.3 Patogenicidad de *Bacillus cereus*.**

#### **3.7.2.3.1 Clasificación taxonómica de *Bacillus cereus*.**

Domino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus cereus*.

#### **3.7.2.3.2 Características del genero *Bacillus*.**

Este género comprende un extenso y diverso conjunto distinguido de bacterias con una característica en común: la habilidad de hacer endosporas latentes aeróbicas cuando se presentan condiciones inadecuadas para su crecimiento, las especies de *Bacillus* son divididas dentro de tres grupos basándose en la morfología del esporangio y la spora madura, también en los resultados de los análisis fisiológicos y bioquímicos como la producción de catalasa e hidrólisis de almidón, y los requerimientos de crecimiento; siendo las especies de estos grupos altamente heterogéneas (Zeigler y Perkins, 2015); algunas especies son aerobias estrictas y otras son anaerobias facultativas, otras fijan nitrógeno atmosférico; cepas del género *Bacillus* crecen bien en soluciones de glucosa, fosfato de amonio y en ciertas sales minerales, otras necesitan factores de crecimiento adicionales o aminoácidos y tienen un incremento en el requerimiento del complejo nutricional; cepas de *B. fastidiosus* crecen cuando hay ácido úrico o alantoina disponible, el crecimiento de la mayoría de las especies del género se encuentra a un pH de 7 pero también se han encontrado en pH de 9 a 10, a temperaturas de un 25°C a 75°C como máximo (Gordon *et al.*, 1973).

#### **3.7.2.3.3 Características de *Bacillus cereus*.**

Esta especie es un bacilo con bordes rectos, Gram positivo, aeróbico facultativo, formador de esporas, ampliamente distribuido en el ambiente y tiene un fenotipo cercano a otras especies de *Bacillus*, especialmente con *B. anthracis*; esta bacteria

se encuentra en el ambiente como formadora de esporas y como células vegetativas cuando colonizan el cuerpo humano, la microscopía de transmisión de electrones revela que la célula vegetativa tiene una membrana citoplasmática alrededor del contenido celular, el núcleo de la espora se encuentra rodeada por una membrana interior y una corteza, lo cual la hace resistente a condiciones ambientales extremas (Bottone, 2010); esta especie produce enzimas y metabolitos importantes, que degradan diferentes tipos de contaminantes y promueven el crecimiento de plantas y animales cuando es usada como probiótico (Liu *et al.*, 2016).

El ambiente natural donde se encuentra *Bacillus cereus* es en la materia orgánica en descomposición, en aguas marinas y dulces, vegetales y en el tracto digestivo de animales invertebrados; por lo cual de los vegetales infectados se puede llevar a cabo la contaminación al intestino del humano; las esporas germinan al tener contacto con la materia orgánica o con un animal hospedero; esta bacteria también puede tener un ciclo saprofito, en el cual las esporas germinan en bacilos vegetativos los cuales pueden esporular para mantener el ciclo de vida; la patogenicidad de esta especie se debe a la producción de una exoenzima destructora de tejido, por la secreción de toxinas, cuatro hemolisinas, tres fosfolipasas distintas, una toxina que induce el vómito y tres enterotoxinas (hemolisina, enterotoxina no hemolítica y una citotoxina); en el intestino delgado las células vegetativas de *B. cereus*, secretan una proteína enterotóxica e induce la diarrea; en productos alimenticios esta bacteria produce una toxina que genera vómito y un plásmido que codifica un péptido cíclico; adicionalmente el envenenamiento de los alimentos por esta especie, causa infecciones a organismos inmunocomprometidos, comúnmente causando problemas a neonatos, adictos a drogas intravenosas, pacientes con lesiones o con heridas de operaciones; las infecciones que provoca *B. cereus* incluyen bacteriemia fulminante, meningitis o abscesos en el cerebro, neumonía, endoftalmitis y una infección cutánea tipo gangrena gaseosa (Bottone, 2010).

#### **3.7.2.3.4 Resistencia a los antibióticos de *Bacillus cereus*.**

*Bacillus cereus* es un importante organismo para la salud pública, como se ha descrito anteriormente ocasiona enfermedades importantes en el ser humano, en las que causa envenenamiento por consumir alimentos en los que se encuentra, pero

más importante aún es la resistencia que presenta a los antibióticos haciendo difícil su control y tratamiento (Pérez-Portuondo *et al.*, 2011).

Cuadro 4. Estudios de evaluación de *Bacillus cereus* a la resistencia de antibióticos.

Autores	Estudio	Antibióticos
Pérez-Portuondo <i>et al.</i> (2011)	Aislamientos e identificación de <i>Bacillus cereus</i> a partir de dos variantes de arroz comercial ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Penicilina Cefotaxima
Chon <i>et al.</i> (2012)	Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of <i>Bacillus cereus</i> in Sunsik.	β-Lactámicos
Organji <i>et al.</i> (2015)	Occurrence and characterization of toxigenic <i>Bacillus cereus</i> in food and infant faces.	Penicilina
Yim <i>et al.</i> (2015)	Incidence, antibiotic susceptibility, and toxin profiles of <i>Bacillus cereus sensu lato</i> isolated from Korean fermented soybean products.	β-lactámicos
Owusu-Kwarteng <i>et al.</i> (2017)	Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of <i>Bacillus cereus sensu lato</i> isolated from dairy farms and traditional dairy products.	Amoxicilina Ampicilina Cefepima Oxacilina Trimetropina/ Sulfametaxol

### III. ANTECEDENTES

Las investigaciones desarrolladas sobre los metabolitos presentes en el mezquite (*P. juliflora*) y la cachanilla (*P. sericea*), y sus propiedades antimicrobianas e insecticidas; así como los trabajos usando la síntesis verde con extractos acuosos de plantas para la obtención de fitonanopartículas y sus aplicaciones, son descritos a continuación.

Raghavendra *et al.* (2009), usaron alcaloides de Mezquite contra *Alternaria alternata* probando que los extractos de esta planta tienen mayor efecto que los fungicidas comerciales.

Ail-Catzim *et al.* (2015) evaluaron el efecto de extractos de *Pluchea sericea* en adultos de *Bemisia tabaci* (Genn.), donde usaron los tallos y hojas que fueron secadas en un horno, y mezcladas en tres solventes distintos como etanol, acetona y agua destilada en una proporción 1:100 p/v, para obtener 6 extractos; los resultados que obtuvieron fue que los extractos acuosos de esta planta tuvieron gran potencial para repeler y controlar la población de *B. tabaci in vitro*, pero son necesarias más investigaciones.

Raja *et al.* (2012), realizaron un trabajo donde se usó extracto acuoso de hojas frescas de *Prosopis juliflora* para síntesis verde de Nanopartículas de plata (Ag), donde se evaluó la actividad antimicrobiana, para este estudio se utilizaron bacterias patógenas y no patogénicas de aguas negras, el medio de cultivo donde se hicieron crecer las bacterias contenían las nanopartículas de plata, a este medio se le aplicó una concentración de 10 mg en 100 ml de aguas residuales incubándolas por 6 horas; con base a los resultados que obtenidos puede decirse que a mayor concentración de nanopartículas y tiempo de incubación la población de bacterias decrecía.

Ávila-Morales *et al.* (2017), elaboraron mediante síntesis verde nanopartículas de plata usando extracto de hojas de menta (*Mentha piperita*), las nanopartículas presentaron diferentes morfologías (esféricas, triangulares, hexagonales e irregulares), se probaron sus propiedades antimicrobianas contra *E. coli* y *S. aureus*, donde se presentó inhibición en ambas bacterias.

Abdelmoteled *et al.* (2018) realizaron la síntesis verde de nanopartículas de plata con extractos de *P. glandulosa* y *P. sericea*, evaluando su efecto contra *Fusarium solani* en plantas transgénicas resistentes a insectos de algodón, donde tuvieron los mejores resultados con las nanopartículas de *P. glandulosa*, pero ambas pudiendo inhibir al hongo.

Yasur y Usha-Rani (2015) midieron la susceptibilidad del efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento, desarrollo y fisiología de insectos lepidópteros, donde realizaron la caracterización óptica y morfológica, y la determinación de la concentración de la plata en los insectos.

Ruiz-Romero *et al.* (2018) realizaron la síntesis verde de fitonanopartículas de *Yucca shilerifera* contra patógenos transmitidos por el suelo *Fusarium solani* y *Macrophomia phaseolina*, donde realizaron la síntesis verde usando extracto acuoso de esta planta, en baño María a temperatura constante; para posteriormente caracterizarlas usando la espectrometría UV-VIS, y evaluar su efecto contra los patógenos.

Bernardo-Mazariegos *et al.* (2018), realizaron la síntesis de nanopartículas de plata a partir de *Justicia spicigera* y evaluaron sus propiedades antimicrobianas en bacterias como *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* y hongos patógenos, obteniendo por análisis de microscopia electrónica (SEM) el tamaño y la forma.

## IV. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener, caracterizar y evaluar las propiedades antimicrobianas e insecticidas de fitonanopartículas de mezquite (*Prosopis juliflora* Sw.) y cachanilla (*Pluchea sericea* Nutt.).

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener mediante síntesis verde las fitonanopartículas de cobre y zinc, de mezquite y cachanilla.
- Caracterizar las fitonanopartículas por espectrometría UV-VIS, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX) y analizador del tamaño de partículas (NANOTRAC).
- Evaluar el efecto insecticida de las fitonanopartículas en *Phenacoccus solenopsis* Tinsley, observando la severidad, viabilidad celular (toxicidad) y mortalidad que tienen sobre el insecto.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de las fitonanopartículas en tres cepas bacterianas *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Klebsiella pneumoniae*.

## V. HIPÓTESIS

- Usando el método de síntesis verde habrá formación de fitonanopartículas de las cuales todas o al menos una tendrá efecto insecticida sobre *P. solenopsis* Tinsley y propiedades antimicrobianas sobre una o más de una de las tres cepas bacterianas a evaluar.

## VI. ZONA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC), ubicada en el ejido Nuevo León, del Valle de Mexicali, Baja California.



Figura 8. Recolecta de material vegetal y laboratorio de biotecnología, ICA, UABC (izquierda), recolecta *P. solenopsis* en parcela ejido Cuernavaca (derecha).

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para esta investigación se realizó la síntesis de fitonanopartículas de cachanilla y mezquite con dos soluciones de metales que son sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ); donde se obtuvieron cuatro fitonanopartículas de las cuales se probará su actividad insecticida y antimicrobiana.

### 7.1 Recolecta del material.

#### 7.1.1 Material vegetal.

Se colectaron ramas frescas de cachanilla (*Pluchea sericea* Nutt.) y mezquite (*Prosopis juliflora* Sw.), de las áreas verdes del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California; en el laboratorio las hojas de cada planta colectada se puso a secar en un horno a  $50^\circ\text{C}$  durante 24 horas, para posteriormente se procesar el material vegetal en un molino para café, hasta quedar molidas, para finalizar se guardaron las hojas molidas de cada planta en bolsas tipo Ziploc® previamente etiquetadas.



Figura 9. Hojas secas y molidas de *P. juliflora* y *P. sericea*, con el molino para café marca KRUPS®.

### 7.1.2 Recolecta *Phanacoccus solenopsis* Tinsley.

En una parcela localizada en el de Valle de Mexicali, Baja California; con cultivo de algodón, infestada por *P. solenopsis* Tinsley, se procedió a tomar cuatro plantas de algodón con presencia de colonias de estos insectos y otras cuatro plantas que se encontraran totalmente sanas; las cuales fueron arrancadas de raíz, y guardadas en bolsas de plástico tipo Ziploc® para su posterior manejo en el laboratorio. En el laboratorio las plantas colectadas con colonias del insecto se pusieron en una mesa, con la ayuda de pinzas y agujas de disección se tomaron las colonias localizadas en los tallos y hojas, y seleccionaron únicamente las hembras de *P. solenopsis* Tinsley, procurando tuvieran el mismo tamaño, colocándolas en una caja Petri para la monta del ensayo biológico descrito más adelante.



Figura 10. Caja Petri con hembras de *P. solenopsis* recolectadas (izquierda), plantas de algodón con colonias del insecto (esquina superior derecha) y plantas sanas arrancadas de raíz (esquina inferior derecha).

## 7.2 Síntesis verde de fitonanopartículas.

### 7.2.1 Obtención del extracto acuoso.

Del material vegetal previamente procesado de cachanilla y mezquite se pesó tres gramos, el cual se depositó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y adicionará 30 ml de agua destilada y cubrió con papel aluminio para que no fuera afectada por la luz; la mezcla se mantuvo en agitación constante a 150 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente, al terminar el tiempo la mezcla se filtró con gasas, de la

mezcla filtrada se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en un vaso de precipitado de 50 mililitros y el sedimento se desechó.



Figura 11. Extractos acuosos de mezquite y cachanilla sin centrifugar (esquina superior izquierda), extractos centrifugados (en medio y derecha).

### 7.2.2 Preparación de soluciones metálicas.

Las soluciones metálicas que se usaron para la síntesis de fitonanopartículas fueron elaboradas a base de dos sales metálicas, sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ); donde se prepararon 100 ml de cada solución de metales, a una concentración de 10 mM.

### 7.2.3 Síntesis de Fitonanopartículas.

De acuerdo al método de Ruiz *et al.*, (2018), en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml envuelto en papel aluminio se colocó 40 ml de solución a una concentración de 10 mM, y 10 ml de extracto acuoso; la mezcla obtenida se dejó en baño María durante 30 minutos a una temperatura constante de  $60^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo se sacó el matraz del baño María, dejándolo enfriar a temperatura ambiente, y se observó el cambio de color que tuvo la mezcla, para finalizar se almacenó en frascos de vidrio con tapa envueltos en aluminio en el refrigerador.



Figura 12. Baño maría durante la síntesis, y fitonanopartículas de mezquite y cachanilla.

### 7.3 Caracterización fisicoquímica de las fitonanopartículas.

La espectrometría UV-VIS se llevó a cabo usando un espectrofotómetro HACH DR-6000 UV-VIS™, donde los extractos acuosos de cachanilla (*Pluchea sericea* Nutt.) y mezquite (*Prosopis juliflora* SW), y las fitonanopartículas que se obtuvieron, se diluyeron a una proporción 1:10 ml v/v (1 ml de los extractos, fitonanopartículas o solución de metales en 10 ml de agua destilada); tomándose como blanco la solución de metales de cobre y zinc. Para la lectura de la curva de absorción, en una celda de cuarzo se colocó 3 ml de la solución del metal a leer ( $\text{CuSO}_4$  ó  $\text{ZnSO}_4$ ), y la celda de cuarzo con la solución blanco se depositó dentro del espectrofotómetro el cual se calibró a cero; posteriormente se tomaron 3 ml del extracto acuoso de cada planta, realizando la lectura y guardando la curva de absorción, para finalizar analizó cada fitonanopartícula correspondiente al metal blanco y guardó; la lectura se realizó en un rango de longitud de onda de 250 a 700 nm. Este procedimiento se hizo en el laboratorio de Biotecnología ambiental, del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC.

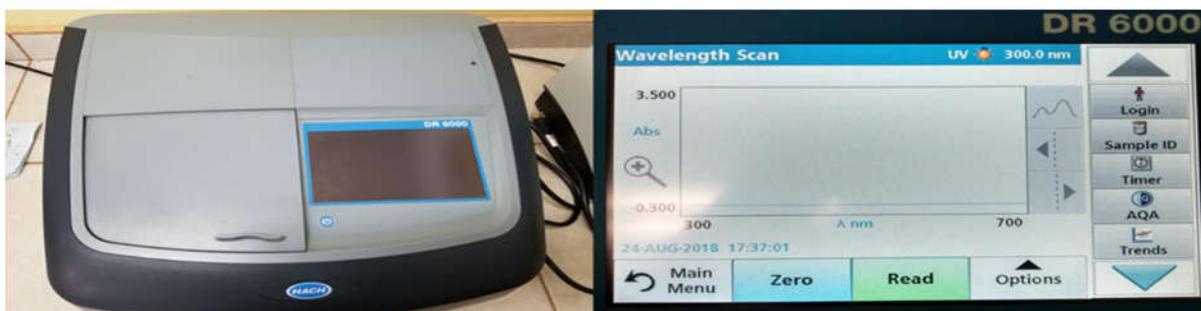


Figura 13. Espectrofotómetro HACH DR-6000 (izquierda), pantalla del aparato donde se calibra el rango de lectura.

Los demás análisis de caracterización como espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía de Barrido (SEM-EDX) y el análisis del tamaño de partícula (NANOTRAC), se realizaron en el laboratorio de corrosión y materiales de uso Aeroespacial, del Instituto de Ingeniería Campus Mexicali, de la Universidad Autónoma de Baja California.

#### 7.4 Evaluación insecticida de las fitonanopartículas.

##### 7.4.1 Ensayo biológico de *Phenacoccus solenopsis* Tinsley.

Después de la colecta de los insectos en campo, para montar el experimento, en cajas Petri de plástico se colocó papel secante en la base y se colocó una hoja de las plantas de algodón sanas previamente lavadas con agua destilada, se etiquetó según el tratamiento al que correspondía, los cuales contaron con una repetición (figura 14); los tratamientos que se evaluaron fueron: testigo H<sub>2</sub>O destilada (T0), fitonanopartículas de mezquite CuSO<sub>4</sub> (T1), cachanilla ZnSO<sub>4</sub> (T2); cachanilla CuSO<sub>4</sub> (T3). Las fitonanopartículas de zinc fueron discriminadas de este experimento debido a que en ensayos previos en el laboratorio no presentaron ningún efecto insecticida, siendo más efectivo el grupo control, por lo cual no se tomaron en cuenta para no obtener un falso positivo.



Figura 14. Monta ensayo biológico. Placa Petri con papel secante (A), hojas de algodón sanas lavadas con agua destilada (B), hoja de algodón en placa Petri (C).

Para cada tratamiento se colocaron 10 insectos sobre la hoja de algodón en cada caja Petri previamente etiquetada con el tratamiento correspondiente, a continuación, se rociaron con aspersores que contenían las fitonanopartículas de cada tratamiento etiquetado, colocándolos en una cámara bioclimática Lab-Line

BIOTRONETTE MARK III™ a una temperatura constante de 26°C con periodos de luz y oscuridad de 12 horas; los insectos se observaron cada 24 horas durante 96 horas, donde se realizó el conteo de insectos vivos, de aquellos que presentaran daño en el movimiento de alguna de sus patas (severidad) y de muertos, después de las observaciones cada 24 horas se bañaron de nuevo con el tratamiento correspondiente (figura 15).



Figura 15. Placa Petri con *P. solenopsis* (izquierda), evaluación insecticida fitonanopartículas (centro), y cámara bioclimática BIOTRONETTE MARK III™(derecha).

#### 7.4.2 Cálculo de la severidad en *P. solenopsis* Tinsley.

La severidad (SE) de las fitonanopartículas se evaluó cada 24 horas durante 4 días, la cual se basó en el número de patas que el insecto no movía, colocándolos boca arriba y estimulándolos físicamente con una aguja de disección haciendo una presión leve sobre el insecto provocando el movimiento de sus patas o el querer regresar a su posición normal, para medirla se elaboró una escala de 1 a 4, según se muestra en el cuadro 4 (Espinosa *et al.*, 2004).

Cuadro 5. Valores de severidad (SE) de acuerdo al número de patas del insecto que no se movían.

Valores	Patatas sin movimiento
0	Sin daño
1	1 a 3
2	3 a 4
3	4 a 5
4	5 a 6

Dónde: 0 = sin daño, 1 = 30% de lesión; 2 = 50%; 3 = 70%; y 4 = 90% de daño o muerte; la severidad se expresó como una proporción del total de patas del insecto, usando la fórmula (formula 1) propuesta por Espinosa *et al.* (2004) modificada para esta investigación, la cual no se requirió modificación de los datos:

$$SE (\%) = \frac{\Sigma \text{ de los valores de la enfermedad}}{(\text{n}^\circ \text{ total de valores})(\text{valor max. enfermedad})} \times 100$$

Fórmula 1. Porcentaje de Severidad (SE).

#### 7.4.3 Cuantificación de la viabilidad celular en *Phenacoccus solenopsis* Tinsley.

Para la viabilidad celular del insecto se utilizó la tinción con azul de Evans, el cual es usado para determinar el número relativo de células muertas en cultivos celulares de acuerdo con el método de Toledo *et al.*, (2018), pero que se modificó para medir la viabilidad en el insecto *P. solenopsis* Tinsley. Donde se colocaron cinco insectos de cada tratamiento en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, formadas la alícuotas de cada tratamiento se adicionaron 500  $\mu$ l de azul de Evans al 0.1% (p/v) y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se centrifugó la alícuota a 3000 rpm durante 10 minutos (figura 16).



Figura 16. Tinción vital; preparación de las alícuotas (A y B), alícuotas con azul de Evans (C).

Al terminar el tiempo, la muestra se lavó con agua destilada y se centrifugó durante 10 minutos, repitiéndose este paso hasta que el sobrenadante no presentara coloración, en la última lavada la centrifugación se hizo durante 15 minutos; las alícuotas con los piojos harinosos se suspendieron en 2 ml de solución de extracción del colorante que contiene metanol al 50% y SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1% (p/v), y colocaron a baño María a 65°C durante 30 minutos, para finalizar se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se guardó. Se leyó la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro Genesys 20 de Thermo Scientific (figura 17).



Figura 17. Obtención del sobrenadante de las alícuotas (izquierda), y lectura del espectrofotómetro (derecha).

Simultáneamente se corrió un control interno, que consistió en una muestra de cinco piojos harinosos sin aplicación de algún tratamiento, la cual se colocó en un horno a 60°C por 20 minutos, con el que se obtuvo el 100% de las células muertas, posterior a esto se les realizó un lavado con una solución jabonosa al 10% (v/v) para retirar la cubierta cerosa que recubre al insecto y permitir el ingreso del azul de Evans, y así poder cuantificar la viabilidad celular. Obtenidas las absorbancias se utilizó la siguiente fórmula (fórmula 2) para cuantificar la viabilidad celular:

$$\%Células\ muertas = \left(\frac{AV}{AM}\right) \times 100$$

$$\%Células\ vivas\ o\ viabilidad = 100 - \% células\ muertas$$

Fórmula 2. Viabilidad celular.

Dónde:

AV = Absorbancia de las células sin tratamiento con calor.

AM = Absorbancia de las células con tratamiento de calor.

#### **7.4.4 Cálculo de mortalidad de *P. solenopsis* Tinsley.**

La mortalidad de *P. solenopsis* en cada tratamiento, se evaluó cada 24 horas durante 4 días que duró el experimento; donde se cuantificaron los insectos vivos y muertos de acuerdo con el método de Silva-Aguayo *et al.*, (2004), considerando como muertos a aquellos insectos que no presentaron ningún movimiento al ser estimulados con una leve presión de una aguja de disección (FAO, 1980); donde se utilizó la fórmula de Abbott para obtener el porcentaje de mortalidad (Abbott, 1925).

#### **7.4.5 Cuantificación de Cobre (Cu) en *Phenacoccus solenopsis* Tinsley.**

Para determinar la acumulación de las fitonanopartículas de cachanilla y mezquite con cobre en el insecto, de cada tratamiento incluido el control, se utilizó el método de Yasury Usha Rani (2015) con modificaciones; donde se colocaron dos insectos en tubos de cristal con tapa (alícuota) y etiquetaron, a continuación, los tubos se colocaron en una gradilla y dentro de una cámara de extracción se añadieron 2 ml de ácido nítrico; lo siguiente fue colocarlos en un biodigestor a una temperatura constante de 120°C durante 50 minutos. Al terminar el tiempo de digestión, en tubos Falcon se colocaron 25 ml de agua destilada y 1 ml de la alícuota. En el último paso se colocó 2 ml de la disolución en tubos de la prueba de Copper TNTplus Vial Test (0.1-8.0 mg/L Cu) de HACHT Company™; y se leyó en el espectrofotómetro HACH DR 6000 que cuantificó los miligramos/litros de cobre que contiene los insectos por cada tratamiento (figura 18).



Figura 18. Alícuotas, digestión y lectura de las muestras en el espectrofotómetro, imagen (centro) de lectura en el espectro del extracto acuoso de Mezquite (*P. juliflora*).

#### 7.4.5 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico de los datos de severidad y mortalidad de los tratamientos evaluados en *Phenacoccus solenopsis* el cual fue un análisis de varianza (ANOVA), los cuales fueron separados usando el método de Dunnett (Yasur y Usha Rani, 2015), para conocer la diferencia entre los tratamientos y el grupo control, usando el programa SigmaPlot12.

#### 7.5 Evaluación antimicrobiana de las fitonanopartículas.

##### 7.5.1 Establecimiento de los tratamientos.

Para esta prueba se usaron cuatro tratamientos, que fueron fitonanopartículas de mezquite con cobre, fitonanopartículas de mezquite con zinc, fitonanopartículas de cachanilla de cobre y fitonanopartículas de zinc; y como grupos control se usaron los extractos acuosos de mezquite (*P. juliflora*) y de cachanilla (*P. sericea*), que presentan inhibición bacteriana y con los cuales se pretende no obtener un falso positivo. Las cepas bacterianas que se evaluaron fueron *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Klebsiella pneumoniae*, que han demostrado tener resistencia a antibióticos y bactericidas, que fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Biotecnología Ambiental, de Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California.

### 7.5.2 Medios para reactivación de las cepas.

Para la reactivación de las tres cepas, se preparó caldo LB BROTH (Lennox) de CONDA LAB.; en una campana de flujo laminar se realizó la inoculación con la ayuda de un asa bacteriológica raspando del medio de la caja Petri parte de la colonia bacteriana, la cual se depositó dentro de los tubos de ensayo haciendo un movimiento circular, para terminar, se colocaron los tubos inoculados en una incubadora, dejando en agitación a 200 rpm a 28°C durante 24 horas.

### 7.5.3 Preparación medio agar nutritivo y elaboración de antibiogramas.

Se prepararon 250 ml de agar nutritivo MCD LAB®, donde de una vez pesado se depositó en un matraz volumétrico de 300 ml y colocó 250 ml de agua destilada, a continuación, se colocó en una parrilla eléctrica con agitador magnético y calentó hasta hervir; para finalizar el vaciado del medio en las cajas Petri se hizo en una campana de flujo, donde se dejó solidificar y a prueba de esterilidad por 24 horas.

Para la elaboración de los discos de difusión Baeur-Kirby (Maye y Guzmán 1984) se usó papel filtro, los cuales fueron cortados con una perforadora y se depositaron en una caja Petri para su esterilización; terminada la esterilización en una campana de flujo laminar, con la ayuda de una pinza de disección estéril se colocaron los antibiogramas de papel filtro en cajas Petri de cada tratamiento que se evaluó, sobre cada antibiograma se depositaron 100 µl de las fitonanopartículas, quedando totalmente cubiertas de las fitonanopartículas (figura 19).

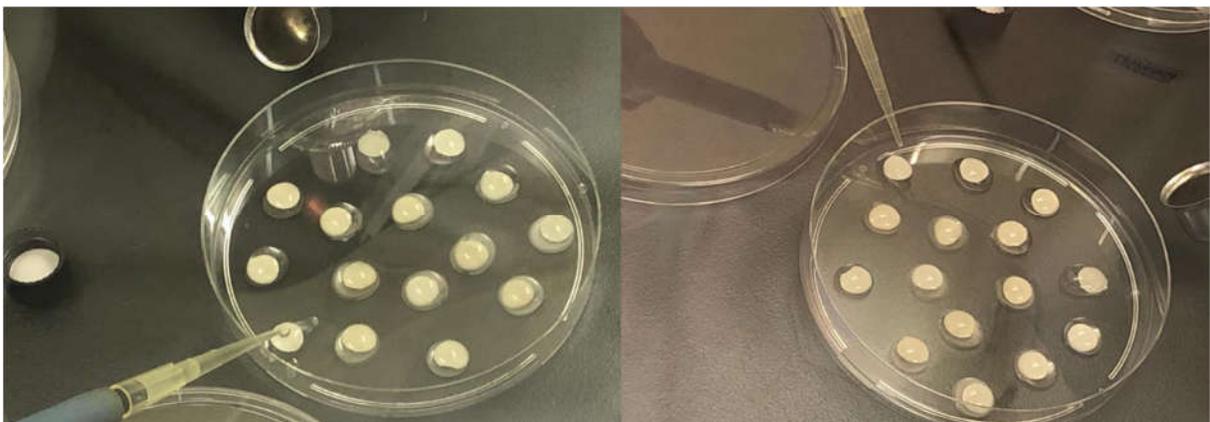


Figura 19. Absorción de las fitonanopartículas a evaluar en los discos de difusión Baeur-Kirby para cada tratamiento.

#### 7.5.4 Prueba de Inhibición bacteriana de las fitonanopartículas.

Al concluir el tiempo de la prueba de esterilidad de las cajas Petri con agar nutritivo, se realizó la siembra en masivo, donde se depositó 100 µl de caldo LB inoculado con las bacterias sobre la caja Petri y con la ayuda de una espátula de Drigalski estéril, se giró sobre el medio teniendo cuidado de no romperlo y extendiendo el caldo LB con bacterias de manera uniforme; posteriormente con la ayuda de una pinza se colocaron los antibiogramas de cada tratamiento distribuyéndolos de manera circular de acuerdo a las manecillas del reloj; para finalizar se incubaron a una temperatura constante de 30°C durante 24 horas, concluido el tiempo de incubación, se sacaron y colocaron en un cuenta colonias, para lo cual se observó si hubo formación de halo de inhibición aplicando el método cualitativo de presencia o ausencia de halo, y con la ayuda de un Vernier se midió el diámetro del halo de inhibición formado.

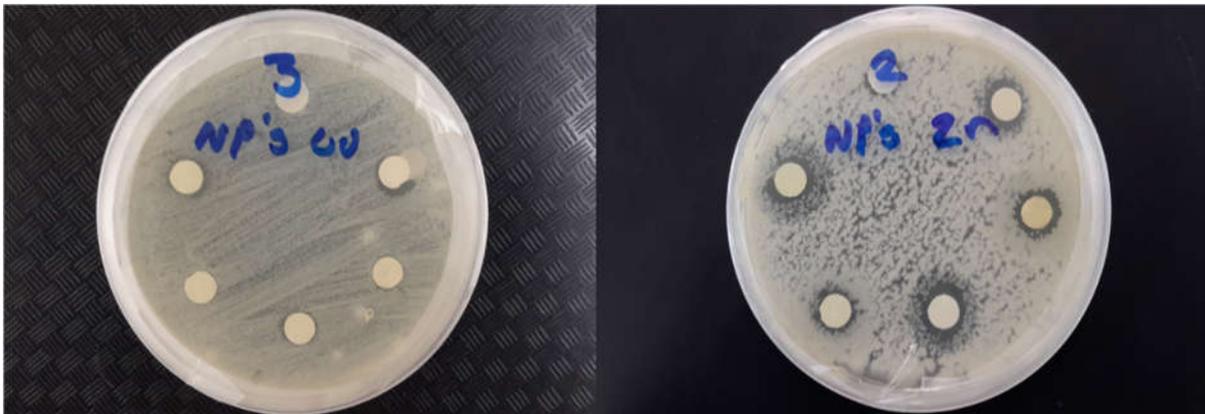


Figura 20. Evaluación de la inhibición bacteriana usando discos de difusión Baeur-Kirby en cepas bacterianas.

#### 7.5.5 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se evaluaron usando la prueba de  $X^2$  para datos cualitativos de presencia y ausencia de halo de inhibición, con una  $p=0.05$ ; y para saber si la inhibición bacteriana es provocada por las fitonanopartículas, los tratamientos evaluados fueron procesados usando el método de Dunnett, con el cual también se supo cuál es el tratamiento más efectivo como antimicrobiano para cada bacteria. El tamaño del halo de inhibición se usó como una medida cuantitativa y se sacaron los promedios de cada tratamiento, para saber cuál de los tratamientos es más efectivo contra las cepas evaluadas

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Síntesis de fitonanopartículas.

La síntesis verde de las fitonanopartículas de *P. juliflora* Sw (mezquite) y *P. sericea* Nutt (cachanilla) de cobre y zinc presentaron como primer resultado el cambio de color entre los extractos acuosos de cada planta y las fitonanopartículas, debido al efecto plasmon, como se puede ver en la figura 21, confirmando como prueba inicial que se llevó a cabo la síntesis, donde se observa que el extracto acuoso de hojas de mezquite (*P. juliflora* Sw) es de color amarillo pálido (González-Mendoza *et al.*, 2018), en contraste con las fitonanopartículas de cobre que presentan un color verde-azulado y las fitonanopartículas de zinc son traslúcidas sin presencia de color (figura 21A); en el caso de la cachanilla (*P. sericea* Nutt) el extracto acuoso de sus hojas presentaron un color marrón oscuro (Hussain *et al.*, 2013), las fitonanopartículas de cobre son de color verde-amarillo y las de zinc son de color café pálido (figura 21B).



Figura 21. Diferencias entre el extracto acuoso de hojas de Mezquite con las fitonanopartículas de cobre y zinc (A) y extracto acuoso Cachanilla con las fitonanopartículas de Mezquite cobre y zinc (B).

### 8.2 Caracterización de las fitonanopartículas.

#### 8.2.1 Caracterización óptica con espectrometría UV-VIS.

La curva de absorbancia obtenida del extracto acuoso de las hojas de mezquite ó cachanilla, y de cada una de las fitonanopartículas, usando como blanco las soluciones de los metales de zinc y cobre, a una concentración de 10 mM; se compararon, como se puede ver en las figuras 22 y 23.

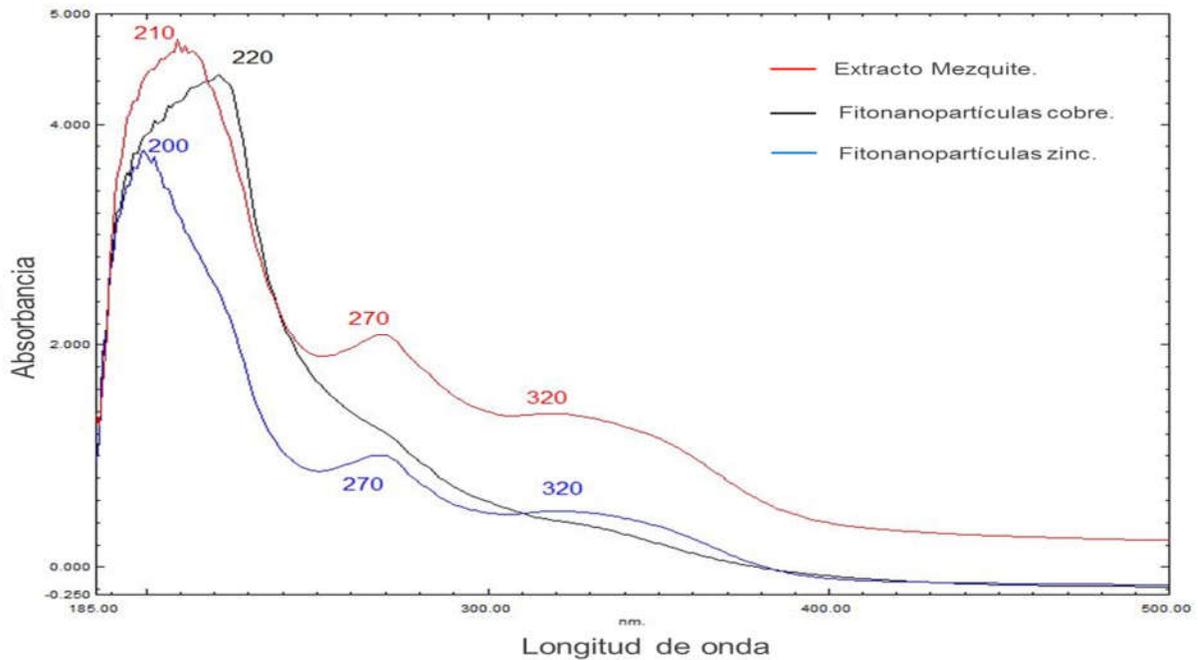


Figura 22. Comparación de curvas de absorción del extracto acuoso de Mezquite (rojo) con las fitonanopartículas de zinc (azul) y cobre (negro).

Donde se puede observar (figura 22), que el caso del extracto de mezquite (*P. juliflora* Sw.), se observan picos de absorción a 210, 270 y 320 nm, en las fitonanopartículas de zinc (azul), se observan picos a 200, 270 y 320 nm, y para las fitonanopartículas de cobre (negro) se encontró un pico a los 220 nm (figura 22).

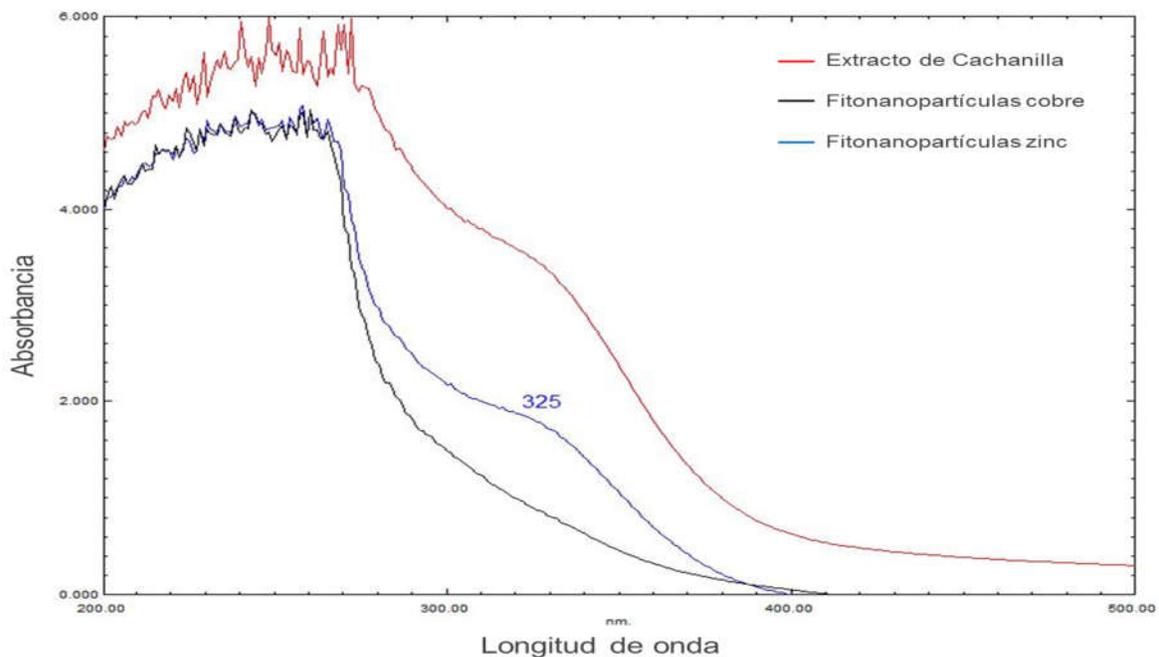


Figura 23. Curvas de absorbancia de espectrometría UV-VIS de las fitonanopartículas de zinc (azul) y cobre (negro) con el extracto acuoso de Cachanilla (*P. sericea* Nutt.) (rojo).

En la figura 23 se observa que el extracto acuoso (rojo), las fitonanopartículas de cobre (negro) y zinc (azul), son similares en forma, pero en el extracto acuoso se presenta un pico entre los 320 a 330 nm con una absorbancia encima de los 2 A, en las fitonanopartículas de zinc un pico a los 325 nm con una absorbancia menor a los 2 A, y finalmente en las fitonanopartículas de cobre no presentan una curva de absorbancia entre los 320 a 330 nm, pero sí un pico entre los 260 a 280 nm con una absorbancia por arriba de 4 A; lo cual indica la formación de nanopartículas.

### 8.2.2 Caracterización morfológica con microscopia de barrido (SEM).

La morfología de las fitonanopartículas de mezquite y cachanilla con cobre o zinc, se obtuvo con un microscopio de barrido JEOL 6010, los resultados se muestran en la figura 24; donde se puede apreciar que la mayoría de las fitonanopartículas cobre (fitoNPs-Cu) de mezquite presentan una forma elipsoidal (figura 24.A), en contraste con las fitoNPs-Cu de cachanilla presentaron una forma esférica (figura 24.B); las fitoNPs-Zn de mezquite, tuvieron forma esférica irregular (figura 24.C), en cambio las fitoNPs-Zn de cachanilla tiene forma de una flor pentagonal (figura 24.D).

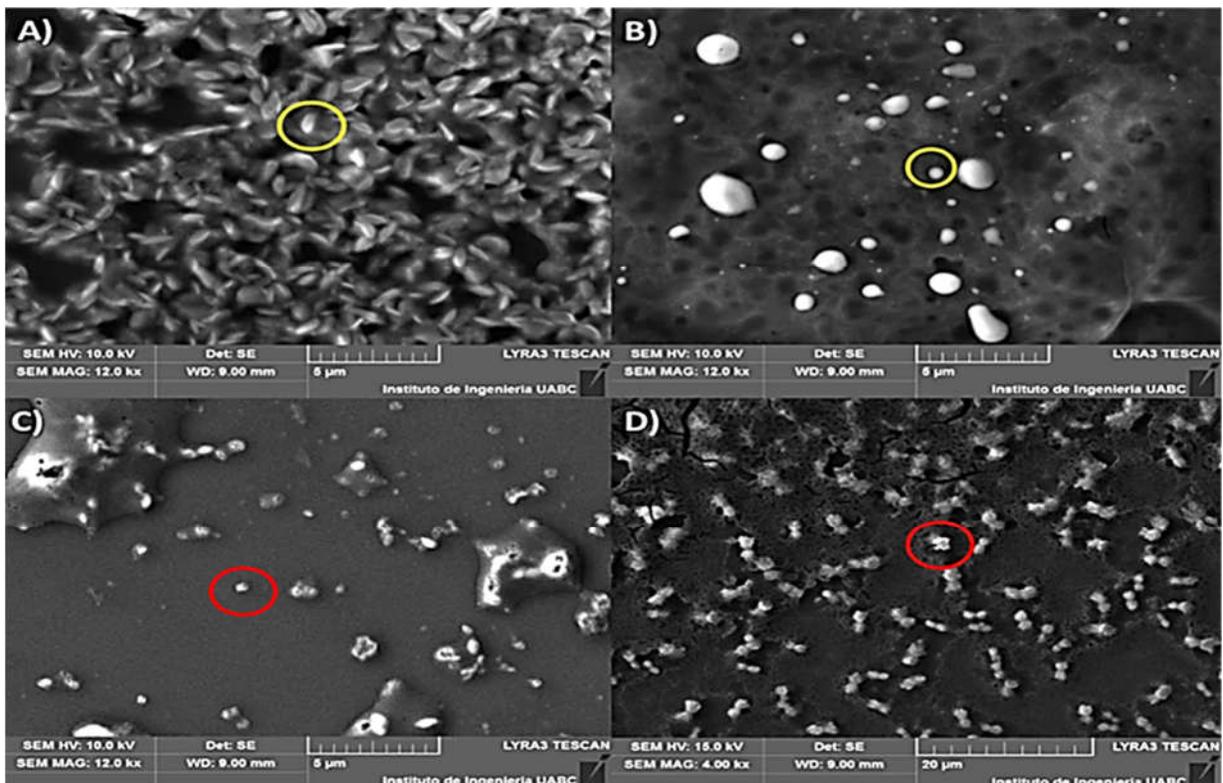


Figura 24. Análisis SEM para determinar la forma de las fitonanopartículas, fitoNPs-Cu de Mezquite (A), fitoNPs-Cu Chachanilla (B), fitoNPs-Zn Mezquite (C), y fitoNPs-Zn Cachanilla (D).

### 9.2.3 Caracterización estructural con microscopía de barrido con análisis de energía dispersa de rayos X (SEM-EDX) y espectroscopia de infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La composición de las fitonanopartículas (fitoNPs), revela que las FitoNPs-Cu de mezquite (*P. juliflora* Sw) contiene cobre (34.85%), y también otros elementos como carbono, oxígeno, magnesio, calcio, azufre, cloro y sílice (41.99%), siendo este último el elemento con mayor presencia (figura 25.A), en contraste las FitoNPs-Cu de cachanilla (*P. sericea* Nutt) donde el cobre es el elemento con mayor concentración (43.22%), también encontrándose la presencia de otros elementos en menor cantidad como el carbono, oxígeno, sílice, azufre, cloro, potasio y calcio (figura 25.B).

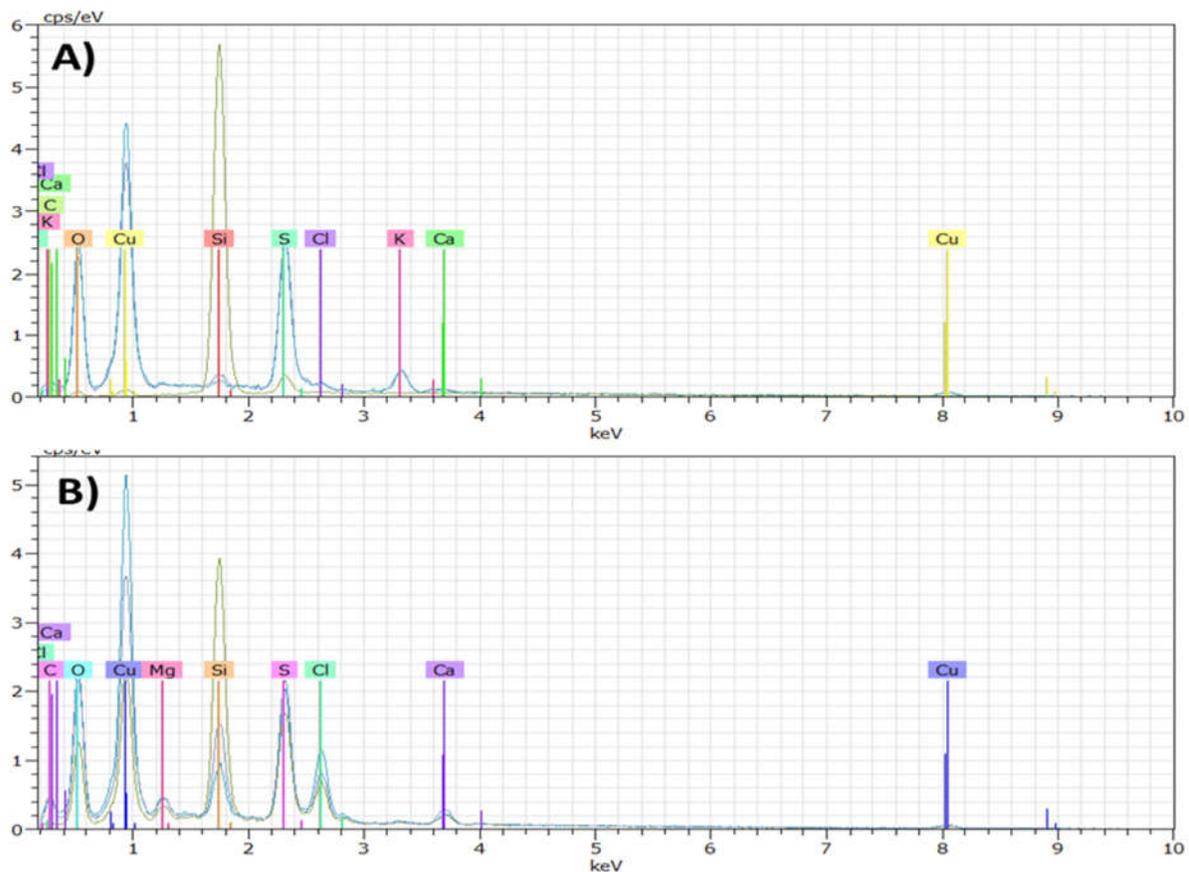


Figura 25. Análisis de microscopía de barrido de electrones y difracción de rayos X (SEM-EDX) para FitoNPs-cobre de *Prosopis juliflora* Sw (A) y *Pluchea sericea* Nutt (B).

Para las fitoNPs de *Prosopis juliflora* Sw., con zinc se encontró la presencia de elementos como carbono, oxígeno, sílice, azufre, potasio, calcio y zinc, este último

con baja presencia (5.67%), siendo el elemento con mayor presencia sílice (75.24%), (figura 26.A); en el caso de las fitoNPs-Zn de *Pluchea sericea* Nutt los elementos que hay son carbono, oxígeno, sílice, cloro, potasio y zinc (5.74%) en baja concentración, en contraste con el sílice (56.50%) que es el elemento más abundante (figura 26.B).

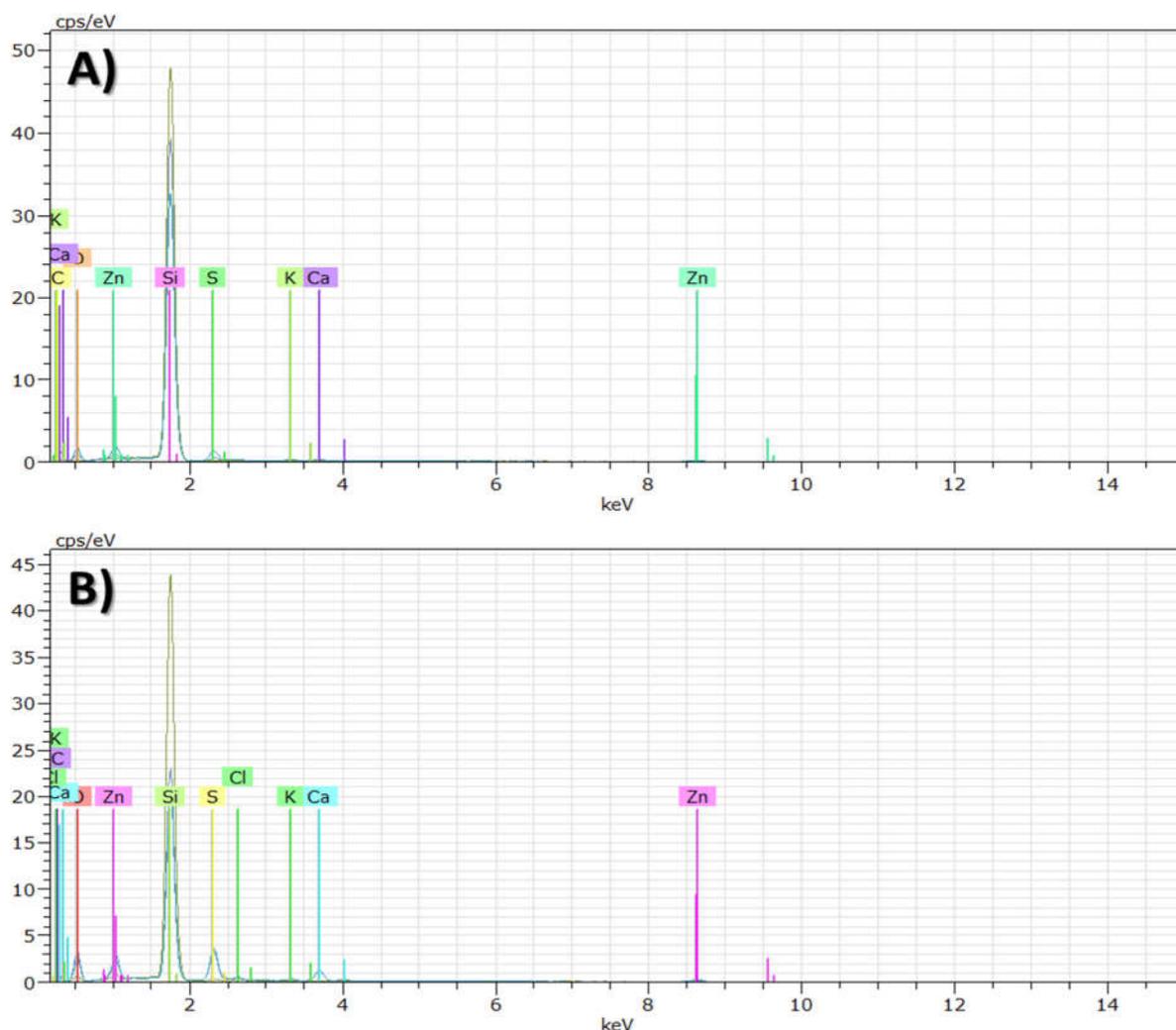


Figura 26. Análisis SEM-EDX de fitonanopartículas de mezquite (*P. juliflora* Sw.) con zinc (A) y fitonanopartículas de cachanilla (*Pluchea sericea* Nutt.) con zinc (B).

Para la espectroscopia FTIR donde el extracto acuoso de mezquite (*P. juliflora* Sw.) y cachanilla (*P. sericea* Nutt.) fueron usados como control; se observaron las bandas del extracto acuoso de *P. sericea* Nutt., antes y después de la reducción (figura 27), mostrando picos similares entre el extracto acuoso y las fitonanopartículas de cobre (imagen 27.C) y zinc (imagen 27.B), excepto por el tamaño de las bandas donde se puede observar el estiramiento en los enlaces O-H,

de los fenoles o alcoholes, C-H de los metilos, N-H de los anillos bencénicos y principalmente señales de los enlaces C=N; para las aminas aromáticas, se vio una banda, donde se observó la variación en la reducción de tamaño en la señal localizada a  $662\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo C-H de los alquinos.

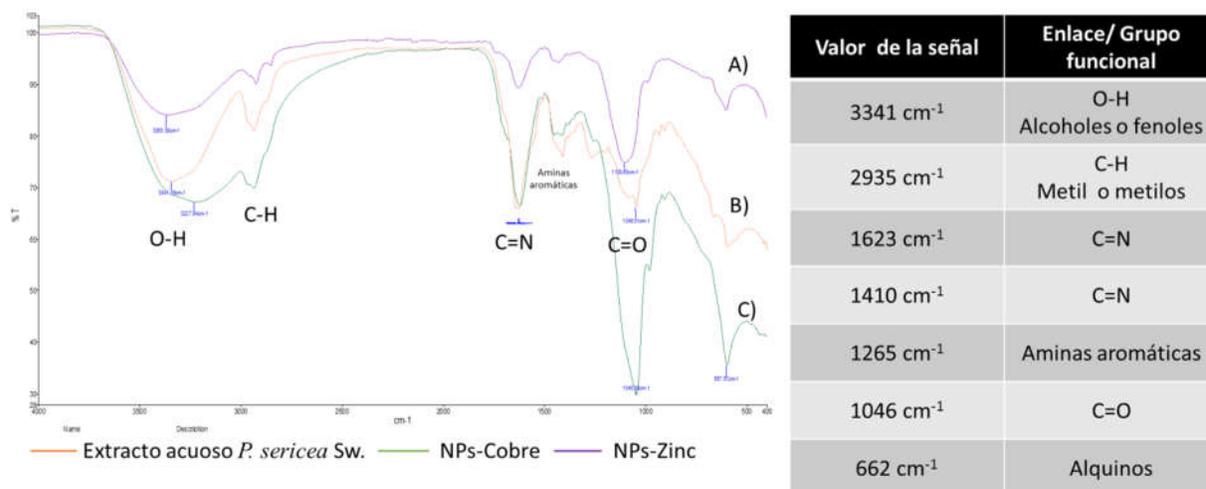


Figura 27. Espectroscopia FTIR de extracto acuoso de *P. sericea* Nutt (B), fitonanopartículas de cobre (C) y zinc (A).

En el espectro FTIR de extracto acuoso y las fitonanopartículas de *P. juliflora* Sw., de cobre y zinc, exhibieron variaciones en el tamaño de las bandas de IR localizadas en la región  $3225, 2925, 2853, 1601, 1103, 1059$  y  $602\text{ cm}^{-1}$  indicando el enlace del biomaterial y los metales en los grupos funcionales como alcoholes/fenoles, aminas, alcanos y halógenos (figura 28).

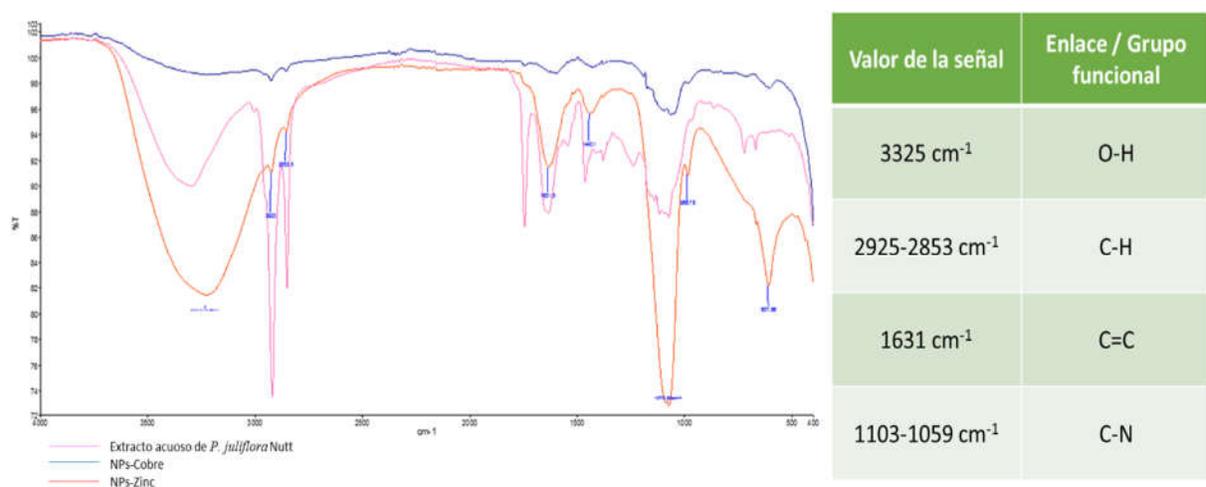


Figura 28. FTIR (espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier) múltiple de extracto acuoso y fitonanopartículas de *P. juliflora* Sw., de cobre y zinc.

### 9.2.4 Caracterización del tamaño de partícula

El tamaño promedio de las fitonanopartículas, fue determinado por el análisis DLS (figura 29); el tamaño obtenido para las fitonanopartículas de *P. juliflora* Sw., fue polidisperso, pero con un promedio de 33.8 nm (Figura 29.A), en contraste con las fitonanopartículas de *P. sericea* Sw. del mismo metal, que tuvieron un tamaño de alrededor de 68.10 nm (figura 29.B).

En el caso de las fitonanopartículas de *P. juliflora* Sw., de zinc, presentaron distintos tamaños de partículas con un promedio de 51.25 nm, parecido y cercano a las fitonanopartículas de cobre de esta planta (figura 30.A), para las fitonanopartículas de *P. sericea* Nutt., con zinc se notó la presencia de varios tamaños con un promedio de 53.44 nm en contraste con las fitonanopartículas de cobre de esta planta que tienen un mayor tamaño (figura 30.B).

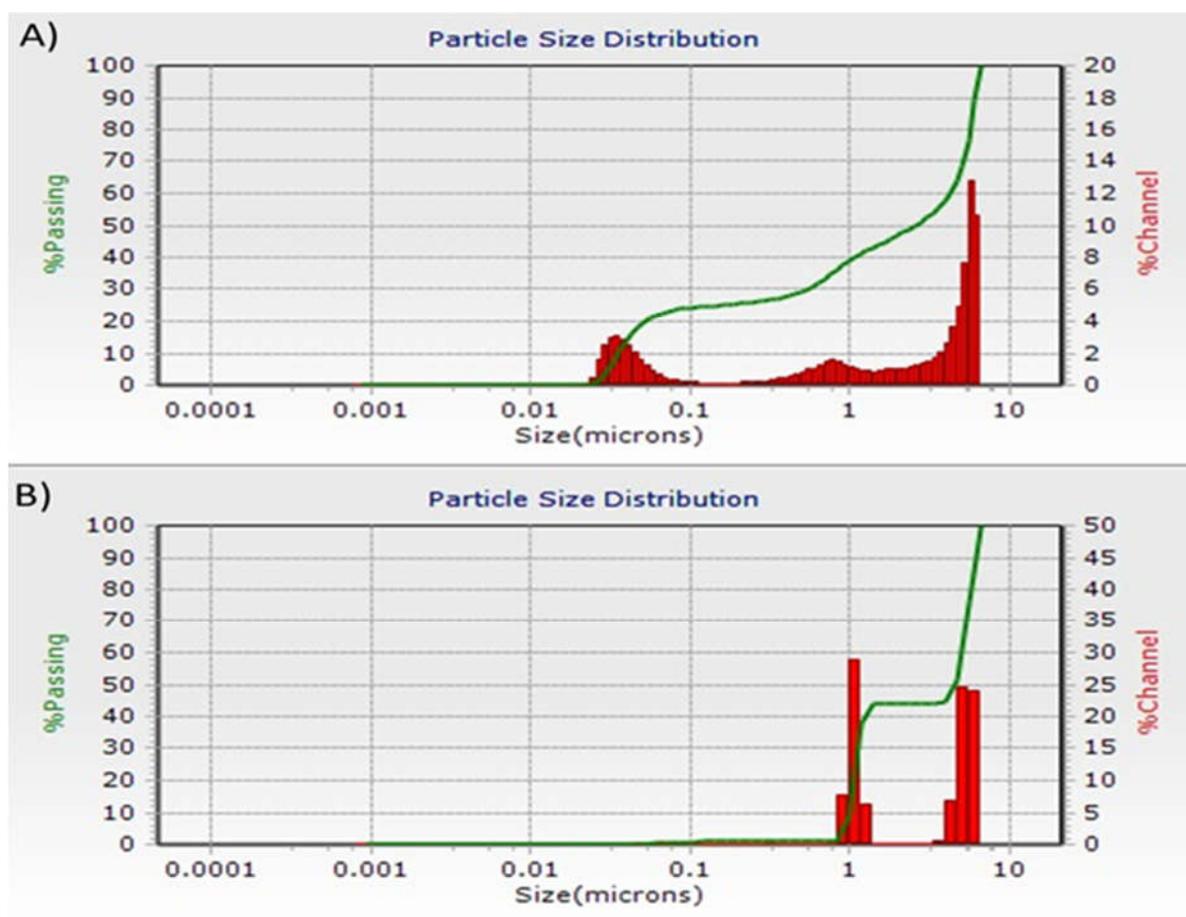


Figura 29. Distribución de tamaño de partícula para las fitonanopartículas de cobre de *P. juliflora* Sw., (A) y *P. sericea* Nutt (B) usando DLS.

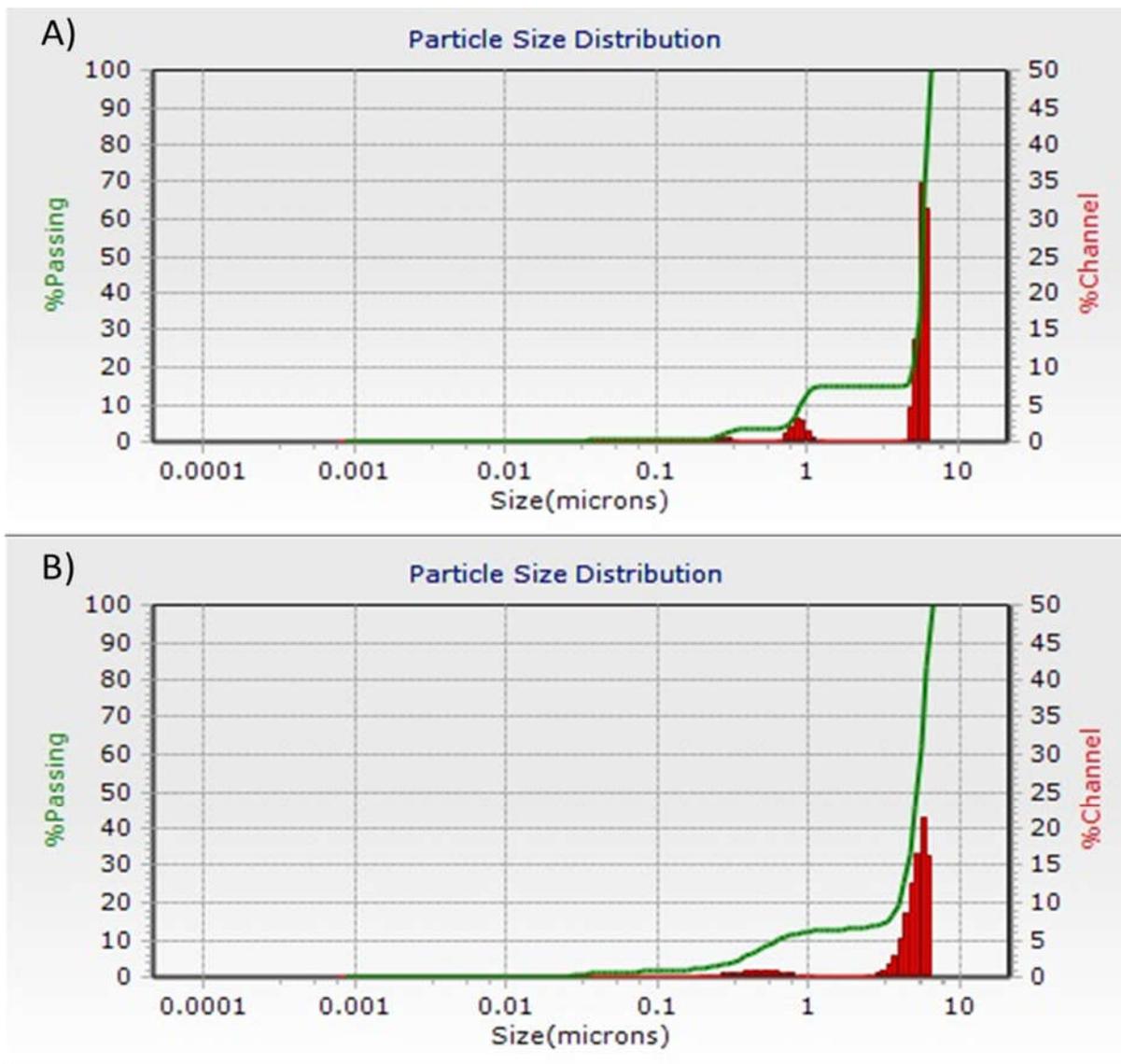


Figura 30. Distribución de tamaño de partículas usando DLS (dispersión dinámica de luz), de las fitonanopartículas de *P. juliflora* Sw de zinc (A), y fitonanopartículas de *P. seicea* Nutt (B).

### 8.3 Evaluación insecticida de las fitonanopartículas.

#### 8.3.1 Severidad en *Phenacoccus solenopsis* Tinsley.

La severidad se midió cada 24 horas durante cuatro días, para todos los tratamientos incluido el control; la severidad obtenida para el control a las 24 horas fue de 0%, a las 48 horas fue de 10%, en las 72 de 19% y a las 96 horas de 18%; para las fitoNPs-Zn de mezquite se observó mayor severidad a las 76 y 96 horas; en las fitoNPs-Cu de cachanilla se observó que la severidad más alta a las 96 horas, al igual que las fitoNPs-Cu de mezquite; siendo el tratamiento más severo las fitoNPs-Cu de cachanilla; observándose también una relación del tiempo con la severidad, pues al pasar más horas la severidad va en aumento (figura 31).

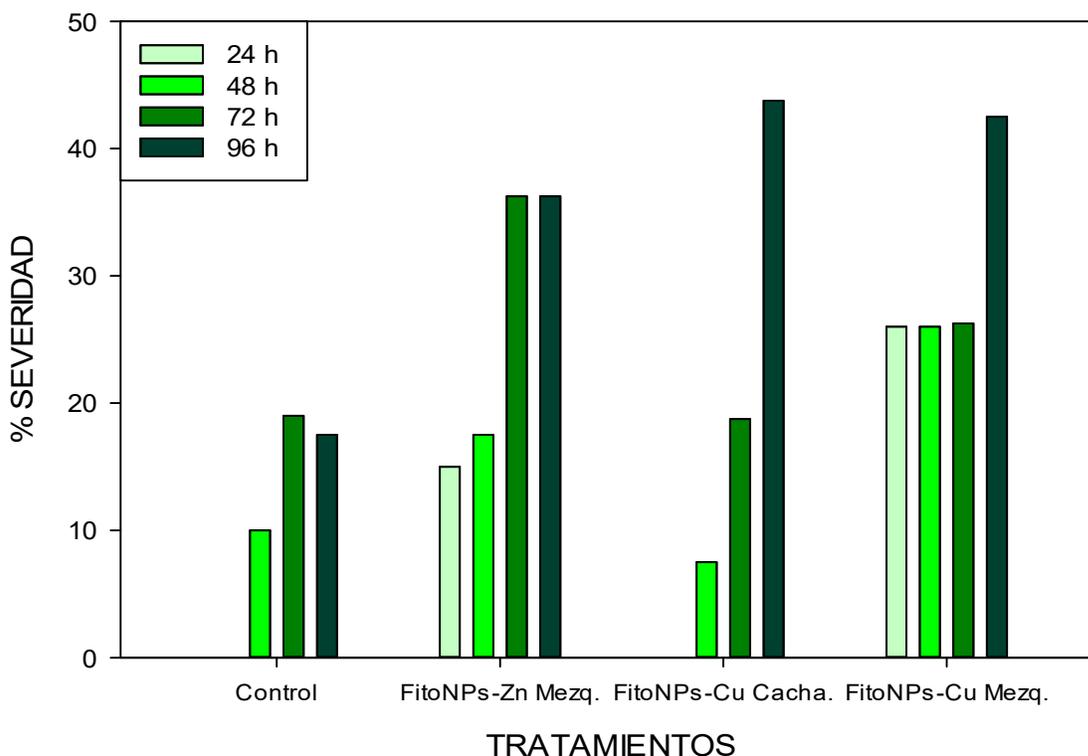


Figura 31. Porcentaje de severidad (SE) en horas y días de los tratamientos contra *P. solenopsis*.

La severidad promedio de cada tratamiento evaluado indicó que los insectos del grupo control y las fitoNPs-Cu de cachanilla tuvieron una severidad menor al 20%; para los insectos de los otros dos tratamientos la severidad promedio más alta se obtuvo con las fitoNP-Cu de mezquite (30.19%), seguido de las fitoNPs-Zn de

mezquite (26.25%); de lo cual el tratamiento más efectivo fue las fitoNPs-Cu de mezquite (figura 32). Por lo cual se realizó el análisis estadístico de estos resultados.

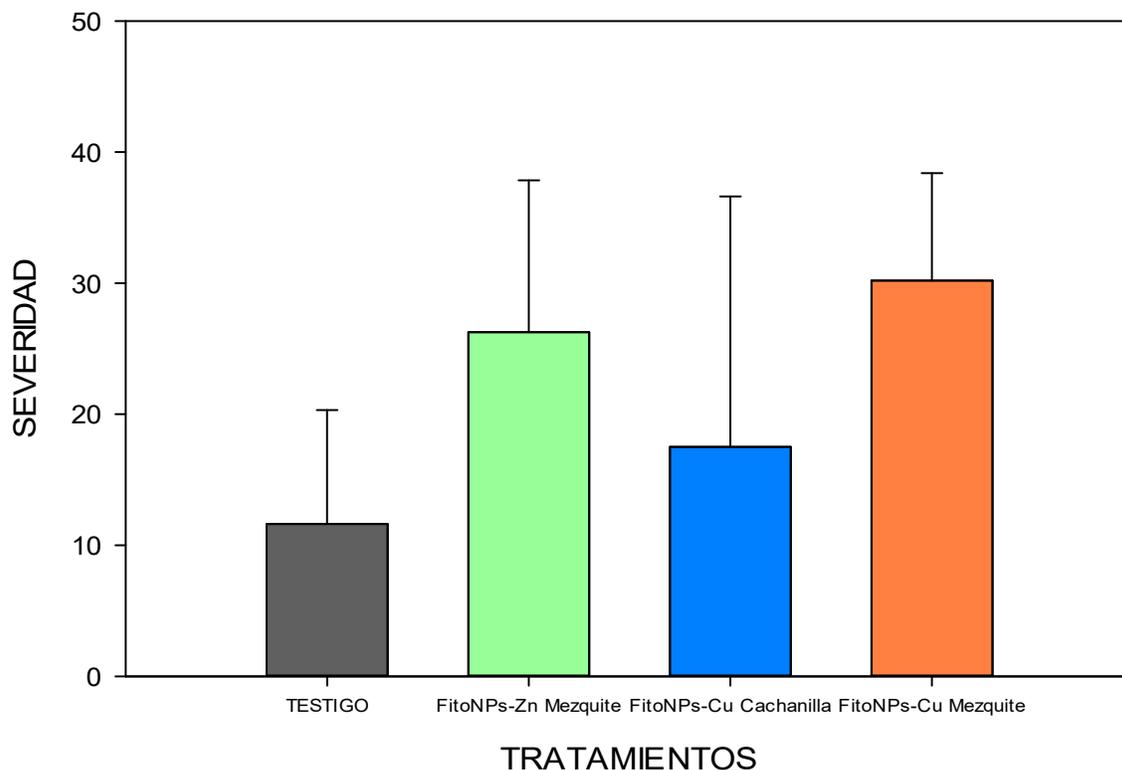


Figura 32. Promedios de severidad del grupo control y los tratamientos evaluados en *P. solenopsis* Tinsley.

### 9.3.1.1 Análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía).

Los datos tuvieron una distribución normal, y para comprobar que las varianzas de los tratamientos fueran diferentes se realizó la prueba de varianzas iguales con una  $p=0.05$  y se obtuvo una  $p=0,968$  que indica que las medias de los tratamientos no son estadísticamente diferentes, pero las medias entre tratamientos son estadísticamente diferentes con una  $p=0,022$ , por lo tanto se realizó una prueba con el método de Dunnett para comparaciones múltiples entre los tratamientos contra el grupo control, (cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación múltiple de los tratamientos contra el grupo control usando el método de Dunnett.

<b>Comparación</b>	<b>Dif. de Medias</b>	<b>q'</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
Control vs. FitoNPs-Cu M	17,000	3,537	0,016	Si
Control vs. FitoNPs-Zn M	14,500	3,017	0,036	Si
Control vs. FitoNPs-Cu C	6,000	1,248	0,490	No

Como resultado se obtuvo que las fitoNPs-Cu de mezquite ( $p=0.016$ ) y las fitoNPs-Zn de mezquite ( $p=0.036$ ), fueron los tratamientos más efectivos y causaron severidad o daño a *P. solenopsis* Tinsley, en comparación con las FitoNPs-Cu de cachanilla ( $p=0.490$ ) que no fue significativamente diferente al grupo control.

### **8.3.2 Viabilidad celular en *P. solenopsis* Tinsley.**

Los promedios obtenidos para el grupo control fue de 97.74% (fig. 34.a), para las fitoNPs-Zn de mezquite un 71.70% (fig. 34.b), las fitoNPs-Cu de cachanilla un 67.92% (fig 34.c), y finalmente las fitoNPs-Cu de mezquite (fig. 34.d) con una viabilidad celular de 56.60%, las cuales tienen el mayor daño celular, de acuerdo con el análisis estadístico que las establece como el mejor tratamiento para causar severidad a *P. solenopsis*, sin embargo, las fitoNPs-Zn de mezquite no presenta daño celular tan alto pero sí son el segundo mejor tratamiento para la severidad (figura 33).

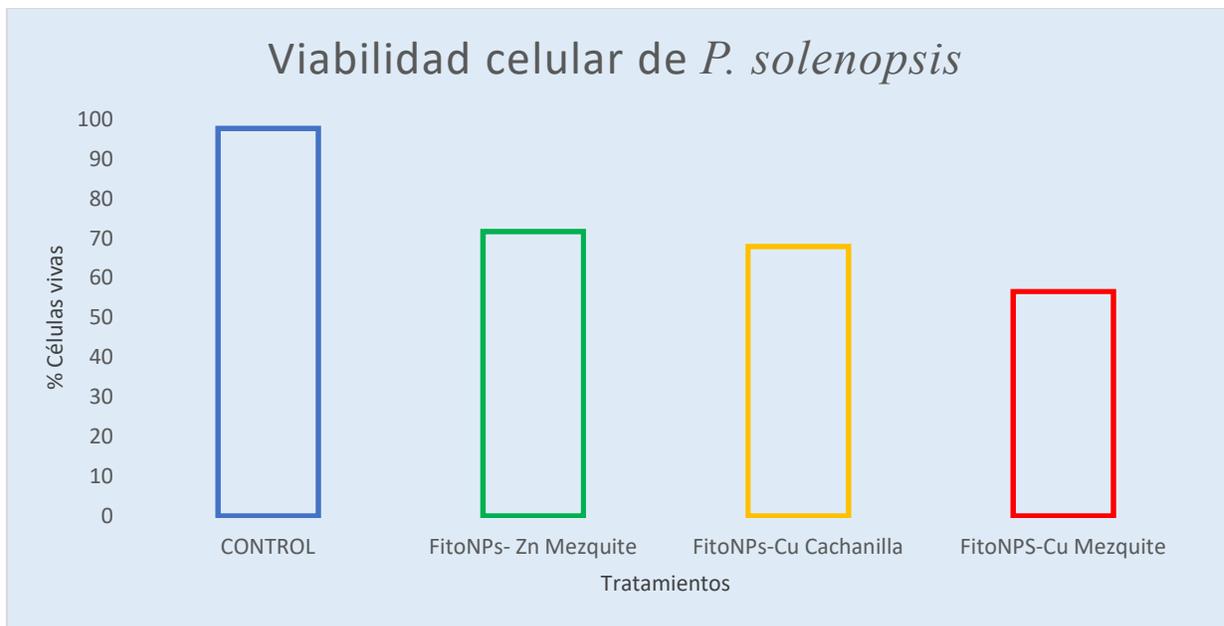


Figura 33. Orden descendente sobre la viabilidad celular de *P. solenopsis* Tinsley.

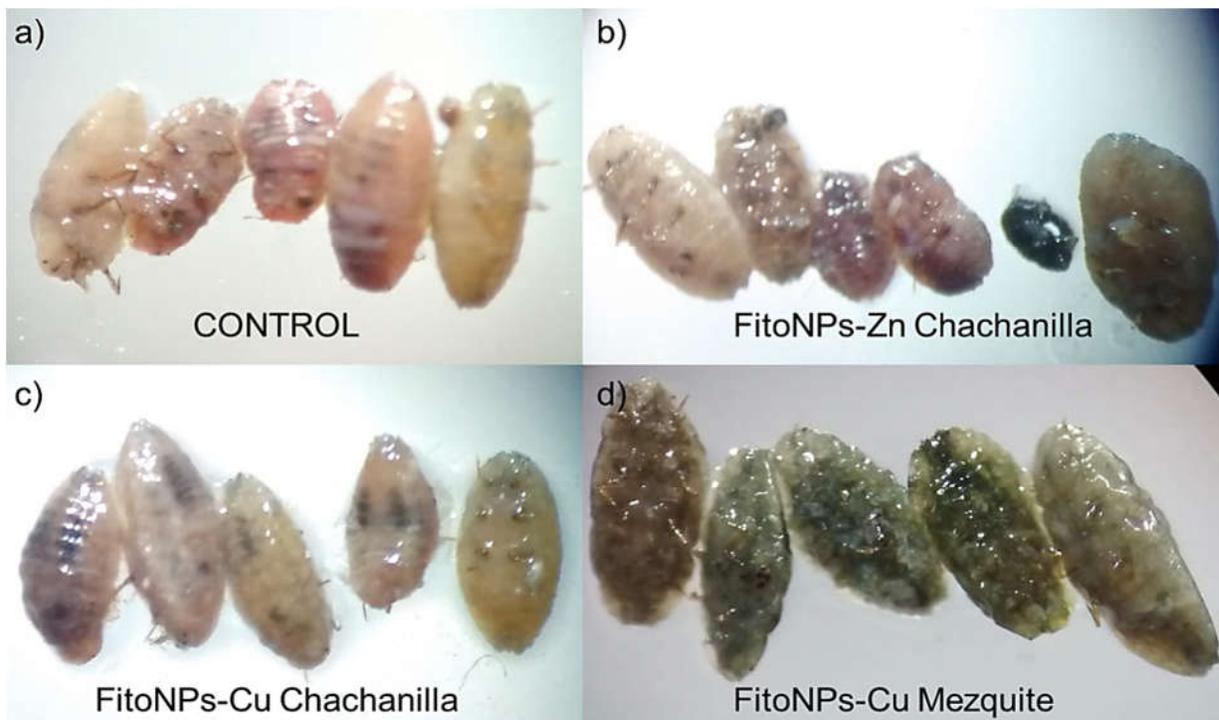


Figura 34. Alícuotas de cada tratamiento evaluado de *P. solenopsis* teñidos con azul de Evans.

También se observó durante el experimento la pérdida de la capa cerosa que recubre al insecto y cambios en su apariencia física debido a las fitonanopartículas (figura 35). Donde se observa la pérdida de la mayor parte de la capa cerosa en los tratamientos de fitoNPs-Zn de cachanilla, y cambios en el color del cuerpo de *P. solenopsis* en los tratamientos de fitoNPs-Cu mezquite y fitoNPs-Cu de cachanilla.



Figura 35. Muestras de *P. solenopsis* de los distintos tratamientos evaluados al finalizar el ensayo; control (A), fitoNPs-Zn cachanilla (B), fitoNPs-Cu Mezquite (C), fitoNPs-Cu cachanilla (D).

### 8.3.3 Mortalidad de *P. solenopsis* Tinsley.

La mortalidad para el grupo control a las 24 horas fue de 0%, y de 20% a las 48, 72 y 96 horas; para las fitoNPs-Cu de cachanilla una mortalidad a las 24 y 48 horas de 0%, pero de 20% a las 72 y 96 horas; con las fitoNPs-Zn de mezquite se tuvo una mortalidad de 10% en las primeras 24 horas, a las 48 hrs de 30% y para las 72 y 96 horas del 40%; y finalmente las fitoNPs-Cu de mezquite presentaron una mortalidad de 10% a las 24 horas, de 20% a las 48 y 72 horas, y de 30% a las 96 horas; lo cual indica que el tratamiento que presentó mayor mortalidad fueron los insectos tratados con las fitoNPs-Zn de mezquite con un promedio de 30% de mortalidad en contraste con los otros tratamientos y el grupo control (15%) que tuvieron una mortalidad igual al 20% en el caso de las fitoNPs-Cu de mezquite y menor a la del grupo control como las fitoNPs-Cu de cachanilla con un 10% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de Abbott cada 24 horas para *P. solenopsis* Tinsley de cada tratamiento y el control.

Tratamientos	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Promedio
CONTROL	0	20	20	20	15
FitoNPs-Zn mezquite	10	30	40	40	30
FitoNPs-Cu mezquite	10	20	20	30	20
FitoNPs-Cu cachanilla	0	0	20	20	10

Debido a que la mortalidad a las 48 horas en el grupo control rebasó el 20% y se mantuvo así durante todo el experimento, se procedió a utilizar la fórmula de Abbott corregida para ajustar los datos obtenidos de mortalidad; la cual mostró que el mayor porcentaje de mortalidad se obtuvo con las fitoNPs-Zn de mezquite con un promedio de 18.13%, seguido de las fitoNPs-Cu de mezquite con un 5.63%; sin embargo para las fitoNPs-Cu de cachanilla y el grupo control la mortalidad fue de 0% (cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad de Abbott corregida de *P. solenopsis* Tinsley para cada uno de los tratamientos.

Tratamientos	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Promedio
CONTROL	0	0	0	0	0
FitoNPs-Zn mezquite	10	12.5	25	25	18.13
FitoNPs-Cu mezquite	10	0	0	12.5	5.63
FitoNPs-Cu cachanilla	0	0	0	0	0

### 9.3.3.1 Análisis de varianza de la mortalidad de los tratamientos.

Los datos obtenidos del análisis para la mortalidad realizando la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, arrojó una  $p= 0.009$  lo que permite asumir que los grupos son de idénticas poblaciones; y para conocer cuál de los tratamientos es significativamente diferente, se realizó una prueba con el método de Dunnett para comparaciones múltiples entre los tratamientos contra el grupo control la cual dio los siguientes resultados (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación múltiple de los tratamientos contra el grupo control con el método de Dunnett.

<b>Comparación</b>	<b>Dif. de rangos</b>	<b>q'</b>	<b>P&lt;0,05</b>
FitoNPs-Zn mezquite vs control	34,000	3,334	Si
FitoNPs-Cu mezquite vs control	14,000	1,373	No
FitoNPs-Cu cachanilla vs control	10,000	0,000	No

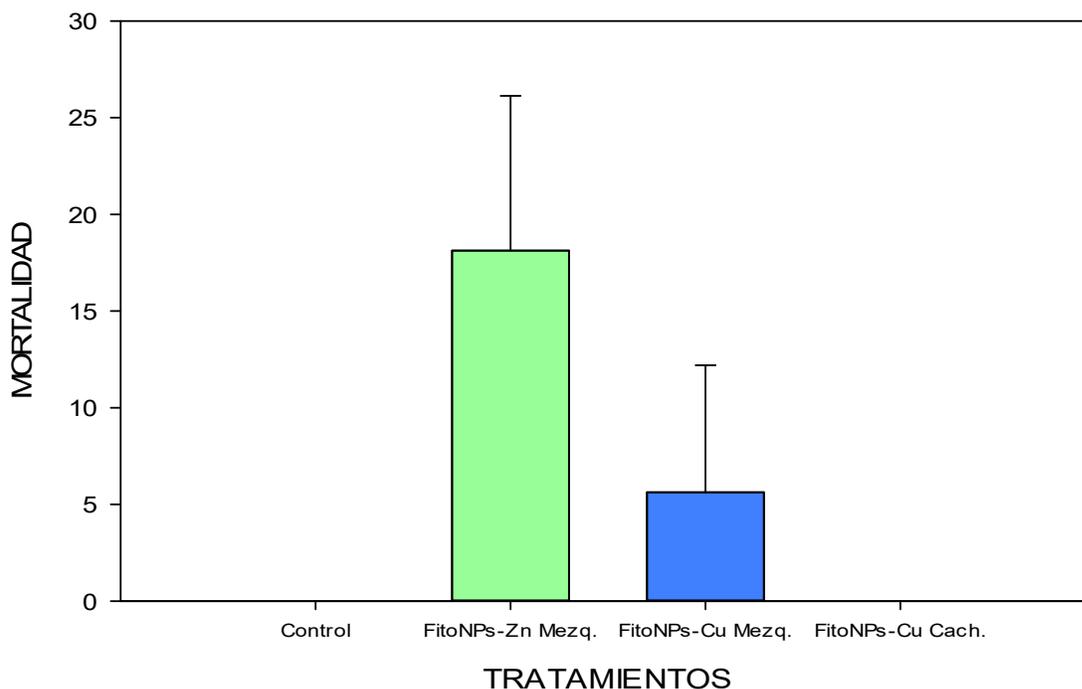


Figura 36. Promedio de la mortalidad corregida de los tratamientos evaluados contra *P. solenopsis* Tinsley.

En base a los resultados se puede apreciar que el tratamiento que presenta diferencias significativas al control fueron las fitoNPs-Zn de mezquite, las cuales presentaron mayor porcentaje de mortalidad corregida sobre *P. solenopsis* Tinsley;

para los tratamientos de fitoNPs-Cu de Mezquite y Cachanilla la mortalidad no fue significativa (Figura 36).

### 8.3.4 Análisis estadístico para determinar la relación de la mortalidad con la severidad y el tiempo.

Se realizó la prueba de Tukey de comparación múltiple para saber la relación de la mortalidad y la severidad respecto al tiempo.

Cuadro 10. Prueba de Tukey para mortalidad, severidad y tiempo, de todos los procedimientos de comparación múltiple por parejas.

<b>Comparación</b>	<b>Dif. de rangos</b>	<b>q</b>	<b>P&lt;0,05</b>
Severidad vs. Mortalidad	294,000	5 ,250	Si
Severidad vs. Tiempo	243,000	4,339	Si
Tiempo vs. Mortalidad	51,000	0,911	No

La mortalidad contra la severidad, y la severidad contra el tiempo son estadísticamente significativos debido a que presentan una  $p < 0.05$  (cuadro 10), pero el tiempo y la mortalidad no, ya que presenta una  $p > 0.05$ ; por lo tanto, la severidad influye en la mortalidad de los tratamientos contra *P. solenopsis* Tinsley, y el tiempo influye en la severidad que presentan los tratamientos, sin embargo, el tiempo no influye en la mortalidad.

### 8.3.5 Cuantificación de cobre en *Phenacoccus solenopsis* Tinsley.

La concentración promedio de cobre obtenida en los insectos del tratamiento control fue de 0.29 mg/L, para los insectos tratados con las fitoNPs-Cu de cachanilla de 1.07 mg/L y para aquellos tratados con las fitoNPs-Cu mezquite de 0.13 mg/L; sin embargo, la mortalidad de estas fitonanopartículas no fue estadísticamente significativa respecto al grupo control, pero en el caso de la severidad se observó que las fitoNPs-Cu de mezquite ( $p = 0.016$ ) fueron estadísticamente significativas y causaron la mayor severidad y daño celular en *P. solenopsis* (cuadro 8 y figura 36).

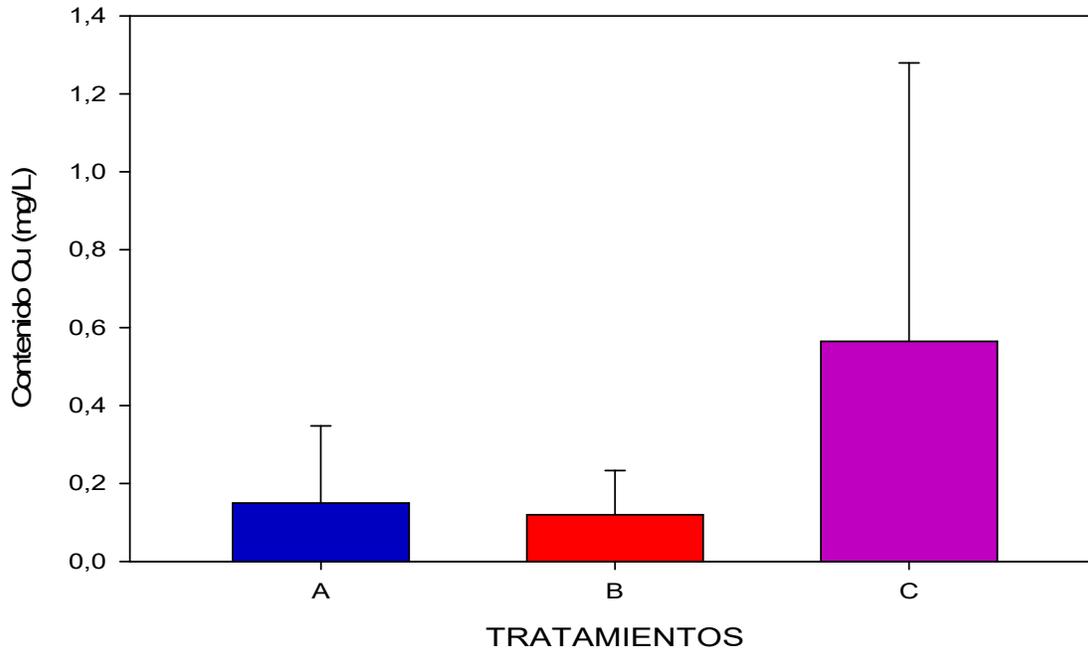


Figura 37. Concentración de cobre en *P. solenopsis* del tratamiento control (A) y las fitoNPs-Cu de mezquite (B) y bachanilla(C).

#### 8.4 Evaluación antimicrobiana de las fitonanopartículas.

##### 8.4.1 Inhibición bacteriana de las fitonanopartículas.

Se obtuvo la presencia o ausencia de halo inhibitorio a las 24 horas de siembra, para cada una de las tres cepas bacterianas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *B. cereus*), con los seis tratamientos establecidos.

##### 8.4.2 Análisis estadístico.

Al tener datos cualitativos de presencia o ausencia de inhibición de los tratamientos en las bacterias evaluadas, se realizó una tabla de contingencia para cada cepa bacteriana de dos filas por seis columnas (2x6) como se muestra en el cuadro 10; con la ayuda del programa SigmaPlot12, con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  y un valor crítico de  $X^2_{Tabla}=11.070$ , al llevarse a cabo la prueba de  $X^2$  ( $Chi^2$ ); para *E. coli* la prueba obtuvo una  $Chi^2=27.054$  con cinco grados de libertad y una  $p=0.001$ ; con *K. pneumoniae* se obtuvo una  $X^2=14.286$  y una  $p=0.014$ ; ambas bacterias tuvieron una “p” inferior al alfa ( $p=0.05$ ) y al comparar los valores de  $Chi^2$  obtenida con los valores de  $Chi^2$  de la tabla de distribución ( $X^2_{Tabla}=11.070$ ), permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, que indica que la presencia o ausencia de la

inhibición depende del tipo de tratamiento, y al menos uno o más de los tratamientos causan la inhibición; sin embargo en contraste la cepas de *B. cereus* se obtuvo una  $X^2=7.841$ , y una  $p=0.165$  mayor al alfa, por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula, con la cual la presencia u ausencia de los halos inhibitorios es independiente de los tratamientos evaluados.

Cuadro 11. Tablas de contingencia para cada cepa bacteriana evaluada con los tratamientos, para prueba de  $X^2$ .

<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>			<i>B. cereus</i>		
Tratamientos	Presencia	Ausencia	Tratamientos	Presencia	Ausencia	Tratamientos	Presencia	Ausencia
Cacha FitoNPs-Zn	7	3	Cacha FitoNPs-Zn	10	0	Cacha FitoNPs-Zn	8	2
Mezq FitoNPs-Zn	8	2	Mezq FitoNPs-Zn	9	1	Mezq FitoNPs-Zn	10	0
Cacha FitoNPs-Cu	6	4	Cacha FitoNPs-Cu	7	3	Cacha FitoNPs-Cu	7	3
Mezq FitoNPs-Cu	7	3	Mezq FitoNPs-Cu	3	7	Mezq FitoNPs-Cu	8	4
Extrac. Mezquite	0	10	Extrac. Mezquite	6	4	Extrac. Mezquite	5	5
Extracto de Cachanilla	0	10	Extracto de Cachanilla	7	3	Extracto de Cachanilla	6	4

Para determinar si los tratamientos con fitonanopartículas (fitoNPs) y los dos controles, y cuál de ellos fue el más efectivo al inhibir a las cepas bacterianas evaluadas, se realizó un análisis con la prueba de Kruskal-Wallis, para *E. coli* y *K. pneumoniae*. En el caso de *E. coli* se obtuvo una  $p=0.001$ , la cual indicó que las diferencias entre los valores de las medias de los tratamientos son mayores y existen diferencias significativas, y para determinar él o los tratamientos más efectivos se aplicó el método de Dunnett para la comparación múltiple contra los controles, que son los extractos acuosos de mezquite y cachanilla (cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados del programa SigmaPlot12 para el método de Dunnett de comparación múltiple de los tratamientos contra los controles para *E. coli*.

<b>Comparación</b>	<b>Dif. de rangos</b>	<b>q</b>	<b>P&lt;0,05</b>
FitoNPs Zn Mezq. vs Cacha	300,000	5,432	Si
FitoNPs Zn Mezq. vs Mezq	300,000	5,432	Si
FitoNPs Zn Cacha. vs Cacha	270,000	4,889	Si
FitoNPs Zn Cacha. vs Mezq	270,000	4,889	Si
FitoNPs Cu Mezq. vs Cacha	270,000	4,889	Si
FitoNPs Cu Mezq. vs Mezq	270,000	4,889	Si
FitoNPs Cu Cacha vs Cacha	210,000	3,803	No
FitoNPs Cu Cacha vs Mezq	210,000	3,803	No

Las fitoNPs-Zn de mezquite y cachanilla, y las fitoNPs-Cu de mezquite tienen una  $p < 0.05$  (de color verde, Cuadro 12), por lo cual son los tratamientos más efectivos para inhibir a *E. coli*. Las fitoNPs-Zn de cachanilla tuvieron un promedio de 6.82 mm de diámetro, las fitoNPs-Cu de mezquite tuvieron un promedio de 7.37 mm, y el promedio más alto se obtuvo con las fitoNPs-Zn de mezquite con un diámetro de 8.28 mm; por lo cual es el mejor tratamiento y es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) para inhibir a *E. coli* (figura 38).

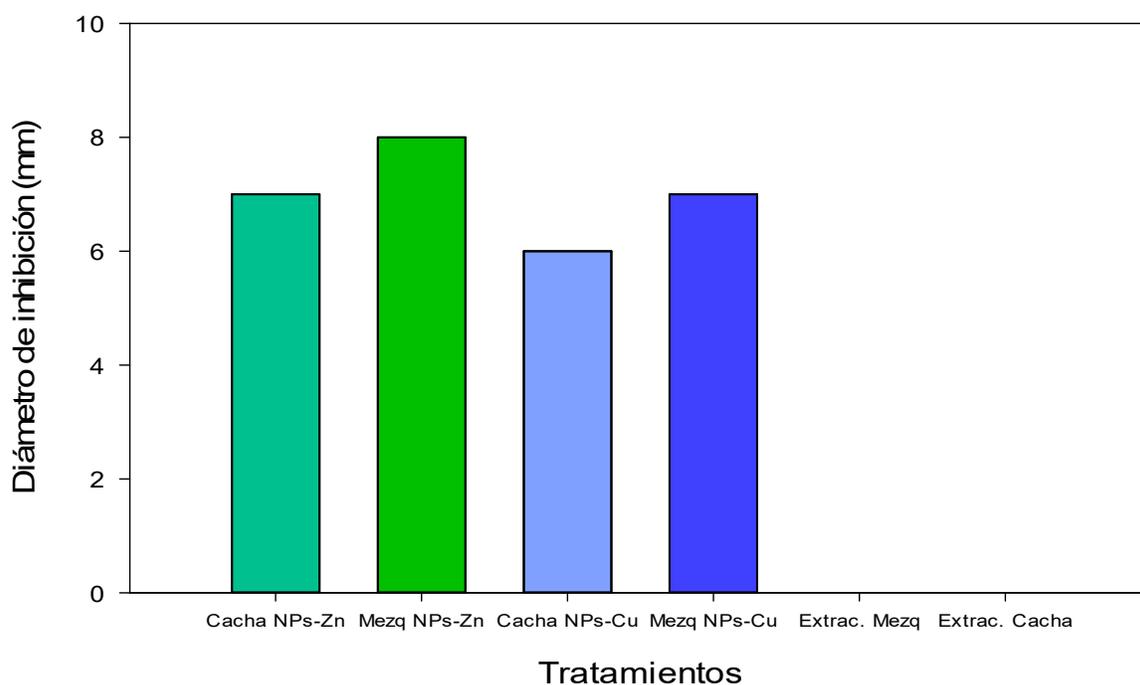


Figura 38. Promedios de diámetro de halo inhibitorio de cada tratamiento evaluado para *E. coli*.

En el caso de *K. pneumoniae* se obtuvo una  $p = 0.001$  con lo cual los valores de las medias de los tratamientos son significativamente distintos, se aplicó el método de Dunnett para determinar los tratamientos más efectivos (cuadro 13); en el cual el tratamiento que tuvo mejor resultado inhibiendo a esta bacteria (de color verde) fueron las fitoNPs-Zn de cachanilla con una  $p < 0.05$  comparándola con los controles y con un promedio de diámetro de inhibición de 10.31 mm, sin embargo, también la prueba refleja que las fitoNPs-Zn de mezquite son efectivas para inhibir a esta bacteria, pero al compararla con el grupo control de extracto acuoso de

mezquite no presentó significancia ( $p>0.05$ ) y su promedio de diámetro de inhibición fue de 9.36 mm. Con *Klebsiella pneumoniae* la inhibición se presentó en todos los tratamientos; el promedio más bajo se obtuvo con las fitoNPs-Cu de mezquite, seguida del control de extracto acuoso de mezquite, el control de extracto acuoso de cachanilla, y las fitoNPs-Cu de cachanilla, los cuales tienen un  $p>0.05$  (figura 39).

Cuadro 13. Resultados de la prueba de comparación múltiple con el método de Dunnett para las fitonanopartículas de Mezquite y Cachanilla contra los extractos acuosos para *K. pneumoniae*.

<b>Comparación</b>	<b>Dif. de rangos</b>	<b>q'</b>	<b>P&lt;0,05</b>
FitoNPs-Zn Ca vs Extracto Cac	210,000	3,221	Si
FitoNPs-Zn Me vs Extracto Cac	180,000	2,761	Si
FitoNPs-Cu Ca vs Extracto Cac	120,000	1,841	No
FitoNPs-Cu Me vs Extracto Cac	0,000	0,000	No
FitoNPs-Zn Ca vs Extracto Mez	180,000	2,761	Si
FitoNPs-Zn Me vs Extracto Mez	150,000	2,301	No
FitoNPs-Cu Ca vs Extracto Mez	90,000	1,381	No
FitoNPs-Cu Me vs Extracto Mez	30,000	0,460	No

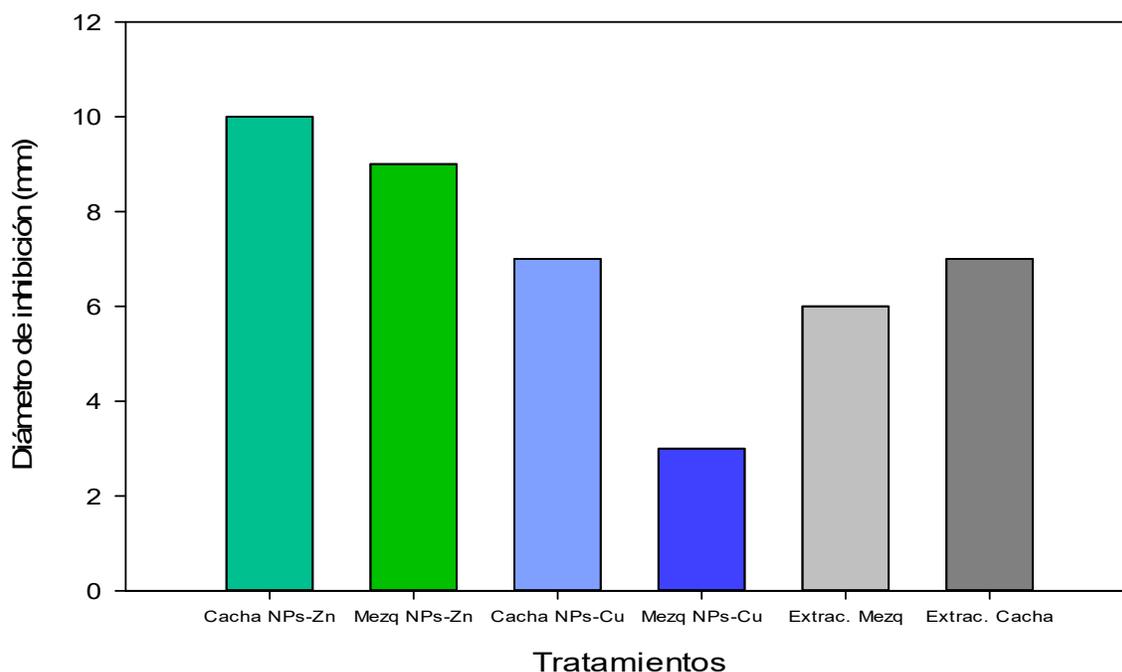


Figura 39. Promedios de diámetro de halo inhibitorio en cada tratamiento evaluado para *K. pneumoniae*

Con *B. cereus* la prueba de Kruskal-Wallis, dio una  $p=0.173$  mayor al alfa ( $p=0.05$ ), lo cual indicó que entre los valores de las medias de los tratamientos no existe diferencia estadística significativa, por lo cual las fitonanopartículas de mezquite y cachanilla, con los controles tienen el mismo efecto inhibitorio, no pudiéndose establecer él o los tratamientos más efectivos contra esta bacteria. Finalmente los promedios de inhibición más bajos se encontraron en cuatro de los tratamientos evaluados, el primero fue el control de extracto acuoso de cachanilla (7.16 mm), y muy cercanos en promedio de inhibición, el control de extracto acuoso de mezquite (7.21 mm) y las fitoNPs-Cu cachanilla (7.26 mm); finalmente las fitoNPs-Cu de mezquite (7.88 mm), que tuvieron un promedio de halo de inhibición por abajo de 8 mm; los dos tratamientos más altos en promedios de halos de inhibición fueron las fitoNPs-Zn de cachanilla (8.66 mm) y el más alto se encontró con las fitoNPs-Zn de mezquite (10.02 mm), (figura 40).

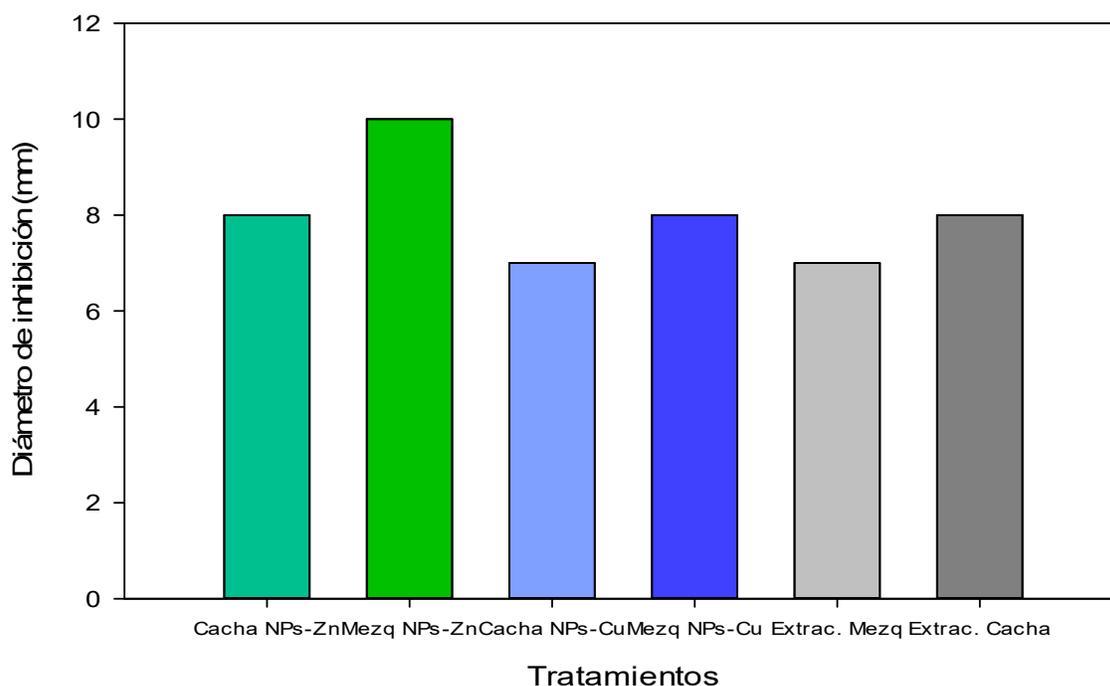


Figura 40. Promedios de diámetro de halo inhibitorio en cada tratamiento evaluado para *B. cereus*.

## X. DISCUSIÓN

### 10.1 Síntesis y caracterización de las fitonanopartículas.

La síntesis verde de fitonanopartículas con extractos acuosos de mezquite (*Prosopis juliflora* Sw.) y cachanilla (*Pluchea sericea* Nutt.) como agentes reductores de iones de cobre y zinc, es positiva, ya que se observa el cambio de coloración característico de la síntesis; las fitonanopartículas de cobre (fitoNPs-Cu) de mezquite y cachanilla tienen un color verde-azulado y verde pálido, respectivamente, concordando con los resultados en los experimentos realizados con *Sargassum vulgare* (González-Mendoza *et al.*, 2018) y *Yucca schidigera* (Ruíz-Romero *et al.*, 2018); en las fitonanopartículas de zinc (fitoNPs-Zn) de ambas plantas, se tiene un color blanco casi traslúcido, coincidiendo con los resultados de Saranya *et al.* (2017), donde las nanopartículas con este metal de extracto de *Zea mays* también son de color blanco transparente; este cambio de color presente en las nanopartículas se debe a la resonancia de plasmones de superficie del cobre y zinc (Honary *et al.*, 2012).

La síntesis de las fitonanopartículas de cobre y zinc de mezquite y cachanilla se confirmó por la espectroscopía UV-VIS, donde las fitoNPs-Cu de ambas plantas, presentan los picos de absorbancia a los 220 nm (mezquite) y 270 nm (cachanilla), contrastando con los resultados de Cheirmadurai *et al.* (2014), donde las nanopartículas de cobre obtenidas por síntesis verde, muestran una absorción máxima a 570 nm, pero al ser calcinadas, la banda del efecto plasmón cambia a 280 nm, debido a la transición de electrones de capas interiores a capas más externas del cobre, por lo cual las fitoNPs-Cu de mezquite y cachanilla tienen los electrones en las capas externas; con las fitoNPs-Zn de mezquite se observan tres picos a 200, 270 y 320 nm, y en las de cachanilla un pico a 225 nm, pero con mayor absorbancia (figura 22 y 23), resultados parecidos a los de Saranya *et al.* (2017), donde los picos se observan en las nanopartículas de zinc a 300 nm y 275-325 nm, y la mayor concentración de las sales metálicas influían en la formación de nanopartículas.

La morfología de las fitoNPs-Cu de mezquite y cachanilla es elipsoidal y esférica respectivamente (figura 24.A Y 24.B), similar a la forma esférica presente en las nanopartículas de cobre en tres especies de *Penicillium* (Honary *et al.*, 2012), las

fitoNPs-Zn de ambas plantas tienen forma esférica irregular (mezquite) y de una flor (cachanilla), sin embargo en el experimento de Gnanasangeetha y Sarala (2013), las nanopartículas de ZnO, contrastando con la forma obtenida por las fitoNPs-Zn de mezquite, lo cual posiblemente se debe a la sal empleada en la solución de metales, pues en esta investigación se utilizó sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ). En estudios previos de bio-reducción con plantas, se ha reportado la participación de grupos fenólicos, aromáticos y de ácidos carboxílicos, que intervienen en la estabilización de las nanopartículas (Kah, 2015; Chung *et al.*, 2016); por tanto, la bio-reducción de los iones de cobre y zinc a fitonanopartículas, puede deberse a los grupos fenoles, flavonoides y proteínas de acuerdo al análisis FTIR, sin embargo se requieren estudios más detallados acerca de la participación de los metabolitos de mezquite y cachanilla en la síntesis de fitonanopartículas metálicas, revelando el mecanismo para su formación. El tamaño de las fitoNPs-Cu es disperso con un promedio de 33.8 nm (mezquite) y de 68.10 nm (cachanilla); en las fitoNPs-Zn se tiene tamaños de partículas con un promedio de 51.25 nm a 53.44 nm para las de mezquite y cachanilla, Saranya *et al.* (2017) reportan un tamaño de nanopartículas de cobre y zinc de 137 nm y 69 nm respectivamente, siendo de tamaño menor las fitonanopartículas de mezquite y cachanilla, debido posiblemente al tiempo empleado en la síntesis.

## **10.2 Evaluación insecticida de las fitonanopartículas.**

Por otro lado, la resistencia que insectos tienen a plaguicidas, hace necesaria la búsqueda de alternativas para solucionar este problema. *Phenacoccus solenopsis* es un claro ejemplo de ello, por lo cual la evaluación de las propiedades insecticidas de las fitonanopartículas contra este insecto, obtuvo que *P. solenopsis* es más sensible conforme al tiempo de exposición a las fitoNPs-Cu y fitoNPs-Zn de mezquite ( $p < 0.05$ ). Además se comprobó que el mayor porcentaje de células muertas se encuentra en las fitoNPs-Cu de mezquite (0.13 mg/L), más baja respecto al grupo control y las fitoNPs-Cu de cachanilla; por lo cual es posible que otro de los componentes de las fitonanopartículas tuvieran efecto en la severidad, pues aunque el cobre es tóxico a altas concentraciones, al mismo tiempo es un elemento esencial

para animales terrestres, lo cuales tienen la habilidad de adaptarse a la exposición alta de este metal (Husak, 2015); el zinc es otro metal esencial para los animales, pero que a altas concentraciones puede causar daño histológico, pues aumenta la mortalidad en los insectos, que lo absorben por medio de sistema digestivo (Zamzam y Aziza, 2012), así como también afecta al metabolismo sobre la actividad de la enzima Cu-Zn-superóxido-dismutasa, la cual se encarga de oxidar y catalizar a los radicales libres causantes del estrés oxidativo (Husak, 2015), mientras que el zinc actúa como inhibidor, el cobre aumenta su actividad (Panda y Khan, 2004), lo cual podría explicar porque al tener menor concentración de cobre las fitoNPs-Cu de mezquite provocaron mayor efecto sobre el daño celular sobre *P. solenopsis*; y que el mejor tratamiento para causar mortalidad sobre el insecto sean las fitoNPs-Zn de mezquite; también el cobre oxida importantes biomoléculas como los lípidos, y junto a las saponinas como compuestos anfipáticos pueden inducir a la pérdida del recubrimiento ceroso de *P. solenopsis*, y el daño a la cutícula del insecto (figura 35), la cual puede ser atribuida a la exposición con las fitonanopartículas; resultados similares se han reportado por Yasur y Usha-Rani (2015) y Mao *et al.* (2018), quienes demuestran que la viabilidad celular decrece por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los insectos expuestos a nanopartículas de plata (50 a 500 ppm).

La mortalidad de los tratamientos no está relacionada con el tiempo, pero sí con la severidad, el tratamiento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) y con mayor porcentaje de mortalidad (cuadro 8), se tiene con las fitoNPs-Zn de mezquite, las cuales poseen un porcentaje de mortalidad de 30% y con la corrección de 18.13%, debido posiblemente al acumulación de zinc, provocando daño al metabolismo del insecto por su ingesta, de acuerdo al trabajo de Nursita, Singh y Lees (2005), y modificando la actividad antioxidante de enzimas capaces de controlar el estrés oxidativo (Husak, 2015); las saponinas presentes en las hojas de mezquite tienen propiedades insecticidas (Ibrahim *et al.*, 2013), y son consideradas generalmente como parte del sistema de defensa de las plantas, contra patógenos y herbívoros, pues tienen actividad hemolítica y citotóxica (Bazille *et al.*, 2013); al igual que los alcaloides presentes en las hojas de *P. juliflora* como juliprosopina y juliprosina, que

producen intoxicación en animales y citotoxicidad, la cual se caracteriza por alteraciones neuromusculares inducido por mecanismos que un no se comprenden (Silva *et al.*, 2013); características que se confirieren como propiedades insecticidas a las fitoNPs-Zn de mezquite.

### **10.3 Evaluación antimicrobiana de las fitonanopartículas.**

*E. coli*, *K. pneumoniae* y *B. cereus* son bacterias resistentes a antibióticos y provocan serios problemas de salud, se probaron las fitonanopartículas de mezquite y cachanilla de ambos metales, observando que todas las bacterias evaluadas presentan sensibilidad, teniendo mayor efecto sobre bacterias Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*), comparada con *B. cereus*, una bacteria Gram positiva en la cual si bien hay sensibilidad a las fitonanopartículas, en los controles la inhibición fue igual o más alta; resultados similares se encontraron en un experimento sobre la actividad antimicrobiana de nanopartículas obtenidas por extractos de plantas, en donde tanto las bacterias Gram positivas y Gram negativas son sensibles a estas, pero afectan más a las bacterias Gram negativas, posiblemente debido a la diferencia de las estructuras y composición de las membranas de las bacterias (Saranya *et al.*, 2017). Debido a que en las bacterias Gram negativas hay una membrana externa y una pared celular, donde la membrana externa está formada por fosfolípidos, proteínas y enzimas, que crean el potencial de membrana y se encarga de los mecanismos de transporte; la pared celular se compone de peptidoglucanos o mureína, la cual proporciona la rigidez a la bacteria y le da su forma, un espacio periplasmático que contiene una serie de enzimas hidrolíticas, proteínas de unión y sistemas de transporte de azúcares, y proteínas como las porinas que forman poros y permiten la difusión de moléculas hidrófilas, y otras que actúan como barrera ante los antibióticos hidrófobos (Mollinedo y González, 2014), lo cual provocaría que las fitonanopartículas entraran a través de la membrana externa por medio de los mecanismos de transporte, y por las porinas entrar al interior causando daño a la bacteria. Sin embargo, las bacterias Gram positivas tienen una pared celular gruesa compuesta de peptidoglucano y una membrana citoplasmática, ambas estructuras les confieren resistencia a los principios activos, unidas mediante moléculas de ácido lioteico (Lucana y Huanca, 2014). Por lo cual se observó

inhibición de las fitonanopartículas, y por los alcaloides y saponinas presentes en el extracto acuoso de mezquite y cachanilla, provocando así la sensibilidad de *B. cereus* a las fitonanopartículas.

Los tratamientos estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) y con mejor efecto antimicrobiano sobre *E. coli* y *K. pneumoniae* son las fitoNPs-Zn de mezquite y cachanilla y las fitoNPs-Cu de mezquite solo en *E. coli*; la capacidad antimicrobiana de las fitoNPs-Zn y de las fitoNPs-Cu, se debe a su forma y la funcionalización química, existen estudios que indican que los mecanismos de la actividad antimicrobiana de las fitonanopartículas se debe a que pueden penetrar a la membrana bacteriana causada por la disrupción de la misma (Zhu, Pathakoti y Hwang, 2019), a los alcaloides y saponinas presentes en el mezquite que son responsables de su actividad antimicrobiana (Muhammad *et al.*, 2013) y las propiedades presentes en los iones de cobre y zinc que potencializan agentes antimicrobianos (Zeelie, 1998). En el caso de las fitoNPs-Zinc, este metal juega un papel importante inhibiendo a enzimas encargadas de la oxidación de los radicales libres que provocan el estrés oxidativo (Husak, 2015); sin embargo, aunque con *B. cereus* no se tiene un tratamiento significativo, el promedio más alto de inhibición se obtienen con las fitoNPs-Zn de mezquite; con lo cual parecen ser más efectivos los iones de zinc junto a los alcaloides y saponinas de esta planta; que brindan propiedades antimicrobianas a las fitoNPs-Zn de mezquite permitiendo la inhibición de *E. coli* y *K. pneumoniae*, y que provocando sensibilidad en *B. cereus*.

## XI. CONCLUSIÓN

*Prosopis juliflora* Sw (mezquite) y *Pluchea sericea* Nutt (cachanilla) son plantas con la capacidad de generar metabolitos secundarios biológicamente activos susceptibles de convertirse en fitonanopartículas (fitoNPs) metálicas que aumentan su potencia y espectro biológico.

Los compuestos contenidos en los extractos acuosos del mezquite y cachanilla se transformaron en fitonapartículas estables de cobre y zinc mediante las técnicas de síntesis verde utilizando disoluciones de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  respectivamente. Las formas, colores y tamaños de las fitoNPs dependen del tipo de extracto y de la disolución metálica empleada. En general las fitoNPs de mezquite son más pequeñas que las de cachanilla en ambos metales (33.8 y 51.25 nm mezquite con Cu y Zn respectivamente vs 68 y 53.4 nm las de cachanilla). Las formas elipsoidales y esféricas de las fitoNPs estuvieron asociadas al cobre, mientras que las formas irregulares fueron generadas con la interacción del Zn.

En relación a las actividades biológicas ensayadas, las fitoNPs-Zn presentaron mayor efecto insecticida, incluyendo daño celular y mortalidad sobre *Phenacoccus solenopsis*, seguidas de las fitoNPs-Cu de esta planta pero sin mortalidad. Las fitoNPs-Zn de mezquite y cachanilla inhibieron a las tres bacterias evaluadas (*Bacillus cereus*, *Escheherichia coli*, y *Klebsiella pneumoniae*), convirtiéndolas en las partículas antimicrobianas más potentes del estudio. Estos resultados alientan a continuar explorando las propiedades biológicas y químicas de fitonanopartículas botánicas de estas y otras especies nativas.

## XII. REFERENCIAS DOCUMENTALES

Abbott, W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, Volumen 18, pp. 265-267.

Abdelmoteleb, A. *et al.*, 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pluchea sericea* a native plants from Baja California, Mexico and their potential application as antimicrobials. *Iranian journal of sciences and technology*, pp. 457-463.

Abdelmoteled, A., González Mendoza, D., Valdez Salas, B. & Grimaldo Juarez, O. 2018. Inhibition of *Fusarium solani* in transgenic insect-resistant cotton plants treated with silver nanoparticles from *Prosopis glandulosa* and *Pluchea sericea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), p. 4.

Afzal, M. *et al.*, 2015. Genetics and preliminary mechanisms of chlorpyrifos resistance in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, Volumen 119, pp. 42-47.

Afzal, M. & Shad, S. A. 2015. Resistance inheritance and mechanism to emamectin benzoate in *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae).. *Crop Protection Journal*, Volumen 71, pp. 60-65.

Ail-Catzim, C. E. *et al.* 2015. Efecto insecticida y repelente de extractos de *Pluchea sericea* (Nutt.) sobre adultos de *Bemisia tabaci* (Genn.). *Chapingo Serie Horticultura*, 21(1), pp. 31-41.

Arellano Aguilar, O. & Rendón von Osten, J. 2016. *La huella de los plaguicidas en México.*, Ciudad de México: Greenpeace.

Arif, M. I., Rafiq, M. & Ghaffar, A. 2009. Host plants of cotton mealybug (*Phenacoccus solenopsis*): A new menace to cotton agroecosystem of Punjab, Pakistan. *International Journal of agriculture and biology*, 11(2), pp. 163-167.

Arya, S. K. *et al.* 2018. De novo characterization of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley transcriptome and analysis of gene expression profiling during development and hormone biosynthesis. *Scientific reports*, 8(1), p. 7573.

Ávila Morales, G. *et al.* 2017. Biosynthesis of silver nanoparticles using Mint leaf extract (*Mentha piperita*) and their antibacterial activity. *Advances Science Engineering and Medicine.*, 9(11), pp. 914-923.

Ball, P., 2004. Synthetic biology for nanotechnology. *Nanotechnology*, 16(1), p. R1.

Barraza-García, G. *et al.* 2013. La microespectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), pp. 125-148.

Bazille, D. *et al.* 2013. Saponinas. En: CIRAD, ed. *Estado del arte de la quinua en el mundo en el 2013*. Santiago de Chile: FAO, pp. 317-330.

Bengoechea, J. A. & Pessoa, J. S. 2019. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology reviews*, 43(2), pp. 123-144.

Bernado Mazariegos, E. A. 2018. *Efectividad biológica de fitonanopartículas de Justicia spicigera en hongos de importancia agrícola*. Tesis de Licenciatura. Instituto tecnológico de Tuxtla. Tuxtla Gutiérrez.

Bolívar, K. *et al.* 2009. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz&Sacc. y de la antracnosis de frutos de mango.. *UDO Agrícola*, 9(1), pp. 175-181.

Bottone, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen.. *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 382-398.

Briggs, B. D. & Knecht, M. R. 2012. Nanotechnology: Meets Biology: Peptide-based methods for the fabrication of functional materials. *The journal of physical chemistry letter*, 3(3), pp. 405-418.

Bryce, A. *et al.* 2016. Global prevalence of antibiotic resistance in pediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and associated with routine use of antibiotics in primary care: Systematic review and metaanalysis.. *The BMJ*, p. 939.

CABI, 2019. *Invasive species compendium*. [En línea] <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109097>. Consultado el 14 Mayo de 2019.

Cabrera, C. E., Gómez, R. F. & Zuñiga, A. E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación.. *Colombia Medica*, 38(2), pp. 149-154.

Cheik, A. *et al.* 2017. Evolution of consumption of three antibiotics classes and of the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to these classes. *European association of hospital pharmacists*, 24(1), p. 0.

Cheirmadurai, K., Biswas, S., Murali, R. & Thanikaivelan, P. 2014. Green synthesis of copper nanoparticles and conducting nanocomposites using plant and animal sources. *RSC Advances Journal*, Volumen 4, pp. 19507-19511.

Chen, L. *et al.*, 2011. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene (black\_KPC) variants. *Journal clinical microbiology*, 49(2), pp. 579-585.

Chon, J. W. *et al.* 2012. Toxin profile, antibiotic resistance and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food microbiology*, 32(1), pp. 217-222.

Chung, I. M. *et al.*, 2016. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles, their characteristic properties and therapeutic applications. *Nanoscale Research letter.*, Volumen 25, pp. 12324-12341.

CONABIO, 2008. *Naturalista*. [En línea] <https://www.naturalista.mx/taxa/48059-Prosopis-juliflora>. Consultado el 9 de Agosto de 2019.

Cowan, S. T., Steel, K. J., Shaw, C. & Duguid, J. P. 1960. A classification of *Klebsiella* group. *Gen Microbiology*, Volumen 23, pp. 601-612.

De Kraker Marlieke, E., Davey , P. & Grundmann, H. 2011. Mortality and Hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLOS Med*, p. P.E 1001104.

Devon, F., Desai, S. & Kelty, C. 2007. The history of nanotechnology. *Rev. Connexions*, 5(1), pp. 1-15.

Espinosa, V. D., González, M. D., Placencia de la Parra, J. & García Espinosa, R. 2004. Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo. en el sistema radical de plantulas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intradices*. *Terra Latinoamericana*, 22(3), pp. 317-326.

Fand Babasaheb, B. & Suroshe Sachin, S. 2015. The invasive mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. a threat to tropical and subtropical agricultural and horticultural production systems- A review. *Crop Protection*, Volumen 69, pp. 34-43.

FAO, F. a. D. A., 1980. *Recommended method for measurement of test resistance to pesticide*, Roma: Plant production and protection paper.

Flora, S. D., 2011. *Southwest Desert Flora*. [En línea] [http://southwestdesertflora.com/WebsiteFolders/All\\_Species/Asteraceae/Pluchea\\_sericea.html](http://southwestdesertflora.com/WebsiteFolders/All_Species/Asteraceae/Pluchea_sericea.html). Consultado el 31 de Agosto de 2019.

Furtula, V. *et al.*, 2010. Veterinary pharmaceuticals and antibiotics resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. *Poultry Science*, 81(1), pp. 180-188.

Gallaber, T. & Merlin, M. 2010. Biology and impacts of pacific island invasive species *Prosopis pallida* and *Prosopis juliflora* (algarroba, mezquite, kiawe) (Fabaceae). *Pacific Science*, 64(4), pp. 489-526.

García, P. C. 2003. Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Revista Chilena de Infectología*, 20(1), pp. 11-23.

Gnanasangeetha, D. & Sarala, T. D. 2013. One Pot synthesis of Zinc Oxide nanoparticles via Chemical and Green method. *Research Journal of material sciences*, 1(7), pp. 1-8.

González Arias, C. *et al.* 2010. Patron de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Int. Contam. Ambient*, 26(3), pp. 1-9.

González-Mendoza, D. *et al.* 2018. Antimicrobial effects of silver-Nanoparticles from *Sargassum vulgare* against Spoilage of fresh vegetables by *Bacillus cereus*, *Fusarium solani* and *Alternaria alternata*. *International journal of agriculture and biology*, 0(0), p. 201x.

Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. N. & Smith, N. R. 1973. *Escherichia*. New York: Us department of Agriculture Handbook.

Gutiérrez Wing, C. E. 2006. Las nanopartículas: Pequeñas estructuras con gran potencial, ¿Por qué?, ¿Qué aplicaciones tienen?. *El Inin hoy, Contacto Nuclear*, pp. 24-29.

Gutiérrez-Praena, D. *et al.* 2009. Nuevos riesgos tóxicos para la exposición a nanopartículas. *Toxicología*, 26(2), pp. 87-92.

Hernández-Sierra, J. F. *et al.* 2008. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 4(3), pp. 237-240.

Hodgson, C. *et al.* 2008. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccidea: Pseudococcidae) an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India with a discussion on seasonal morphological variation. *Zootaxa*, pp. 1-35.

Honary , S., Barabadi, H., Gharaeifathsbad, E. & Naghibi, F. 2012. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseus*, *P. citrinium* and *P. waksami*. *Digests Journal of Nanomaterials and biostructures.*, 7(3), pp. 999-1005.

Hues Steren, M. & Lovejoy, L. 2008. Ultratrace impurity analysis of wafer surface. En: *Handbook of silicon wafer cleaning technology*. Ney York: Willian Andrew, pp. 619-657.

Husak, V. 2015. Copper and copper-containing pesticides: Mestabolism, toxicity and oxidative stress. *JPNV scientific journal*, 2(1), pp. 38-50.

Hussain, H. *et al.* 2013. The genus *Pluchea*: phytochemistry traditional uses and biological activities. *Chemestri & Biodiversity*, 10(11), pp. 1944-1971.

Ibrahim, M., Aladir M, A. A., Ahmad, V. U. & Rasheed, M. 2013. Phytochemical analyses of *Prosopis juliflora* (SW) DC. *Pakistan Journal of Botani*, 46(6), pp. 2101-2104.

Iravani, S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green chemistry*, 13(10), pp. 2638-2650.

Jauregui, F. *et al.* 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9(1), p. 560.

Jeeranandam, J. *et al.* 2018. Review of nanoparticles and nanostructure materials: history and regulations. *Beilstein Journal of nanotechnology*, Volumen 9, pp. 1050-1074.

Kah, M. 2015. Nanopesticides and nanofertilizers: emerging contaminants or opportunities for risk mitigation?. *Frontiers in Chemistry*, Volumen 3, pp. 1-6.

Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, pp. 3-24.

Kidd, T. *et al.* 2017. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. *EMBO Molecular Medicine*, 15 Febrero, 9(4), pp. 430-447.

Kissa, E. 1999. Radiation scattering. En: *Dispersions, characterization, testing and measurement*. New York: Marcel Dekker, pp. 449-492.

Kliot, A. & Ghanim, M. 2012. fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management science*, 68(11), pp. 1431-1437.

Ko, W.-C. *et al.* 2002. Community Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia global difference in clinical patterns. *Emerging infections diseases*, 8(2), pp. 160-166.

Liu, A. *et al.* 2009. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: Generating an antibiotic barcode. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 54(4), pp. 1393-1403.

Liu, Y. *et al.* 2016. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* grup.. *Scientific Reports*, Volumen 5, p. 14082.

Lucana, N. & Huana, R. M. 2014. Estructura Bacteriana. *Actualización clinica Investiga*, Volumen 49, p. 2589.

Manrique Correa, H. C. 2009. Aplicación de nanotecnología en la industria textil colombiana. *Virtual Pro*, 11(2), pp. 18-28.

Mao, B. H., Cheng, Z. Y., Wang, Y. J. & Yan, S. J. 2018. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated estress responses. *Scientific Reports*, Volumen 8, p. 2445.

Martínez, J. *et al.* 2004. How gen sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *International Microbiology*, Volumen 7, pp. 261-268.

Masieu Trigo, Y. 1991. Plaguicidas y biotecnología: El poder multinacional. *Sociologia*, 6(16).

May, A. 2005. Review of current consepts on covergence of nanotechnology with biology. *Tissue engineering*, Volumen 18, p. 19.

Maye, B. & Guzmán, M. 1984. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*, pp. 112-120.

Mendoza, U. G. & Rodríguez López, J. L. 2007. La nanociencia y la nanotecnologia: Una revolución en curso. *Perfiles latinoamericanos*, 14(29), pp. 161-186.

Mollinedo, M. A. & Gónzales, C. 2014. Bacterias Gram negativas. *Revista de actualización clinica Investiga*, Volumen 49, p. 2609.

Muhammad, I. y otros, 2013. Phytochemical analyses of *Prosopis juliflora* Swartz DC.. *Pakistan Journal of Botany*, 45(6), pp. 2101-2104.

Nataro, J. P. & Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), pp. 142-201.

Navon-Venezia, S., Kondratyeva, k. & Carattoli, A. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a mayor worldwide source and shutte for antibiotic resistance.. *FEMS Journal Microbiology reviews*, 41(3), pp. 252-275.

Nursita, A. I., Singh, B. & Lees, E. 2005. The effects of cadmiun, copper, lead and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tulberg (Collembola).. *Ecotoxicology and environmental Safety.*, 60(3), pp. 306-314.

Nuspl, M. *et al.* 2004. Qualitative and quantitative determination of microinclusions by automated SEM/EDX analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 379(4), pp. 640-645.

NYBG, 1999. *New York Botanical Garden*. [En línea] [http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen-list/?DarScientificName=Prosopis%20juliflora%20\(Sw.\)%20DC.&rownum=76](http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen-list/?DarScientificName=Prosopis%20juliflora%20(Sw.)%20DC.&rownum=76)

Consultado el 9 de Agosto de 2019.

Organji, S. *et al.* 2015. Occurence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infanr feces. *Asian Pacific Journal of tropical biomedicine*, 5(7), pp. 515-520.

Owusu-Kwarteng, J. *et al.* 2017. Prevalance, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from diary farms and traditional dairy products. *BMC Microbiology*, 17(1), p. 65.

Panda, S. K. & Khan , M. H. 2004. Changes in groth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Brazil Journal plant physiology*, 16(2), pp. 1677-9452.

Pasecznik, N. M., Harris, P. C. & Smith, S. J. 2004. Identifying tropical *Prosopis* species an field guied. *Coventry: HDRA Publishing*, p. 0.

Pérez-Portoundo, I., Orbera-Ratón, T. & Tamayo-Núñez , J. L. 2011. Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* a partir de dos variantes de arroz comercial. *CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), pp. 139-134.

Poole, C. P. & Owens, F. J. 2003. *Introducción a la nanotecnología*. New York: Wiley-Interscience.

Raghavendra, M. P., Satish, S. & Raveesha, K. A. 2009. Alkaloid extracts of *Prosopis juliflora* (SW) DC. (Mimosaceae) against *Alternaria alternata*. *Journal of Biopesticides*, 2(1), pp. 56-59.

Raja, K., Saravanakumar, A. & Vijakumar, R. 2012. Efficient synthesis of silver nanoparticles from *Prosopis juliflora* leaf extract and its antimicrobial activity using sewage. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular spectroscopy*, Volumen 97, pp. 490-494.

Ruiz-Romero, P., Valdez-Salas, B., González-Mendoza, D. & Mendez-Trujillo, V. 2018. Antifungal effects of silver Phytonanoparticles from *Yucca shilerifera* against Strawberry Soil-Borne Pathogens: *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiology*, 46(1), pp. 47-51.

Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, Volumen 3, pp. 7-19.

Saddiq, B. *et al.* 2014. Resistance in the mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae) in Pakistan to selected organophosphate and pyrethroid insecticides. *Crop protection*, Volumen 66, pp. 29-33.

Saéñz, Y. *et al.* 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of antimicrobial Agents*, 18(4), pp. 353-358.

Sánchez Mejía, Y., Cabrera Cruz, N., Toledo Fernández, A. M. & Duany Machado, O. J. 2009. La nanotecnología y sus posibles aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista cubana de salud pública*, 35(3), pp. 1-8.

Saranya , A. *et al.* 2017. Green synthesis of metallic nanoparticles using aqueous plant extract and their antibacterial activity. *International Journal of current microbiology and applied sciences*, 6(6), pp. xx-xx.

Sarikaya, M. *et al.* 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature materials*, 2(9), pp. 577-585.

Shah, R. K., Forishmeeta, B. & Nikanat, P. 2015. Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles using leaf extract of *Camellia sinesis* and evaluation of their antimicrobial efficacy. *International Journal of current microbiology and applied sciences.*, 4(8), pp. 444-450.

Silva González, A., Lagunes T., A., Rodríguez, C. & Rodríguez, D. 2012. Insecticidas vegetales: Una ventaja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de plagas y Agroecología*, Issue 66, pp. 4-12.

Silva , V. D. *et al.* 2013. Juliprosine and julisporine from *P. juliflora* leaves induce mitochondrial damage and cytoplasmotic vacuolation on ccultured glial cell and neurons. *Chemical journal of toxicology*, Issue 12, pp. --.

Silva-Aguayo, G., González-Gómez, P., Hepp-Gallo, R. & Casals-Bustos, P. 2004. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsk. con polvos inertes. *Agrociencia*, 38(5), p. 531.

Sussmann, O., Mattos, L. & Restrepo, A. 2002. Resistencia Bacterina. *Univ Med*, 43(1), pp. 20-26.

Toledo Salas, A., Hernández Pimentel , M. V., Rodríguez Tovar, A. V. & Guerrero Zuñiga, L. A. 2018. Evaluación del efecto de Cadmio sobre la actividad de Fenoloxidasa de tejido calloso de *Epihelantra micronensis* inoculado con Rizobacterias. *Informes de Contaminacion Ambiental*, 34(4), pp. 725-735.

Tolochko, N. K. 2009. History of nanotechnology; encyclopedia of life support system. *EOLSS*, p. 0.

Usman , M. S. *et al.* 2013. Synthesis, characterization and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International Journal Nanomedicine*, Volumen 8, pp. 4467-4479.

Villaseñor, J. L. & Villarreal, J. Á. 2006. El género *Pluchea* (Familia: Asteraceae, Tribu *Pluchea*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77(1), p. 0.

Walk , S. T. y otros, 2009. Cryptic lineages of genus *Escherichia*. *Applied and environmental microbiology*, 75(20), pp. 6534-6544.

Waqas, M. S. *et al.* 2019. Reproductive mode and male mating characteristic of *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 51(1), pp. 325-331.

Welch, R. A. 2006. The genus *Escherichia*. *The prokaryotes*, Volumen 6, pp. 60-71.

Yasur, J. & Usha-Rani, P. 2015. Lepidoptera insect susceptibility to silver nanoparticles and measurements of changes in their growth, development and physiology. *Chemosphere*, Volumen 124, pp. 92-102.

Yim, J. H. *et al.* 2015. Incidence, antibiotic susceptibility and toxin profiles of *Bacillus cereus sensu lato*, Isolated from Korean Fermentated Soybean Products. *Journal of food science*, 80(6), pp. 1266-1270.

Zamzam, M. A.-D. & Aziza, S. 2012. Effect of zinc sulfate against palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* with reference to their histological change on the larval midgut and adult reproductive system. *Journal of agricultural science and technology*, pp. 888-900.

Zanella, R. 2012. Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), pp. 69-81.

Záyago Lau, E. & Foladori, G. 2009. La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Economía, sociedad y territorio*, 10(32), pp. 143-178.

Zeelie, J. 1998. Effects of copper and zinc ion on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidon-iodine. *Analyst*, Issue 123, pp. 503-507.

Zeigler, D. R. & Perkins, J. B. 2015. *Practical handbook of microbiology*. New York: CRC Press.

Zhu, X., Pathakoti, K. & Hwang, H. M. 2019. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles and their usage for antimicrobial application and environmental remediation. En: Elsevier, ed. *Green synthesis characterization and applications of nanoparticles*. New York: Elsevier, pp. 223-263.

## XIII. ANEXOS

### Anexo 1.

Artículo  
Article

www.biotaxa.org/RSEA. ISSN 1851-7471 (online) Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 78(2): 12-21, 2019

#### Synthesis and insecticide activity of Cu-nanoparticles from *Prosopis juliflora* (Sw) DC and *Pluchea sericea* (Nutt.) on *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)

LEÓN-JIMENEZ, Eugenia<sup>1,2</sup>, VALDÉZ-SALAS, Benjamín<sup>3</sup>, GONZÁLEZ-MENDOZA, Daniel<sup>1,\*</sup> & TZINTZUN-CAMACHO, Olivia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC), Ejido Nuevo León, Baja California, México. \* E-mail: danieg@uabc.edu.mx

<sup>2</sup>Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Colonia Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chi., México.

<sup>3</sup>Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.

Received 19 - I - 2019 | Accepted 01 - IV - 2019 | Published 27 - VI - 2019

<https://doi.org/10.25095/rsea.780202>

#### Síntesis y actividad insecticida de nanopartículas de Cu de *Prosopis juliflora* (Sw) DC y *Pluchea sericea* (Nutt.) sobre *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)

**RESUMEN.** *Phenacoccus solenopsis* es una especie agresivamente invasiva e invasora en plantas de algodón en varios países. Se investigó el efecto pesticida de nanopartículas de cobre, sintetizadas a partir de extracto de hoja de *Prosopis juliflora* (Sw) DC y *Pluchea sericea* (Nutt.), contra *P. solenopsis*. Las nanopartículas de Cu (Cu-NPs) obtenidas de *P. juliflora* y *P. sericea* promediaron 33.8 y 68.10 nm, respectivamente. La estabilidad alta para ambas Cu-NPs estuvo indicada por el potencial zeta de -69.7 mV para *P. juliflora* y -53.9 mV para *P. sericea*. La toxicidad de las Cu-NPs fue significativa en ambas plantas contra *P. solenopsis* después de 96 horas. Las tasas de mortalidad de *P. solenopsis* fueron de 14 y 20% ante la exposición a Cu-NPs de *P. sericea* y *P. juliflora*, respectivamente. Los ensayos en solución de cobre mostraron que la mortalidad de *P. solenopsis* fue insignificante. Los ensayos de viabilidad para las Cu-NPs de *P. sericea* y *P. juliflora* indicaron reducción significativa de la viabilidad celular de *P. solenopsis* de 30 y 38%, respectivamente.

**PALABRAS CLAVE.** Cochinilla harinosa del algodón. Efecto insecticida. Insecticida verde. Nanopartículas.

**ABSTRACT.** *Phenacoccus solenopsis* is an aggressively invasive species on cotton plants in several countries. Hence, the pesticidal effect of copper nanoparticles synthesized from leaf extract of *Prosopis juliflora* (Sw) DC and *Pluchea sericea* (Nutt.) against *P. solenopsis* was investigated. The results showed that the Cu-nanoparticles (Cu-NPs) obtained from *P. juliflora* and *P. sericea* averaged 33.8 and 68.10 nm, respectively. The high stability for both synthesized Cu-NPs was indicated for their zeta potential (-69.7 mV for *P. juliflora* and -53.9 mV for *P. sericea*). Both nanoparticles showed significant toxicity to *P. solenopsis* after 96 hours. Mortality rates of *P. solenopsis* were 14 and 20% when exposed to Cu-NPs extracted from *P. sericea* and *P. juliflora*, respectively. Tests in copper solution showed an insignificant mortality of *P. solenopsis*. Viability tests for Cu-NPs from *P. sericea* and *P. juliflora* indicated a significant reduction of cell viability by 30 and 38%, respectively.

**KEYWORDS.** Cotton mealybug. Green insecticide. Insecticide effect. Nanoparticles.