



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Síntesis verde de nanopartículas de oro y plata con actividad antibacteriana usando extractos vegetales de canela, café y jengibre

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
Sarai Olivo Cuazitl

Directora de tesis:
Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán

Codirectora de tesis:
M. C. Nery Gabriela Martha Aguilar

Puebla, Puebla.

Mayo, 2023



AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán por confiar en mí y guiarme en el desarrollo de este proyecto de investigación, por siempre encontrarse en la mejor disposición de enseñarme cosas nuevas, aclarar mis dudas y apoyar las ideas que surgían para este trabajo; además, por buscar los recursos y apoyos para realizarlo, por su esfuerzo y tiempo para revisar este trabajo para enriquecerlo y fortalecerlo.

A mi codirectora de tesis la M. C. Nery Gabriela Martha Aguilar por compartir sus conocimientos conmigo, por sus consejos, su paciencia para resolver mis dudas y estar al pendiente de este proyecto de investigación y de mí en el desarrollo de este, así como sus observaciones y críticas constructivas para mejorarlo.

A la M. C. Laura Martínez Pérez del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas por su colaboración en la realización de pruebas antibacterianas y su disposición de aclarar cualquier duda relacionada al tema.

DEDICATORIA

En primer lugar al ser superior que me puso en este momento de la vida, con las circunstancias adecuadas para poder crecer y desarrollarme como persona y por poner en mi camino a las personas correctas que me impulsan y de las cuales he podido aprender para ser mejor cada día.

A mis papás, Daniel y Mine, que día a día trabajan muy duro para que mi hermano y yo tengamos una vida buena y podamos cumplir nuestros sueños; son la mayor fuente de amor y apoyo que me impulsa a seguir adelante. Todo lo que tengo y hasta donde he llegado se los debo a ustedes y no hay suficientes palabras de agradecimiento para reconocerles todo lo que han hecho y dejado de hacer por mí, los amo a los dos.

A mi hermano Daniel, que es mi principal compañero de risas y bromas, un aliado que ha estado ahí para mí en todo momento y que siempre ha creído en mí, incluso en momentos donde incluso yo he dudado de mi misma. Gracias por ser tú, por contagiarme tu sentido del humor y por escuchar y ser comprensivo cuando se necesita.

A mis amigas de toda la vida; en primer lugar a Maryjose, que la vida nos unió siendo niñas y nosotras nos agarramos muy fuerte la una a la otra para nunca soltarnos. A Katia y Maday, con quienes mi camino se cruzó años después, pero la amistad que nos une es fuerte y sólida. A las tres les agradezco ser parte de mi vida y haber estado conmigo en mis mejores momentos, alegrándose de mis logros como si fueran propios, y en los peores, siendo las mejores amigas que podría desear. Junto a ustedes he aprendido y he crecido en muchos aspectos y su amistad es de las cosas más verdaderas que tengo en la vida.

A mis amixes de la carrera, George, Héctor, Pao y Marifer, quienes han compartido conmigo los grandes momentos de la vida universitaria, persiguiendo cada uno la meta en común de convertirnos en biotecnólogos. Se dice que gran parte de los logros personales durante la carrera se debe al apoyo que te dan tus amigos y no me cabe la menor duda. Aquí menciono especialmente a Marifer, quien se volvió mi amiga desde el primer equipo que hicimos juntas y nos hicimos inseparables para el resto

de la licenciatura y de la vida; gracias por estar siempre conmigo, por resistir todos los momentos estresantes, por ser tan alegre y divertida y hacer de todos los semestres una gran aventura.

Finalmente, a las mujeres que están presentes de manera activa en mi vida. Todas me han enseñado algo y son una figura de motivación y admiración, aunque ustedes no lo sepan. Y para las mujeres chiquitas que en algún momento van a recorrer un camino similar a este, sepan que ustedes pueden y no duden nunca de sus capacidades.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Índice general.....	iv
Índice de figuras.....	vi
Índice de tablas	vii
Índice de abreviaturas.....	viii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1 Introducción	3
2 Antecedentes.....	4
2.1 Nanotecnología y Nanopartículas	4
2.2 Nanopartículas metálicas.....	7
2.2.1 Nanopartículas de oro	9
2.2.2 Nanopartículas de plata.....	11
2.3 Propiedades y aplicaciones de nanopartículas metálicas.....	13
2.3.1 Propiedades y aplicaciones de nanopartículas de oro	16
2.3.2 Propiedades y aplicaciones de nanopartículas de plata.....	21
2.4 Principales métodos de síntesis de nanopartículas	36
2.4.1 Métodos químicos	37
2.4.2 Métodos biológicos.....	39
2.4.2.1 Uso de extracto de plantas para la síntesis de NPs metálicas.....	41
2.4.2.2 Factores que influyen en la síntesis biológica de NPs metálicas ...	43
2.5 Extractos vegetales utilizados en la síntesis y fitoquímicos involucrados ...	45
2.5.1 Extracto de Canela	47
2.5.2 Extracto de Café.....	48
2.5.3 Extracto de Jengibre.....	50
3 Hipótesis.....	52
4 Objetivos.....	52
4.1 Objetivo general	52
4.2 Objetivos específicos	52
5 Metodología.....	52
5.1 Extractos	52

5.1.1	Obtención de polvos para los extractos.....	52
5.1.1.1	Polvo de canela	53
5.1.1.2	Polvo de café	53
5.1.1.3	Polvo de jengibre	53
5.1.2	Preparación del extracto.....	53
5.2	Síntesis de nanopartículas	54
5.3	Caracterización	54
5.3.1	UV-Vis	54
5.3.2	DLS	54
5.4	Propiedades antimicrobianas.....	55
5.4.1	Preparación de inóculos de prueba	55
5.4.2	Distribución de los ensayos.....	55
5.4.3	Concentración inhibitoria mínima (MIC) por microdilución.....	55
6	Resultados y discusión	56
6.1	Síntesis de nanopartículas.....	56
6.1.1	Síntesis biológica de nanopartículas de oro	56
6.1.2	Síntesis biológica de nanopartículas de plata.....	59
6.2	Caracterización	62
6.2.1	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)	62
6.2.1.1	UV-Vis de nanopartículas de oro	63
6.2.1.2	UV-Vis de nanopartículas de plata.....	68
6.2.2	DLS	72
6.2.2.1	DLS de nanopartículas de oro	72
6.2.2.2	DLS de nanopartículas de plata.....	75
6.3	Propiedades antimicrobianas.....	79
7	Conclusiones	82
8	Perspectivas a futuro	83
9	Bibliografía.....	84
10	Anexos	91
10.1	Técnicas de caracterización de Nanopartículas.....	91
10.1.1	UV-Visible.....	91
10.1.2	Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los nanomateriales.....	8
Figura 2. Representación de la resonancia de plasmones de superficie localizados	9
Figura 3. I. Copa de Licurgo que muestra el color verde con luz directa (A) y roja cuando la luz pasa a través de ella (B) II. Variación de color en las soluciones coloidales de AuNPs al variar el tamaño de estas .	11
Figura 4. Estructura de la pared celular bacteriana de Gram negativas y Gram positivas.	16
Figura 5. Sistema de detección de SARS-CoV-2 basado en el uso de AuNPs cubiertas con ASO	17
Figura 6. Imágenes de campo oscuro de (A) línea celular MDA-MB-231 que expresa CD44 y (B) línea celular BT-474 que no la expresa	19
Figura 7. Mecanismos antimicrobianos de las NPs de oro sobre <i>E. coli</i>	21
Figura 8. Esquema que demuestra los cambios colorimétricos y el mecanismo de agregación de McAgNP después de la interacción de Vit-B1 y Vit-C.	23
Figura 9. Representación esquemática del nanobiosensor basado en LSPR que muestra su exposición a muestras humanas.	27
Figura 10. Principio de la nanosonda en la detección de FEN1. La nanosonda fue diseñada para responder a FEN1, que escindiré los ADN-AgNC en el extremo 5 'para separarlos del GRS.....	28
Figura 11. Mecanismos de actividad antibacteriana de las NPs de plata.....	33
Figura 12. Clasificación de los métodos de síntesis de NPs.	37
Figura 13. Mecanismo de formación de las NPs metálicas por reducción de iones.	38
Figura 14. Biosíntesis de NPs a partir de plantas.....	42
Figura 15. Fitoquímicos principales involucrados en la biosíntesis de NPs.....	46
Figura 16. Placa de microdilución de 96 pozos con diluciones seriadas.	56
Figura 17. Soluciones coloidales de oro utilizando extractos de canela, café y jengibre elaborados a diferentes temperaturas, sintetizadas a diferentes pH.	58
Figura 18. Soluciones coloidales de plata utilizando extractos de canela, café y jengibre elaborados a diferentes temperaturas, sintetizadas a diferentes pH.	61
Figura 19. Espectros de absorción de extractos de (A) canela y (B) café, utilizados para la síntesis de NPs.	63
Figura 20. Gráficas del diámetro de NPs estimado correspondiente a la λ_{max} para las NPs de oro (A) y plata (B) a partir de datos reportados.....	64

Figura 21. Espectros UV-Vis de AuNPs sintetizados con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E y F), donde se muestra la λ_{max} correspondiente a las NPs sintetizadas a diferente pH.....	67
Figura 22. Espectros UV-Vis de AgNPs sintetizadas con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E, F), donde se muestra la λ_{max} correspondiente a las NPs sintetizadas a diferentes pH.	70
Figura 23. Espectros DLS de intensidad correspondientes a AuNPs sintetizadas con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E, F), donde se muestra el diámetro en nm correspondiente a las NPs sintetizadas a pH 10.....	74
Figura 24. Espectros DLS de intensidad correspondientes a AgNPs sintetizadas con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E, F), donde se muestra el diámetro en nm correspondiente a las NPs sintetizadas a pH 10.....	77
Figura 25. Propiedades de inhibición del crecimiento del extracto de canela elaborado a 85 °C, AuNPs y AgNPs frente a diferentes cepas bacterianas.....	80
Figura 26. Concentración inhibitoria mínima de AgNPs frente a tres cepas bacterianas diferentes. A y B: E. coli ATCC 25922 (MIC = 3.12%); D y E: S. aureus ATCC 25923: (MIC \leq 0.048%); G y H: P. aeruginosa ATCC 27853 (MIC = 6.25%).	81
Figura 27. Esquema simplificado de los componentes principales de un espectrofotómetro UV-vis.....	92
Figura 28. Componentes principales del equipo DLS.....	95
Figura 29. Distribuciones de número, volumen e intensidad en poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm en cantidades iguales	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño estimado de AuNPs sintetizadas.....	66
Tabla 2. Tamaño estimado de AgNPs sintetizadas.....	69
Tabla 3. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AuNPs sintetizadas con extractos de canela.	73
Tabla 4. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AuNPs sintetizadas con extracto de café.....	75
Tabla 5. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AgNPs sintetizadas con extracto de canela.....	75
Tabla 6. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AgNPs sintetizadas con extracto de café.....	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

11-MUA	Mercaptoundecanoico
1-OT	1-octanotio
ADN-AgNC	Mancuernas de doble aleta funcionalizados con nanoclusters de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
anti-AGFR	Anticuerpos anti inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico
ASNP	Nanopartículas cubiertas de albúmina
ASO	Oligonucleótidos antisentido modificados con tiol
ATP	Adenosín trifosfato
AuNPs	Nanopartículas de oro
cc-AgNPs	Nanopartículas de plata cubiertas con citrato
CFT	Contenido fenólico total
CMC	Células madre cancerosas
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMF	Dimetilformamida
ELC	Extracto libres de células
FEN1	Marcador Flap endonucleasa 1
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
HNSCC	Células escamosas de cabeza y cuello
LPS	Lipopolisacáridos
LSPR	Resonancia de plasmón de superficie localizado
McAgNPs	Nanopartículas de plata cubiertas con maltol
MIC	Concentración Inhibitoria Mínima
NIR	Luz infrarroja cercana
NPs	Nanopartículas
RI	Índice de Refracción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
SRG	Secuencia rica en guaninas
TC	Tomografía computarizada
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV-Vis	UV-Visible
Vit-B1	Vitamina B1
Vit-C	Vitamina C
λ_{max}	Longitud de onda máxima

RESUMEN

Las nanopartículas metálicas, principalmente las de oro y plata, son relevantes en diversas aplicaciones debido a las propiedades que presentan en esta escala. Sus principales particularidades son las propiedades ópticas únicas y las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata. Aunque hay muchos reportes acerca de métodos para sintetizar nanopartículas metálicas, actualmente, existe mucho interés en buscar nuevos métodos de síntesis de nanopartículas (NPs) que sean económicos y amigables con el ambiente, y es por ello precisamente de donde surge la llamada síntesis verde, síntesis biológica o biosíntesis. El uso de extractos vegetales como agente reductor en la síntesis de NPs es el método más comúnmente utilizado en este tipo de técnica, debido a la facilidad de obtención y manejo así como bajo costo de preparación. En este trabajo se utilizan extractos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), café (*Coffea arabica*) y jengibre (*Zingiber officinale*) como agentes reductores para la síntesis de NPs de oro y plata, con el objetivo principal de evaluar sus propiedades antimicrobianas y determinar la influencia de las condiciones de reacción (temperatura y pH) en la formación de las NPs metálicas. Las NPs obtenidas se caracterizaron mediante las técnicas de espectroscopia UV-Visible y dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés). Así mismo, se evaluó su actividad antimicrobiana mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) frente a tres cepas bacterianas diferentes. Los resultados obtenidos confirman la formación de NPs mediante una metodología de síntesis verde y la actividad antimicrobiana de las NPs de plata frente a las cepas evaluadas, confirmando la eficacia del uso de extractos naturales en la formación de NPs de oro y plata.

Palabras clave: nanopartículas metálicas, síntesis verde, extracto vegetal, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles, mainly gold and silver, are relevant in diverse applications due to the properties present at this scale. Its main features are the optical properties and the antimicrobial properties of silver nanoparticles. Although there are many reports of different methods to synthesize metallic nanoparticles, nowadays, economical and eco-friendly methods of nanoparticle (NP) synthesis are sought, from which green synthesis arises, also called biological synthesis or biosynthesis. The use of plant extracts as reducing agents in the synthesis of NPs is the most frequent method in this kind of technique, due to the simplicity in obtaining and handling the extracts as well as the low cost of preparation. In this work, extracts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), coffee (*Coffea arabica*), and ginger (*Zingiber officinale*) are used as reducing agents for the synthesis of gold and silver nanoparticles, with the main objective of evaluating their antimicrobial properties and determining the influence of the reaction conditions (temperature and pH) in the formation of metallic nanoparticles. The obtained nanoparticles were characterized by UV-Visible spectroscopy and dynamic light scattering (DLS) techniques, and the antimicrobial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against three different bacterial strains. The results confirm the formation of nanoparticles through a green synthesis methodology and the antimicrobial activity of silver nanoparticles against the evaluated strains, which confirms the efficacy of the use of natural extracts in the formation of gold and silver nanoparticles.

Keywords: metallic nanoparticles, green synthesis, vegetable extract, antimicrobial activity.

1 INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha tomado un papel relevante en diversas áreas de estudio debido a que los materiales que se encuentran en la escala nanométrica pueden integrarse en distintas aplicaciones y contribuir a la solución de diversos problemas sociales referentes a la medicina, el medio ambiente, la agricultura, la industria alimentaria, etc. Las NPs son el principal representante de los materiales nanométricos, un ejemplo de estos son las NPs metálicas. La importancia y aplicabilidad de estos materiales se debe a las características y propiedades que presentan a esta escala, mismas que no se presentan cuando se encuentran en su tamaño macroscópico [1]. Esta diferencia se atribuye a la distribución de los átomos en el material, ya que en las NPs la mayoría de los átomos se encuentran en la superficie, además de que cuentan con una gran área superficial y presentan un fenómeno conocido como resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR). Gracias a estas características, las NPs metálicas tienen propiedades fisicoquímicas, ópticas e incluso biológicas que son aprovechadas en distintos rubros [2].

Las nanopartículas de oro (AuNPs) y las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido utilizadas en distintas áreas por sus propiedades físicas y químicas, las cuales son dependientes del tamaño, la forma, composición química y modificaciones superficiales de la partícula. Debido al efecto de la LSPR, las AuNPs y AgNPs tienen propiedades ópticas y fototérmicas que son frecuentemente utilizadas en el diagnóstico y terapia de enfermedades [3]. Otra característica de interés presente en las NPs metálicas, principalmente en las NPs de plata, es su actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos como hongos y bacterias Gram positivas y Gram negativas, por lo que se ha propuesto su uso en equipo médico, implantes cardiovasculares y ortopédico, apósitos para heridas, envases de alimentos, etc. [4]. Debido a las particularidades de las NPs metálicas y a la versatilidad de aplicaciones donde pueden aprovecharse, los métodos para la obtención de estas son una rama de investigación importante. Actualmente existen varias metodologías para la síntesis de NPs metálicas físicas, como descomposición térmica, ablación láser y electrólisis, y químicas, como microemulsión coloidal, métodos electroquímicos, proceso poliol, reducción química, etc., siendo esta última una de las más utilizadas [5]; sin embargo, este tipo de procesos requieren el uso de sustancias, que en ocasiones son agresivas para el ser humano y el medio ambiente y limitan los aspectos de aplicación de las

NPs sintetizadas; así como condiciones de reacción extremas, consumo alto de energía, etc., lo que incrementa los costos de producción y vuelve la síntesis un proceso largo y poco rentable. La síntesis verde, también llamada síntesis biológica o biosíntesis de NPs, surge como una alternativa biotecnológica para la obtención de NPs metálicas ya que se basa en el uso de biomasa o extractos de organismos vivos (levaduras, hongos, microalgas, bacterias, plantas, etc.) como agente reductor y estabilizador en la síntesis de NPs. Los extractos vegetales son una de las principales formas de utilizar material biológico en la síntesis de NPs, gracias a los fitoquímicos presentes en ellos a los que se les atribuye la reducción de los iones metálicos para la formación de NPs [6]. Esta metodología se ha considerado una alternativa sostenible, flexible y de bajo costo gracias a la gran variedad de entidades biológicas que pueden utilizarse y la relativa facilidad con que pueden obtenerse y manejarse; además de evitar el uso de sustancias tóxicas y condiciones de reacción extremas en el proceso.

Por lo anterior y por la relevancia que han mostrado los métodos de síntesis verde, en este trabajo se reportan los resultados del uso de extractos vegetales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), café (*Coffea arabica*) y jengibre (*Zingiber officinale*) como agentes reductores en la síntesis de NPs metálicas de oro y plata. También se muestra su caracterización mediante técnicas de UV-Visible y dispersión dinámica de la luz (DLS) y se evalúan sus propiedades antibacterianas mediante un análisis de concentración mínima inhibitoria; con el fin de determinar si el uso de extractos vegetales en la síntesis de NPs funciona como una alternativa económica y amigable con el ambiente y con resultados similares a los obtenidos por otros métodos de síntesis.

2 ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología y Nanopartículas

La nanotecnología es la ciencia que estudia la aplicación, manipulación y desarrollo de tecnología en la escala nanométrica, en un rango de 1 a 100 nm. Esta tecnología, basada en el uso de sistemas físicos, químicos y biológicos, permite generar materiales con características controlables y muy diversas, siendo una alternativa innovadora para solucionar problemas sociales, incluso cotidianos [7].

De acuerdo con Srivastava & Bhargava, 2022 [8], un nanomaterial se define como material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas en estado libre, como aglomerado o agregado, en la escala nanométrica y pueden estar hechos de elementos únicos, elementos múltiples o compuestos [2]. La relevancia de estos se debe a que los materiales con dimensiones nanométricas adquieren propiedades físicas y químicas y, en algunos casos, biológicas, diferentes a las de su tamaño macroscópico, como actividad antimicrobiana y citotóxica, actividad como agente de administración de fármacos, agente antitumoral, etc. [9]. Así, puede apreciarse cómo materiales con la misma composición química pero diferente tamaño presentan distintos colores, reactividades e incluso adquieren actividad antimicrobiana. Esto sucede dado que las propiedades de un material a granel se rigen por los átomos internos, a diferencia de los nanomateriales donde los átomos en su mayoría son superficiales [1].

Conforme se presentan avances en esta ciencia, se demuestra que la nanotecnología tiene la capacidad de impulsar diferentes áreas de estudio y solventar problemas sociales de distintos ámbitos, además, las diversas propiedades que caracterizan a los materiales a esta escala, la convierte en una ciencia multidisciplinaria con el potencial de unirse con otras ciencias y aprovechar las cualidades de ambas para cubrir aspectos más amplios en beneficio de la sociedad. La gran versatilidad de los nanomateriales permite que sean utilizados en objetos comunes como protectores solares, cosméticos, vendajes, pinturas, entre otros. De hecho, las potenciales aplicaciones de estos materiales pueden ser impulsadas en diferentes áreas como en la industria textil y alimentaria, en la medicina y especialmente en la biotecnología [1]. La biotecnología es una ciencia que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para obtener productos nuevos o modificados de interés económico y social, con el objetivo principal de beneficiar a la humanidad [10]. Gracias al uso de sistemas biológicos, la biotecnología representa un nuevo catálogo de alternativas para solucionar diferentes problemas sociales y direccionarlas a opciones sostenibles con diferentes campos de aplicación como el área médica, ambiental, la agricultura, industrial etc. Debido a la versatilidad de los sistemas biológicos utilizados en esta ciencia, la biotecnología se integra con otras ciencias para complementarse entre sí, resultando en opciones innovadoras con un mejor alcance pues pueden utilizarse en diferentes campos a la vez [7]. Aunque el dominio de la escala nanométrica no es imperativo para la biotecnología, la convergencia nanotecnología-biotecnología

(nano-biotecnología) permite la evolución de diferentes líneas de investigación al plantear nuevas metodologías para afrontar desafíos relacionados al objetivo principal de la biotecnología [10].

Por otro lado, la relación entre estas ciencias puede ser recíproca al implementar metodologías biotecnológicas y sostenibles para el diseño y síntesis de nanomateriales al proponer alternativas que se basen en el uso de entidades biológicas y que consideren aspectos importantes socialmente como son el medio ambiente y la salud. La concientización acerca de estos temas abre paso al diseño de métodos de “síntesis verde” que poco a poco toma auge gracias a las ventajas que presenta [11]. La diversidad alrededor de la nanotecnología y los nanomateriales permite una síntesis y aplicación basados en las necesidades que se busca cubrir; las diferencias en sus composiciones, estructuras, dimensiones y tamaño potencializan su utilidad en diferentes situaciones [12].

Al ser tan versátiles, los nanomateriales pueden clasificarse de diferentes maneras considerando sus dimensiones, morfología, uniformidad y composición [12]. La clasificación basada en las dimensiones de las NPs se divide en cuatro. Las estructuras cero-dimensionales (0D) se caracterizan por tener todas sus dimensiones en la nanoescala, lo que los vuelve muy pequeños y cercanos a cero; algunos materiales pertenecientes a esta clasificación son los puntos cuánticos, también conocidos como quantum dots, nanodots, cubos, nanocápsulas, nanoanillos etc. Los nanomateriales de una dimensión (1D) son aquellos que tienen dos dimensiones en la nanoescala y una fuera de ella, por ejemplo nanofilamentos, nanocables, nanofibras, nanotubos, etc. [8], [13]. Las nanoestructuras pertenecientes a la clasificación de dos dimensiones (2D), tienen solo una de sus dimensiones en la nanoescala, este tipo de materiales pueden ser amorfos o cristalinos con un alto grado de funcionalidad química; en esta categoría se encuentran los nanoplatos y nanorevestimientos, así como películas finas de una o varias capas cristalinas o amorfas. Los materiales tridimensionales (3D) tienen todas sus dimensiones fuera de la nanoescala, es decir, miden más de 100 nm, ejemplos de estos son espumas, fibras, nanobrotos de carbono, pilares, policristales, panales, esqueletos de capas, etc. [8], [13]

Otro tipo de clasificación es la que se basa en la morfología, estas características son dependientes del método de síntesis e incluyen planitud, esfericidad y relación de aspecto, la cual se refiere a las características geométricas que describe las

proporciones entre el ancho y el alto de las partículas; esta última característica tiene dos divisiones. Las morfologías de baja relación de aspecto incluye formas esféricas, ovaladas, prismáticas y helicoidales; las morfologías de alta relación de aspecto incluye formas de zigzag, hélices y cinturones [12]. Otra categoría es con base en la uniformidad de las nanoestructuras, pueden ser clasificadas como isométricas y no homogéneas o dispersas y aglomeradas, la aglomeración se basa en las propiedades electromagnéticas y de carga superficial de las nanoestructuras [13].

Finalmente, la clasificación conforme a la composición química de los nanomateriales tiene varias categorías, iniciando por aquellas formadas por un solo constituyente o nanocompuestas; a partir de esta, los nanomateriales se pueden identificar como orgánicos o inorgánicos [8]. Los nanomateriales orgánicos utilizan como molde estructuras orgánicas naturales o sintéticas, estos materiales son más biodegradables y se utilizan para la fabricación de bionanocompuestos, un ejemplo de estos son las NPs poliméricas hechas a base de quitosano, ácido algínico y albúmina; así como los nanoestructuras a base de carbono como los fullerenos y grafenos [8]. Los nanomateriales inorgánicos son sintetizados por la precipitación de sustancias inorgánicas como metales elementales, óxidos metálicos y sales metálicas; tienen características únicas que se aprovechan en diferentes aplicaciones físicas, biológicas y biomédicas [8], [13]. En esta categoría también se encuentran los quantum dots, que son NPs semiconductoras con propiedades ópticas y electrónicas diferentes a las de partículas más grandes [8]. La Figura 1 representa un esquema donde se sintetizan las diferentes categorías de clasificación.

2.2 Nanopartículas metálicas

Las NPs son una de las formas más representativas de los nanomateriales, se encuentra en la clasificación de "nanomateriales de cero-dimensión" y presentan diferentes morfologías como esferas, cubos, formas triangulares, etc. [8]. Las NPs inorgánicas son las más conocidas y comúnmente utilizadas. En esta clasificación se incluyen las NPs de óxidos metálicos y las NPs de metales nobles como oro y plata [14]. Típicamente son sintetizadas a partir de la precipitación de sustancias inorgánicas como metales elementales (Au, Ag, Cu, Pt, etc.) óxidos metálicos (TiO₂, MnO, ZrO₂, Al₂O₃, etc.) o sales metálicas y tienen diferentes aplicaciones físicas, biológicas y biomédicas [8].

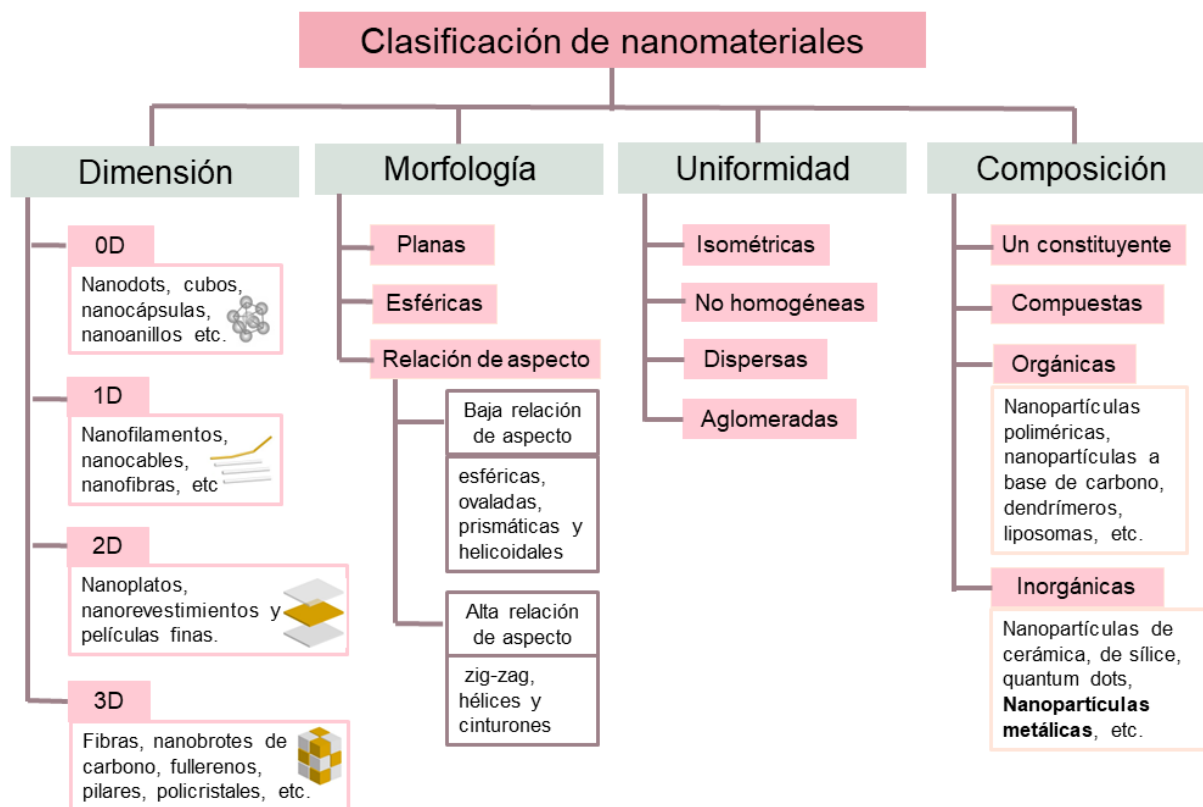


Figura 1. Clasificación de los nanomateriales.

Las NPs metálicas más comunes son las producidas a partir de metales como oro y plata, y son de gran interés debido a las propiedades químicas, ópticas y electrónicas que presentan a esta escala, en comparación con las presentadas por estos mismos metales en su forma de mayor tamaño [13]. Estas propiedades se atribuyen a dos factores principales. En primer lugar, los efectos de la superficie y los efectos cuánticos (plasmón superficial) [15].

Los efectos de superficie se refiere a que las NPs tienen una gran área superficial en comparación al tamaño. Si se dividiera un material en la escala macroscópica con volumen definido en NPs, su volumen seguiría siendo el mismo pero el área superficial colectiva aumentaría notablemente [15]. Además, debido al tamaño nanométrico de las partículas, hay una mayor cantidad de átomos en la superficie de estas que los que se encuentran en su interior, esto resulta en mayor reactividad química así como un punto de fusión reducido en comparación con partículas más grandes [2].

Los efectos cuánticos implican el confinamiento de electrones dentro de la partícula y se deben al tamaño de las NPs. Este efecto se manifiesta en un espectro de energía cuantizado, lo que resulta en la aparición de momentos magnéticos [2]. Estos dos factores desencadenan un fenómeno llamado “resonancia de plasmones”. La LSPR

se refiere a las oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos, esto sucede cuando la partícula es de menor tamaño que la longitud de onda incidente, por lo que la luz interactúa con partículas mucho más pequeñas y conduce a que el plasmón oscile localmente alrededor de la nanopartícula, es decir, conlleva a la oscilación confinada de los electrones en la nanopartícula [16], [17].

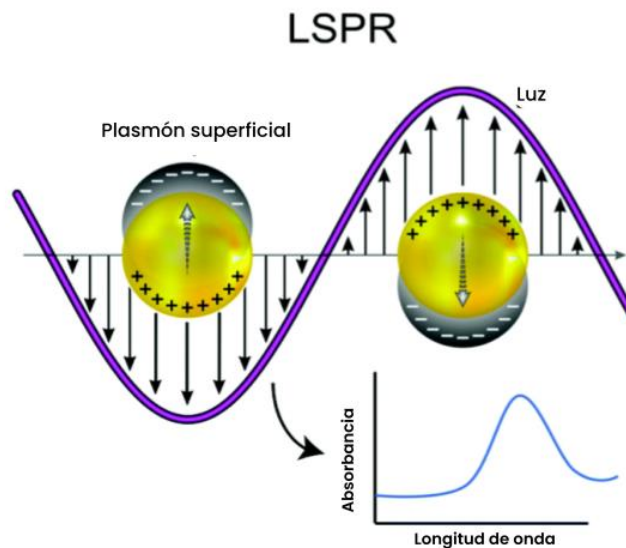


Figura 2. Representación de la resonancia de plasmones de superficie localizados. Imagen modificada tomada de [17].

Gracias a la proporción de átomos superficiales, y a otras características morfológicas como tamaño, forma, cristalinidad y naturaleza química, los electrones pueden interactuar con la radiación electromagnética [18]. Este fenómeno explica algunas de las características más representativas de las NPs metálicas, específicamente de las de oro y plata.

2.2.1 Nanopartículas de oro

El oro es un metal que ha tomado importancia considerable a lo largo de la historia. Este metal se caracteriza por su color amarillo, alta estabilidad química y buen potencial de reducción, es decir, sus iones se reducen fácilmente gracias a su estructura electrónica [16]. Se ha reportado que en la escala macroscópica, el oro es químicamente inerte, esto es, no reacciona frente a distintas sustancias como agua, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y flúor y la absorbancia de este material en su forma macroscópica comienza en 2.4 eV, reflejando la luz roja y amarilla mientras absorbe

fuertemente la luz azul y violeta [16], [19]. Dichas características cambian si el metal está en la nanoescala y, una de las formas en las que frecuentemente se encuentran las NPs es en suspensiones coloidales. Una suspensión coloidal se define como la mezcla de, generalmente, dos materiales donde uno se dispersa en el otro sin unirse químicamente. Las partículas que están dispersadas se conocen como coloides y suelen tener tamaños entre 1 a 1000 nm [20]. Debido a que las partículas del metal se encuentran en una escala submicrométrica y le confiere propiedades espectroscópicas modificadas, los coloides de oro con NPs en un rango de tamaño de 2 a 100 nm y forma esférica tienen un color rojo intenso; cuando las NPs son más grandes, el color cambia a uno azul/morado [16], [21].

Estos efectos colorimétricos pueden ser percibidos a simple vista al observar una solución coloidal de oro y se justifican con las oscilaciones de electrones características de la resonancia de plasmones de superficie localizada [22]. Las NPs de oro plasmónicas absorben la luz con la que interactúan debido a la LSPR, donde su banda característica se encuentra en la región visible, ubicada aproximadamente en 520 nm. A medida que su tamaño aumenta, la absorción de luz incrementa y la banda se desplaza a longitudes más grandes [21]. Cualquier cambio en el entorno de las NPs que modifiquen su tamaño o forma conduce a cambios en la banda de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y, por lo tanto, a cambios colorimétricos en las dispersiones, por tal razón, la agregación de AuNPs se acompaña con cambios de color visibles [22].

Estas propiedades colorimétricas, han sido aprovechadas a lo largo de la historia, incluso desde antes de que los términos “nanotecnología” y “NPs” se conocieran. La principal representación del uso de NPs metálicas en el mundo antiguo es la Copa de Licurgo, fabricada por los romanos en el siglo IV que está hecha de vidrio dicróico. Este tipo de vidrio cambia de color bajo ciertas condiciones de iluminación, en otras palabras, la copa tiene dos colores: el vidrio aparece verde con luz directa y rojo purpura cuando la luz brilla a través del vidrio, como se muestra en la Figura 3 I), este fenómeno conocido como dicroísmo se debe a la presencia de NPs metálicas de 50-100 nm de diámetro en el vidrio capaces de absorber y dispersar radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda [23]. En 1990 se reportó que las NPs presentes en la copa son aleaciones de oro y plata con un 10% adicional de cobre disperso en una matriz de vidrio; las AuNPs producen el color rojo como consecuencia de la absorción de luz en una longitud de onda de aproximadamente

520 nm, el color rojo púrpura se debe a la absorción de la luz por partículas más grandes, que aún se encuentran en la escala nanométrica, el color verde, por otro lado, se atribuye a la dispersión de la luz por dispersiones coloidales de AgNPs con un tamaño aproximado de 40 nm [24].

En 1857, Michael Faraday demostró cómo las NPs de oro producen soluciones de diferentes colores bajo ciertas condiciones de iluminación ante la Royal Society of London, con su trabajo “relaciones experimentales del oro (y otros metales) con la luz”. Faraday preparó dispersiones de oro coloidal en un sistema de dos fases que constaba de una solución acuosa de sal de oro $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$ y una solución de fósforo. Faraday mostro como dicha dispersión cambia de color amarillo, característico de la sal de oro, a un color rubí característico de las NPs de oro, además demostró como las AuNPs producen diferentes colores al cambiar el tamaño de las NPs. Estos estudios sobre la interacción de luz con las NPs metálicas, puede considerarse como el comienzo de la química coloidal moderna [12], [25].

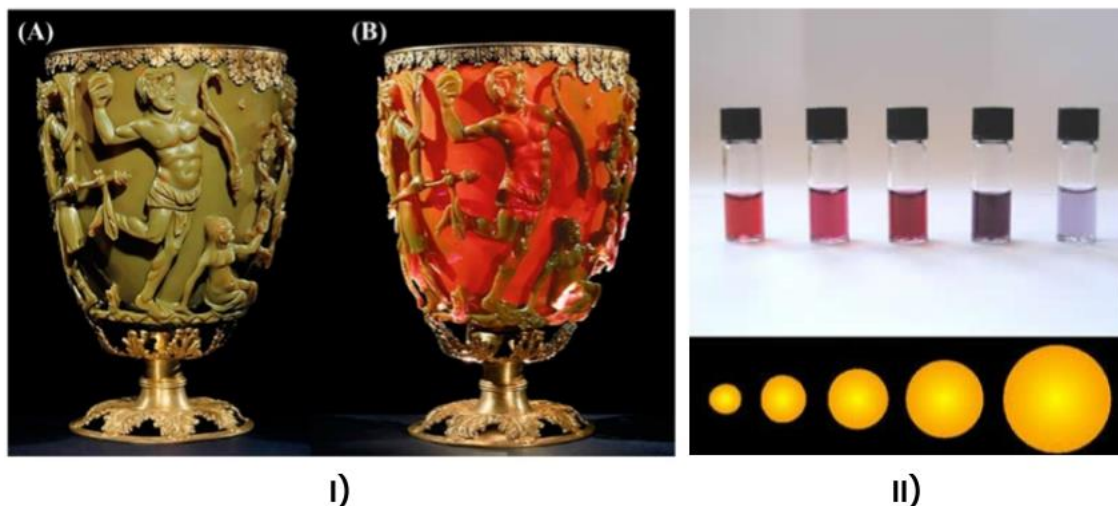


Figura 3. I. Copa de Licurgo que muestra el color verde con luz directa (A) y roja cuando la luz pasa a través de ella (B) II. Variación de color en las soluciones coloidales de AuNPs al variar el tamaño de estas. Imagen tomada de [26].

2.2.2 Nanopartículas de plata

La plata es un metal brillante color blanco perteneciente al grupo de los metales de transición. Desde su descubrimiento hasta nuestros días, este metal ha sido relevante entre las civilizaciones debido a sus propiedades físicas y químicas [27]. La plata cuenta con la conductividad térmica y eléctrica más alta de todos los metales, es el metal más dúctil y maleable, después del oro, y el más abundante y menos costoso de los metales preciosos (oro, plata, paladio y platino). La plata no reacciona

fácilmente con ácidos diluidos no oxidantes ni con bases fuertes y no se oxida fácilmente [27], [28]. Gracias a sus características, se le ha dado uso en una gran variedad de aplicaciones como la fabricación de joyería y arte decorativo, acuñación de monedas, construcción de cableados de corriente, fabricación de instrumentos musicales, etc. [27].

Al igual que el oro, las propiedades físicas y químicas se modifican cuando la plata se encuentra en la escala nanométrica y permite su uso en otro tipo de aplicaciones aprovechando sus características. Las NPs de plata en su forma coloidal muestran coloraciones entre amarillas y marrón claro debido al efecto de la LSPR que caracteriza a las NPs metálicas [29]. Históricamente, este fenómeno se ha aprovechado en la fabricación de vidrio como en la copa de Licurgo, mencionada en el apartado anterior, donde el color verde de la copa (Figura 3) se debe a la presencia de AgNPs [26]. Un efecto similar se observa en las ventanas de las iglesias medievales, que brillan con tonos rojos y amarillos luminosos debido a la incorporación de las NPs de Au y Ag en el vidrio [23]. Por otro lado, en Mesopotamia del siglo IX, comenzaron a usar cerámica vidriada, la cual mostró propiedades ópticas sorprendentes debido a la existencia de NPs de plata y cobre aisladas dentro de las capas de esmalte más externas. Un análisis con microscopía electrónica de transmisión (TEM) reveló una doble capa de AgNPs de tamaño 5-10 nm en la capa externa y 5-20 nm en la capa interna. Esta estructura compuesta presenta propiedades ópticas que dependen tanto del tamaño de la nanopartícula como de la matriz [30].

Las NPs de plata, a diferencia de otras NPs, tienen una historia de uso en diversos productos y aplicaciones. Los productos que contienen AgNPs han estado disponibles comercialmente por más de 100 años y se utilizaron en pigmentos, fotografías, tratamientos de heridas, catalizadores y biocidas [31]. El primer reporte de la formación no accidental de nanoplata fue en 1889 donde se reportó la síntesis de un coloide de plata estabilizado con citrato. Las partículas obtenidas tenían un diámetro medio entre 7 y 9 nm. Años después, en 1902, se reportó la estabilización de AgNPs utilizando proteínas bajo el nombre de "Collargol" a la cual se le dieron aplicaciones médicas; fue esta y otros coloides de plata como "Agyrol" y "Protargol" que empezaron a introducirse a principios del siglo XX en el mercado y se consideran medicamentos de venta libre e incluso era utilizada por médicos para tratar diversas infecciones como la sífilis y otras infecciones bacterianas [31].

2.3 Propiedades y aplicaciones de nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas tienen propiedades de distintas naturalezas que las hacen funcionales para utilizarlas en diversas ramas, estas propiedades se rigen por su tamaño, forma, área superficial, composición química y modificaciones en su superficie. Un cambio en la forma de las NPs puede modificar considerablemente sus propiedades y abrir nuevas oportunidades de aplicación [13], [32].

En general, entre las propiedades representativas de las NPs metálicas, se encuentran las de aspecto químico, afectando principalmente su reactividad y estabilidad. Debido a su tamaño y el gran porcentaje de área superficial, hay una mayor interacción con el ambiente que se encuentra alrededor de la nanopartícula, lo que las vuelve más reactivas y conlleva a una estabilidad química baja [15]. Por otro lado, las NPs inorgánicas se ven favorecidas a presentar propiedades mecánicas gracias a su área superficial y la facilidad con la que pueden modificarse, esto resulta en el aumento de propiedades como la dureza, adhesión, tensión, deformación, etc. [13].

Los efectos de la LSPR, descrito anteriormente, confieren a las NPs metálicas propiedades ópticas y fototérmicas que son de utilidad en distintas áreas. Además, estas propiedades de resonancia, al igual que las mencionadas anteriormente, pueden ajustarse al variar el tamaño, forma, composición y medio, que permite su acoplamiento en sistemas biológicos, generando un gran impacto en la biología y la biomedicina [3].

Las propiedades antimicrobianas de las NPs metálicas han tomado relevancia en los últimos años debido a las repercusiones que tienen las infecciones bacterianas y la resistencia a los antibióticos en la salud. Aunque por mucho tiempo los antibióticos han sido eficaces como tratamiento de infecciones bacterianas debido a sus potentes resultados, hay una tendencia preocupante de las bacterias a desarrollar resistencia contra múltiples antibióticos debido al uso generalizado de estos fármacos [33], [34]. Los patógenos se vuelven resistentes a los antibióticos por diferentes mecanismos celulares, como alteraciones en la permeabilidad en la membrana, desarrollo de bombas de expulsión activa de múltiples fármacos, alteraciones en el ADN, etc., [33]. Afortunadamente, la mayoría de estos mecanismo de resistencia son irrelevantes para las NPs metálicas.

Existen diferentes tipos de NPs que contienen diferentes elementos metálicos, como plata (Ag), zinc (Zn), cobre (Cu), titanio (Ti), magnesio (Mg) y oro (Au), las cuales utilizan diferentes mecanismos para evitar el crecimiento de microbios [35]. El modo de acción de estas NPs metálicas es el contacto directo con la pared celular, sin necesidad de penetrar la célula bacteriana, lo que favorece que las NPs sean menos propensas a promover la resistencia en las bacterias en comparación con los antibióticos. Además, el mecanismo de acción antimicrobiano puede ser de tres tipos: inducción de estrés oxidativo, liberación de iones metálicos o mecanismos no oxidativos, estos mecanismos pueden estar activos simultáneamente, lo que requiere de múltiples e improbables mutaciones genéticas en la bacteria para desarrollar resistencia antibacteriana [33], [34].

Uno de los mecanismos principales involucrado en la actividad antibacteriana de las NPs es el estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son un grupo de moléculas inestables que contienen oxígeno parcialmente reducidos que poseen fuertes capacidades oxidantes, en altas concentraciones son perjudiciales para las células, pero en bajas concentraciones cumplen funciones de señalización complejas [36]. En circunstancias normales la célula bacteriana mantiene un equilibrio en la producción y eliminación de ROS, cuando hay una producción excesiva de estos, surge un desequilibrio que produce estrés oxidativo y desbalance en el estado redox que favorece la oxidación y provoca daños en los componentes individuales de las bacterias [34]. El estrés oxidativo causa cambios en la permeabilidad de la membrana celular, lo que provoca que se presenten daños en esta; así mismo, dentro de la células las ROS intracelulares provocan la pérdida de la integridad de la membrana, atacan enzimas y proteínas cruciales para la morfología celular y los procesos fisiológicos normales de las células [33]. Además, las ROS aumentan los niveles de expresión génica de proteínas oxidativas que están involucradas en la apoptosis de las células bacterianas [34].

El mecanismo de iones metálicos disueltos se basa en la liberación lenta de iones a partir de NPs de óxidos metálico que se absorben en la membrana celular e interactúan con los grupos amino (-NH), tiol (-SH) y carboxilo (-COOH) presentes en los ácidos nucleicos y proteínas. Consecuentemente esto daña la actividad enzimática e interfiere con los procesos fisiológicos y destruye la morfología celular finalizando en la inhibición del microorganismo. Este mecanismo tiene una actividad

antimicrobiana débil, por lo que no es el principal mecanismo antimicrobiano de las NPs metálicas [33], [34].

El mecanismo no oxidativo implica la interacción de las NPs con la pared celular. Debido a que la pared celular tiene diferentes componentes y estructuras en las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 4), estas producen diferentes vías de adsorción de las NPs. La pared celular de las bacterias Gram negativas está formada por lipopolisacáridos (LPS) y fosfolípidos que son responsables de dar a la superficie celular una carga altamente negativa que atrae a las NPs cargadas positivamente [33], [37]. Por otro lado, la pared celular de las bacterias Gram positivas tienen ácidos teicoicos unidos a la capa de peptidoglicano que le confieren carga negativa a la superficie; el fosfato presente en los ácidos teicoicos atrae y distribuye a las NPs a lo largo de la cadena molecular de fosfato, evitando su agregación [33]. Se ha reportado que las NPs metálicas tienen mayor actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas debido a que la pared celular de estas últimas está conformada de tal manera que forma una barrera de penetración no porosa que permite la entrada solo de macromoléculas. Por el contrario, la pared celular de las Gram positivas tiene abundantes poros que permiten la penetración de moléculas extrañas, seguido de la formación de enlaces covalentes con proteínas cercanas y otros componentes de la pared celular, lo que provoca daño en la membrana celular y la consecuente muerte celular [33], [34].

Debido a la actividad antimicrobiana de las NPs metálicas, es importante evaluar su eficacia frente a los microorganismos, la cual se puede conocer a partir de la determinación de su concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés). La MIC se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que evita el crecimiento visible de microorganismos [38]. Los ensayos de dilución se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en medio de cultivo [39]. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio con los microorganismo de estudio y tras la correspondiente incubación se realiza la lectura, determinando, mediante turbidez o cambio de color, qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo [39].

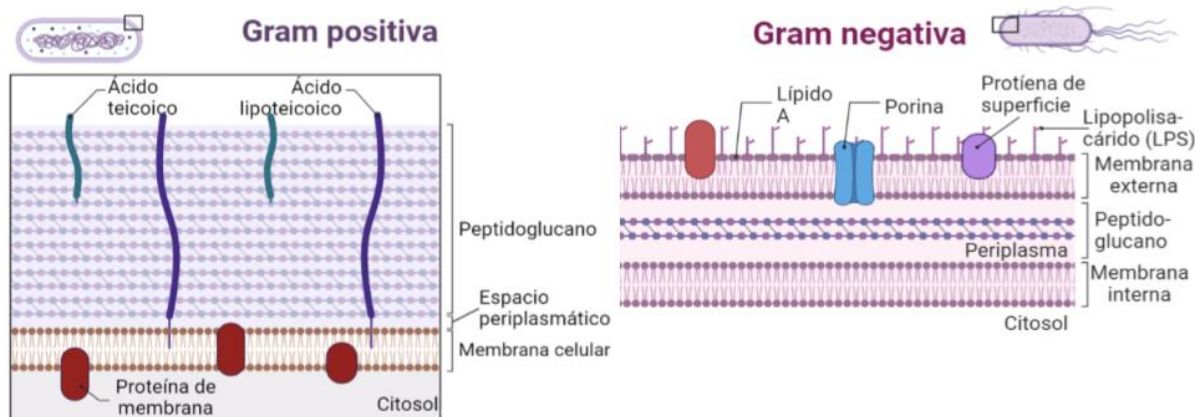


Figura 4. Estructura de la pared celular bacteriana de Gram negativas y Gram positivas.

2.3.1 Propiedades y aplicaciones de nanopartículas de oro

Gracias a las características únicas de las AuNPs como el tamaño ajustable, la monodispersión, estabilidad, relación superficie/volumen, las propiedades ópticas y su electroquímica dependiente del tamaño, las ha convertido en un sistema modelo para diferentes campos de aplicación como el autoensamblaje, la catálisis, el biomarcage, las teorías de transferencia de electrones, etc. [5], [40].

La resonancia de plasmón superficial es una de las propiedades más aprovechada en distintos usos, principalmente en las ciencias biomédicas. La frecuencia y la intensidad de dispersión de la LSPR dependen del tamaño y la forma de la nanopartícula [41]. Este fenómeno se aprovecha en pruebas rápidas en ensayos de flujo lateral como lo son las pruebas de embarazo de venta libre, donde las propiedades ópticas de las AuNPs se utilizan como un indicador visible y químicamente estable, así como en pruebas de detección rápida de patógenos transmitidos por alimentos, donde se utilizan para la detección de toxinas patógenas [42].

Un ejemplo del uso de NPs de oro en una problemática mundial reciente es el reportado por Moitra et al. que desarrollaron una prueba de detección de SARS-CoV-2 basado en un ensayo colorimétrico utilizando AuNPs cubiertas con oligonucleótidos antisentido modificados con tiol (ASO) específicos para el gen N de la nucleocápside para diagnosticar casos positivos de COVID-19 en pocos minutos. Como se muestra en la Figura 5, las NPs cubiertas con ASO se aglomeran selectivamente en presencia de su secuencia de ADN objetivo y muestran un cambio en la resonancia de su plasmón superficial que genera un cambio de color detectable “a simple vista”. Además, la adición de la enzima Ribonucleasa H, escinde la hebra de ARN, lo que

genera la precipitación de las NPs que también puede visualizarse fácilmente. Estos autores desarrollaron un ensayo de detección selectiva aprovechando las propiedades ópticas de las NPs metálicas y la focalización de los ASO, sin la necesidad de utilizar técnicas instrumentales costosas [43].

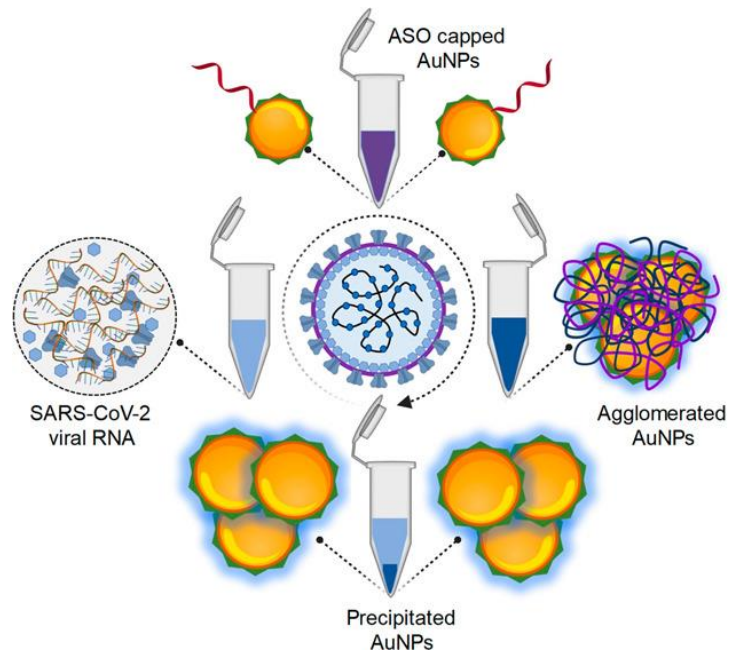


Figura 5. Sistema de detección de SARS-CoV-2 basado en el uso de AuNPs cubiertas con ASO. Imagen modificada de [43].

Las AuNPs plasmónicas presentan propiedades radiativas como absorción de luz, dispersión y fluorescencia, que favorece su uso como posibles agentes de imágenes multimodales, al utilizarse como agentes de contraste en rayos X y en tomografía computarizada (TC). Así mismo, estas NPs que dispersan la luz son indefinidamente fotoestables, en comparación con los fluoróforos convencionales, esta característica permite que las sondas a base de AuNPs sean muy potentes para la bioimagen [42], [44]. La ventaja del uso de AuNPs en la bioimagen, es que, a diferencia de otras técnicas donde se requieren equipos costosos y sofisticados, el uso de NPs de oro solo requiere de un microscopio óptico equipado con un condensador de campo oscuro que garantiza que la luz de excitación incida en ángulos altos, de modo que el objetivo del microscopio solo recoja la luz dispersada por la muestra. La técnica de microscopía de campo oscuro se utiliza para la formación de imágenes de moléculas al conjugar AuNPs con diversas moléculas como proteínas, anticuerpos o moléculas pequeñas, según el biomarcador de la enfermedad a la que se dirige [3].

Patskovsky et al., utilizaron la microscopia de campo oscuro para la detección específica de células de cáncer de mama, usando AuNPs funcionalizadas con anticuerpos monoclonales contra CD44 humano, receptor de la superficie celular que se expresa fuertemente en las células madre cancerosas (CMC). Para su investigación utilizaron dos líneas celulares de cáncer mamario humano diferentes, la MDA-MB-231 que expresa fuertemente CD44 y las células BT-474 que no lo hacen, para verificar la unión específica de las AuNPs funcionalizadas. Reportaron que las membranas celulares de MDA-MB 231 dispersan la luz blanca en imágenes de campo oscuro y las AuNPs dirigidas a CD44 unidos a estas células dispersan la luz en un patrón de puntos (Figura 6A); por otro lado, en ausencia de AuNPs unidos a las células, solo se observa la dispersión de las membranas celulares (Figura 6B). Esto demuestra que las AuNPs funcionalizadas pueden dirigirse de manera eficiente al biomarcador CD44 que se expresa en ciertos tipos de líneas celulares cancerosas, como lo son las MDA-MB-231 [45].

Las propiedades no radiativas de las NPs de oro se aprovechan en aplicaciones como la terapia fototérmica del cáncer al utilizar las AuNPs como calentadores nanoscópicos que destruyen las células cancerosas mediante la terapia fototérmica. Esta terapia se define como la inducción mediada por fotones de la temperatura que puede estimular respuestas fisiológicas hipertérmicas [46]. Este tipo de terapia aprovecha las NPs metálicas que presenta LSPR, como las AuNPs, y que pueden convertir de manera eficiente la luz en calor [3], [46]. La captación celular de las AuNPs puede verse limitada al ser considerado como material extraño por el organismo, por lo que se buscan diferentes alternativas de etiquetado y funcionalización para poder aprovechar sus propiedades en los sistemas biológicos, se utilizan NPs de oro funcionalizadas con otros nanocuerpos que pueden matar específicamente a las células cancerosas dejando ilesas a las sanas [46]. En particular, la fototermólisis láser selectiva es un método de terapia fototérmica donde las NPs de oro se conjugan con anticuerpos específicos dirigidos a células cancerosas, buscando que la unión a las células sanas sea mínima. Las células marcadas con las NPs se irradian con un láser de frecuencia que se superpone con la absorción máxima de la LSPR, pero a una potencia más baja que la requerida para afectar a las células sanas no marcadas, resultando en el calentamiento y destrucción de las células malignas [3].

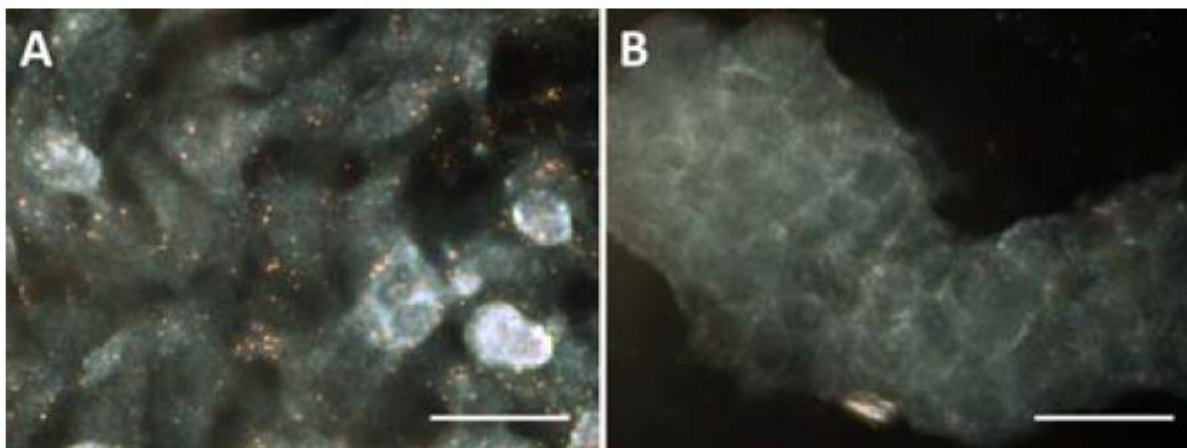


Figura 6. Imágenes de campo oscuro de (A) línea celular MDA-MB-231 que expresa CD44 y (B) línea celular BT-474 que no la expresa. Imagen tomada de [45].

Un ejemplo de la destrucción de células cancerosas mediante fototermólisis es el reportado por Ku et al., de donde utilizan NPs de oro conjugadas con anticuerpos anti inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) C225 como absorbentes de la luz infrarroja cercana (NIR). Los autores reportan que después de dos disparos de pulso láser de 15 ns., las células blanco pretratadas con las NPs funcionalizadas C225-AuNPs, estaban lesionadas al presentar la formación de ampollas en la membrana celular, lo que lleva a un daño celular rápido. Al contrario de las células sin tratamiento previo, las cuales al ser irradiadas con dos disparos de pulsos láser, permanecieron viables en las mismas condiciones, por lo que concluyen que el uso de las AuNPs funcionalizadas con los anticuerpos anti EGFR C225 intervienen en la destrucción celular efectiva tras la irradiación con pulsos láser de 15 ns. [47]

Otra área de aplicación donde se aprovechan las propiedades de las NPs a base de oro es la catálisis. Tradicionalmente el oro se había considerado como catalíticamente inactivo, sin embargo, a finales de la década de 1979 Bond et al., reportaron la hidrogenación de alquenos y alquinos por medio de un catalizador Au/SiO. Está investigación sugirió por primera vez que el Au puede exhibir una actividad mejorada cuando se encuentra en forma de partículas dispersas con un tamaño menor a 5 nm [48]. El oro puede ser un catalizador eficiente ya que permite alta actividad y selectividad, incluso en condiciones libres de solventes y sin el uso de condiciones duras [49].

El tamaño de las NPs, su forma, estructura y área superficial son los factores más importantes que afectan las propiedades catalíticas de las AuNPs; el aumento del

rendimiento catalítico se puede aumentar ajustando el tamaño de las NPs metálicas. El área superficial normalmente aumenta con la disminución del tamaño de las NPs y habrá un aumento en la actividad catalítica [48]. Las NPs coloidales suelen ser termodinámicamente inestables como resultado de la aglomeración; la prevención de este fenómeno a largo plazo se puede lograr mediante la coordinación con ligandos o mediante técnicas de soporte superficial. El soporte mejora la estabilidad térmica del catalizador y proporciona mejores características de área superficial y alta dispersión del componente activo [48]. El tamaño y soporte de las AuNPs desempeñan un papel fundamental en la actividad catalítica que conducen a la posible aplicación de estas reacciones en la industria, utilizando condiciones más suaves [49]. Las AuNPs están involucradas en la catálisis de reacciones de oxidación completa, utilizada para la destrucción catalítica de compuestos tóxicos, y oxidación selectiva, que se utiliza para activar compuestos orgánicos y transformarlos en productos útiles e intermedios químicos. Los catalizadores de oro son eficientes para ambos tipos de oxidaciones, incluyendo la oxidación de CO, la purificación de hidrógeno por oxidación selectiva de CO en presencia de H₂, oxidación selectiva de alcoholes, hidrocarburos, azúcares, etc. [49].

Finalmente, se ha considerado el uso de NPs de oro en campos de aplicación donde se requieren propiedades antimicrobianas; específicamente como una alternativa prometedora para el desarrollo de agentes antibacterianos debido a su no toxicidad, alta funcionalización, facilidad de detección y actividad fototérmica. Aunque la generación de ROS es la principal causa de muerte celular mediada por nanomateriales antibacterianos, la actividad antibacteriana de las AuNPs no induce ningún proceso relacionado con ROS. Se cree que es gracias a este mecanismo antibacteriano independiente de ROS que las NPs son seguras para las células de los mamíferos [37].

Se ha sugerido que las AuNPs carecen de actividad antibacterianas por sí solas [35]. Por esta razón, se crean compuestos que utilizan AuNPs funcionalizadas con antibióticos, moléculas orgánicas, zeolitas, etc., [50]. De esta manera, se mantienen las propiedades fisicoquímicas de las NPs, de las cuales dependen los efectos antibacterianos, como el área superficial, la dispersión, la forma y la baja toxicidad para las células de los mamíferos [51].

Cui et al., desarrollaron una estrategia antibacteriana mediante la modificación de AuNPs con pequeñas moléculas orgánicas inactivas como 4,6-diaminopirimidina tiol,

que actúan sobre *Escherichia coli*. En su trabajo de investigación dilucidaron que los mecanismos antibacterianos de las AuNPs se atribuye a dos procesos principales: la unión de las NPs de oro a la membrana bacteriana seguida de la modificación del potencial de membrana y disminución del nivel de adenosín trifosfato (ATP) y la inhibición de la unión del ARNt al ribosoma (Figura 7). Mediante análisis transcriptómicos y proteómicos, los autores reportan la regulación a la baja de las subunidades de la ATP sintasa de tipo F que condujo a la disminución de los niveles de ATP en *E. coli* tratada con AuNPs, lo que resultó en la disminución general del metabolismo. Así mismo, la síntesis de ATP requiere del potencial de membrana, el cual colapsó al tratar a la célula bacteriana con NPs de oro, que puede disminuir aún más los niveles de ATP. Por otro lado, los autores también reportan que el modificador 4,6-diaminopirimidina tiol, tiene la capacidad potencial de inhibir la función del ARNt y por consiguiente afectar la síntesis de proteínas. Finalmente, reportan que los mecanismos antibacterianos de las AuNPs modificadas no indujeron un aumento de ROS celular, por lo que no se ven involucradas en alguna vía relacionada con el daño oxidativo [52].

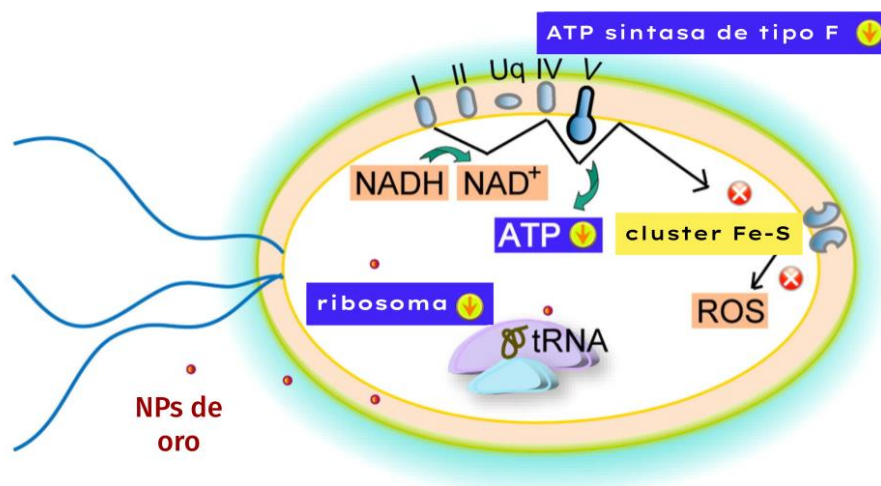


Figura 7. Mecanismos antimicrobianos de las NPs de oro sobre *E. coli*. Imagen modificada de [52].

2.3.2 Propiedades y aplicaciones de nanopartículas de plata

Como se ha mencionado anteriormente, las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales cambian considerablemente cuando se encuentran en tamaño nanométrico debido a su relación superficie-volumen. Estas características superiores se derivan principalmente del tamaño, la forma, composición, cristalinidad, propiedades superficiales y estructura de las NPs en comparación a su forma

macroscópica [9]. Debido a sus propiedades especiales, como propiedades ópticas, eléctricas e incluso biológicas, las NPs de plata se han utilizado en varias aplicaciones como biosensores, catalizadores, productos cosméticos, componentes electrónicos e incluso se han incorporado en aplicaciones antimicrobianas y relacionados con la salud [53].

Las propiedades ópticas de las NPs de plata se utilizan en diversas aplicaciones que aprovechan el fenómeno de la LSPR, que es el responsable del color brillante de las suspensiones coloidales de NPs [30]. Estas propiedades se pueden modificar al variar la composición química, el tamaño y la forma de las NPs, debido a que afectan la oscilación colectiva de los electrones libres en las NPs metálicas. En el caso de las AgNPs estas propiedades son de particular interés debido al fuerte acoplamiento de estas en longitudes de onda específicas de luz incidente [54]. Se ha reportado que las AgNPs absorben radiación electromagnética en el rango visible de 380 a 450 nm, que se conoce como excitación de LSPR [9]. Debido a que esta banda de absorción está en la parte visible del espectro electromagnético, permite una detección colorimétrica de biomoléculas al inducir cambios en la posición de la banda de la LSPR [55]. Las AgNPs de menor tamaño no interactúan con la luz de manera tan eficiente como las que están en el rango de 50-100 nm; la resonancia de plasmón en las NPs de plata de este tamaño, tienen un efecto significativo de dispersión de luz que se puede utilizar en aplicaciones que requieren etiquetas ópticas eficientes, como en ensayos químicos [56].

Un ejemplo del uso de AgNPs como sensores colorimétricos es el reportado por Naqvi et al., quienes desarrollaron un detector sensible y selectivo para vitamina C (Vit-C) y vitamina B1 (Vit-B1) mediante el uso de NPs de plata. Debido a la importancia de estas vitaminas en el funcionamiento del cuerpo humano, la detección rutinaria de estas tiene una gran importancia clínica y biomédica. La detección colorimétrica tiene un excelente potencial para la detección de Vit-B1 y Vit-C ya que es un procedimiento rápido, fácil y rentable y no requiere una formulación de muestra compleja, en comparación con otros procedimientos analíticos. Los autores desarrollaron NPs de plata recubiertas con maltol (McAgNPs), un ligando de origen natural no tóxico; estas NPs eran inicialmente de color amarillo brillante, con una intensidad de absorción a 436 nm y después de la interacción con Vit-C y Vit-B1, su color cambió a naranja y verde respectivamente, debido a la agregación de las NPs. Ambas vitaminas forman un complejo con las NPs, como se muestra en la Figura 8. Los autores reportan que,

en el caso de la Vit-C, el cambio en la intensidad de absorción puede atribuirse a la existencia de muchos grupos OH en la estructura de la vitamina, que pueden formar fuertes enlaces de hidrógeno con las AgNPs cubiertas con manitol, que desplazó la banda de absorción a 490 nm, cambiando el color a naranja. En el caso de la Vit-B1, el color cambió a verde y la intensidad de absorción a 436 nm disminuyó, este cambio puede atribuirse a las interacciones de los grupos OH, NH₂ y azufre de la vitamina B1 con las AgNPs. Estos grupos tienen una mayor afinidad hacia las NPs de plata y hay disponibilidad de más sitios de unión en Vit-B1 que en otras vitaminas competidoras. Finalmente, los autores comprobaron su aplicabilidad en tabletas farmacéuticas, agua (de lago y de grifo) y en fluidos biológicos (orina y plasma), que muestra la versatilidad de uso de este sistema de detección [57].

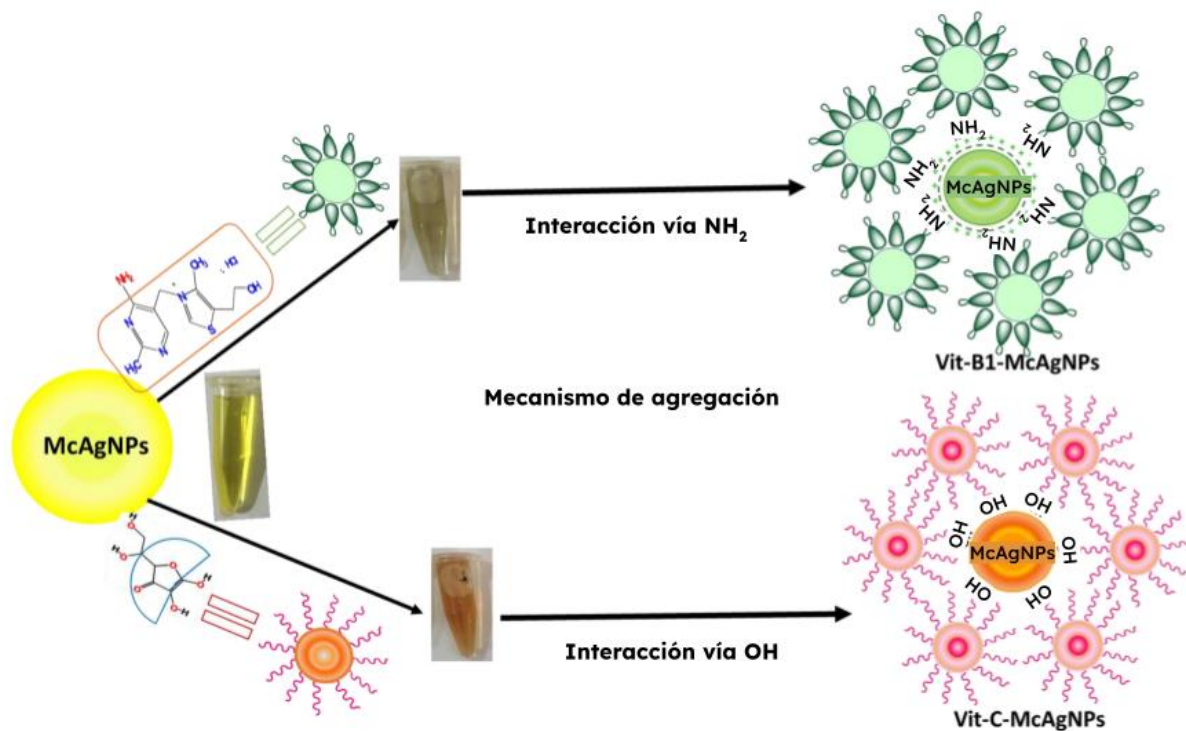


Figura 8. Esquema que demuestra los cambios colorimétricos y el mecanismo de agregación de McAgNP después de la interacción de Vit-B1 y Vit-C. Imagen modificada de [57].

Si bien, las NPs de oro son el tipo de nanopartícula metálica más estudiada para su uso en detección debido a su estabilidad química y biocompatibilidad, las NPs de plata ofrecen mejores resultados en términos de sensibilidad [55]. Normalmente los sensores que utilizan NPs de oro o plata se basan en los efectos colorimétricos (basados en la agregación de las NPs) o los efectos plasmónicos (basados en el fenómeno de la LSPR). El índice de refracción (RI) es una medida del cambio de longitud de onda del pico de la LSPR, es decir, cuanto más se desplaza el pico para

pequeñas variaciones del RI, más sensible es el biosensor [55]. Usando el efecto de la LSPR, las NPs de plata obtienen una sensibilidad muy alta, mayor a la descrita para AuNPs, e incluso se pueden realizar mediciones en tiempo real. Debido a esto una de las posibles aplicaciones para aprovechar la alta sensibilidad de las AgNPs es en la detección *in vivo* [53]. Además, Park et al. caracterizaron las propiedades ópticas de las AgNPs por diferentes tamaños, demostraron que las AgNPs esféricas de 7 nm tienen una banda a 410 nm, las NPs de 29 nm la tienen a 425 nm, las NPs de 89 nm exhibieron una banda más ancha con una resonancia máxima de 490 nm. Reportaron que el ancho de banda está relacionado con las distribuciones de tamaño de las NPs [58].

Los avances recientes en la nanotecnología hacen uso de NPs metálicas, específicamente las de plata, en el desarrollo de nuevas formas de diagnóstico y tratamientos médicos eficientes[54]. Las NPs de plata se pueden utilizar como sondas altamente sensibles para la detección y obtención de imágenes de moléculas pequeñas, ADN, proteínas, tejidos e incluso tumores *in vivo*. Las AgNPs con una resonancia de plasmón más fuerte son ampliamente usadas en sistemas para imágenes celulares con agentes de contraste conjugados o encapsulados con AgNPs a través de la modificación de la superficie [9], [54]. Además se ha observado un incremento en el interés en el uso de NPs para mejorar o reemplazar las terapias actuales debido a las ventajas que las AgNPs tienen sobre estas, gracias a que pueden diseñarse para que tengan ciertas propiedades o se comporten de cierta manera según el interés biomédico para el que se requieran[54].

Alula et al., desarrollaron AgNPs cubiertas de citrato (cc-AgNPs) como sonda de detección colorimétrica y espectrofotométrica selectiva y sensible a la creatinina en la orina humana. La concentración de creatinina en orina es un parámetro fisiológico crítico que permite una evaluación de la función renal y el diagnóstico de un amplio espectro de enfermedades. El mecanismo de este sensor se basa en la agregación mediada por creatinina de las cc-AgNPs (en 1 minuto) en condiciones alcalinas (pH 12). La creatinina provoca cambios de color visibles de los coloides cc-AgNPs de manera dependiente de la concentración hasta 10 micromolar, el coloide inicial exhibió un color amarillo, el cual tuvo un cambio significativo a azul oscuro cuando se agregó creatinina y NaOH al medio. Además, la agregación de NPs y los consecuentes cambios colorimétricos, se reflejan en los cambios correspondientes del máximo de absorción en los espectros de UV-Visible. Los análisis

espectroscópicos UV-Visibles de las NPs revelaron que la creatinina provocó una disminución en la intensidad de la banda de la LSPR, que inicialmente estaba centrada en 403 nm, que refleja una reducción en la concentración de cc-AgNP dispersadas individualmente en solución, así como un aumento en la intensidad desplazada hacia el rojo en la banda de la LSPR 670 nm, que refleja un aumento en el tamaño de partícula a través de la agregación. Basados en esta observación, los autores reportan un aumento en el tamaño de la partícula mediado por creatinina, por lo tanto, la simplicidad, el reducido tiempo de ensayo, el bajo costo, la sensibilidad y selectividad de este sensor cc-AgNPs confirman su utilidad como ensayo de control de creatinina en orina humana [59].

La actividad biológica de las AgNPs depende de diversos factores que incluyen la química de la superficie, el tamaño, la forma y morfología de las partículas, su composición, el recubrimiento, la aglomeración, la velocidad de disolución y reactividad en solución, la eficiencia de liberación de iones y el tipo de agentes reductores utilizados en la síntesis de AgNPs, estas características son cruciales y pueden afectar la captación celular, la distribución biológica, la penetración en las barreras biológicas y consecuentemente los efectos terapéuticos resultantes [54].

Se ha reportado que una de las características más influyentes en las actividades biológicas son el tamaño, ya que las partículas de tamaño más pequeño podrían causar más toxicidad que las de mayor proporción, debido a que tienen un área superficial más grande. Así mismo se ha reportado el uso de diferentes tipos de nanoestructuras como nanoesferas, nanocubos, nanoplacas, etc., que proporcionan diferentes resultados de toxicidad. Los recubrimientos químicos y biológicos en la superficie así como la carga superficial también determinan el efecto de toxicidad en las células. Por ejemplo, se ha reportado que la carga superficial positiva de las AgNPs las hace más adecuadas para usos biológicos, ya que les permite permanecer por más tiempo en el torrente sanguíneo en comparación con las cargadas negativamente [54].

Una de las propiedades biológicas de mayor interés de las NPs de plata es su actividad anticancerígena. Aunque actualmente existen muchos agentes quimioterapéuticos para diferentes tipos de cáncer, representan un proceso tedioso y con indeseables efectos secundarios. Debido a esto muchas investigaciones se están enfocando en el desarrollo de nanomateriales que puedan dirigirse específicamente a las células tumorales como herramienta alternativa a los tratamientos

convencionales [54]. Hay diversos mecanismos anticancerígenos inducidos por AgNPs, uno de ellos se debe a la capacidad de estas de absorber proteínas citosólicas en sus superficie, esto influye en la función de los factores intracelulares y que pueden regular la expresión génica. Se ha reportado que las AgNPs podrían alterar la regulación de más de mil genes, entre los más importantes la metalotioneína, la proteína de choque térmico y las familias de histonas. Otro mecanismo se basa en la muerte celular inducida por autofagia, el cual es un proceso crítico de degradación celular que si se presenta en niveles elevados, puede promover la muerte celular; las AgNPs son capaces de inducir la autofagia en células cancerígenas [60]. El mecanismo más importante de la toxicidad por AgNPs es el ocasionado por niveles excesivos de iones intracelulares que aumentan la producción de ROS. La producción descontrolada de estos radicales libres pueden provocar lesiones celulares graves como daños en el ADN y muerte celular apoptótica relacionada con las mitocondrias [54]. Además de estos mecanismos, las NPs de plata han mostrado propiedades antiproliferativas, la cual se debe a su capacidad de dañar el ADN, romper cromosomas, producir inestabilidad genómica y alterar la homeostasis de calcio (Ca^{2+}), lo que induce la apoptosis y provoca inestabilidad en el citoesqueleto, que a su vez bloquea el ciclo celular y la división, promoviendo la actividad antiproliferativa de células cancerosas [9].

La aplicación de AgNPs en cáncer se divide en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Inicialmente, las NPs de plata se han utilizado para desarrollar biosensores para la detección de p53 en suero en células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Zhou et al desarrollaron un biosensor basado en la LSPR para la detección de esta proteína en suero. La detección de p53 puede desempeñar un papel importante en el diagnóstico serológico de tumores ya que la sobreexpresión de esta contribuye a la división celular continua y al cáncer. El nanosensor consta de una matriz triangular de AgNPs de una sola dimensión de 120 nm de ancho en el plano y 45 nm de altura, funcionalizados con la formación sobre la superficie de la nanopartícula de una monocapa autoensamblada de 1-octanotio (1-OT) 2 mM/ 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) 1 mM y posteriormente incubado en una solución de anticuerpo monoclonal p53 de ratón para unir el anticuerpo a la superficie de las NPs para la formación del nanobiosensor Ag-p53. Posteriormente, se colocaron 40 microlitros de suero humano sobre la superficie del biochip funcionalizado, este proceso se muestra en la Figura 9. Los autores observaron una diferencia significativa

en los cambios de la LSPR entre las muestras de pacientes con cáncer y el control; el biosensor no mostró respuesta al control, mientras que mostró una diferencia obvia al suero HNSCC. Estos resultados indican las perspectivas de la aplicación del chip sensor de la LSPR en el diagnóstico serológico de tumores [61].

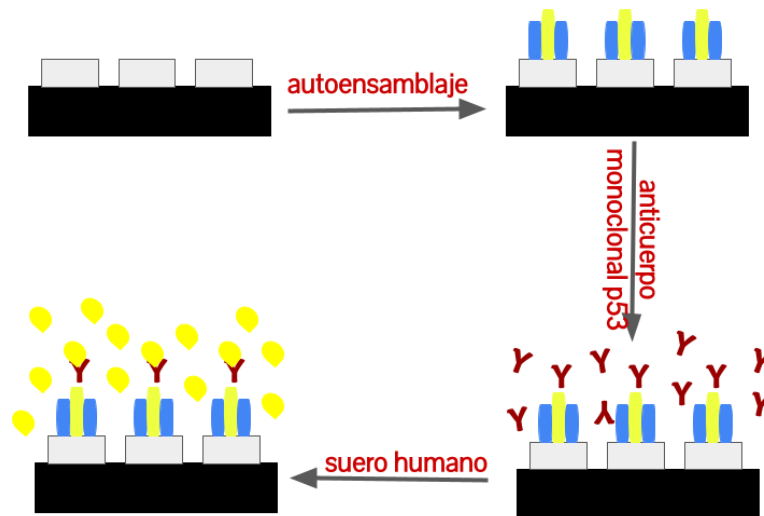


Figura 9. Representación esquemática del nanobiosensor basado en LSPR que muestra su exposición a muestras humanas. Imagen modificada de [61].

Un ejemplo más reciente del uso de NPs en biosensores para el diagnóstico del cáncer es el reportado por Li et al., quienes desarrollaron una nanosonda de ADN con mancuernas de doble aleta funcionalizadas con nanoclusters de plata (ADN-AgNC) para la detección fluorimétrica del marcador de cáncer Flap endonucleasa 1 (FEN1). Esta enzima está involucrada en la reparación y replicación del ADN y se ha reportado que puede catalizar la eliminación de ADN monocatenario alargado en el extremo 5' de las estructuras bifurcadas, esta estructura se denomina "colgajo 5'", además se sobre expresa en células cancerosas altamente proliferativas, y su regulación a la alza se relaciona con la agresividad del tumor, por lo que ha sido reconocida como un marcador de diagnóstico prometedor. La nanosonda se diseñó con una conformación de mancuerna de doble aleta, donde en su aleta 5' se produjo con ADN-AgNC y la aleta 3' se alargó con una secuencia rica en guaninas (SRG). Debido al diseño de la nanosonda, los ADN-AgNC y el SRG están muy cerca, resultando en una alta fluorescencia debido a la activación de los ADN-AgNC inducida por la cercanía con SRG. Cuando se adiciona FEN1 al medio, el colgajo 5' de la nanosonda se escinde debido a la actividad de endonucleasa específica de FEN1, y se rompe la proximidad entre los ADN-AgNC y los SRG, provocando una disminución en la fluorescencia, como se muestra en la Figura 10, de esta manera se puede cuantificar rápidamente

FEN1 utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia, evitando otras técnicas de detección más lentas y que necesitan varios pasos [62].

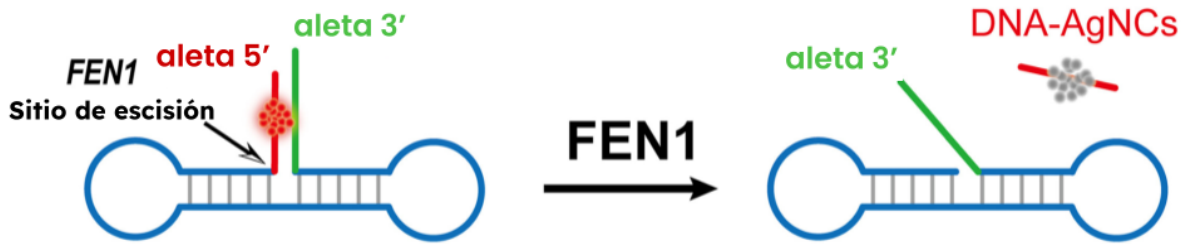


Figura 10. Principio de la nanosonda en la detección de FEN1. La nanosonda fue diseñada para responder a FEN1, que escindirá los ADN-AgNC en el extremo 5' para separarlos del GRS. Esquema modificado de [62].

Por otro lado, se ha abordado el uso terapéutico de estas NPs para la administración dirigida, agentes quimioterapéuticos y como potenciadores de la radioterapia y la terapia fotodinámica. La terapia mediada por NPs puede considerarse como una alternativa adecuada en la terapia del cáncer. Las AgNPs tienen la capacidad de dirigirse a las células enfermas o tejidos tumorales específicos y se han utilizado como sistemas de administración de fármacos [54].

Un ejemplo del uso terapéutico de las NPs de plata es el reportado por Azizi et al., quienes desarrollaron agentes anticancerígenos mediante la síntesis de NPs cubiertas de albúmina (ASNP) y evaluaron sus efectos anticancerígenos frente a la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231. La proteína de albúmina es un transportador de fármacos dominante en el suero y hace posible el direccionamiento específico de fármacos a las células tumorales cuando se conjuga con NPs; esto conduce a efectos menos tóxicos en las células no cancerosas. Además, debido a la mayor tasa de metabolismo en las células cancerosas, la absorción de albúmina ocurre más que en las células normales. Los autores reportan que tanto las AgNPs solas, como las ASNP inhibieron significativamente la proliferación de líneas celulares MDA-MB-231, sin mostrar efecto notable en las células mamarias normales. La citotoxicidad de los ASNP contra las células de cáncer de mama fue de 14 veces mayor que su citotoxicidad sobre las células normales; la razón de esta intensificación puede relacionarse con la captación mejorada de AgNPs a través de los receptores específicos de albúmina. En las células cancerosas tratadas se observaron variaciones tales como la pérdida de la integridad de la membrana, la inhibición del crecimiento celular, la condensación citoplasmática y la creación de formas curvas,

así como la generación de ROS. Estos cambios muestran que la vía de muerte celular en este tratamiento es la apoptosis, lo que indica su aplicabilidad como fármaco quimioterapéutico por ende los ASNP deben considerarse como una agente anticancerígeno eficaz [63].

Otra propiedad biológica importante y las más representativa, de las NPs de plata es su actividad antibacteriana. Se ha reportado que los iones de plata y las formulaciones a base de plata (a granel o en escala nanométrica) son extremadamente dañinos para los microorganismos [64]. Las AgNPs son consideradas un potencial agente antibacteriano debido a que puede causar toxicidad para las bacterias e interrumpir selectivamente las vías de regulación metabólica de los microorganismos, incluso en concentraciones muy bajas [64]. Las NPs de plata exhiben una fuerte toxicidad para una amplia gama de microorganismos. Se ha reportado en estudios científicos desde hace mucho tiempo que los iones de plata que fluyen de las AgNPs cuando se oxidan, son mortales para las bacterias por lo que estas NPs se han utilizado ampliamente como agentes antimicrobianos en la industria de la salud, cosméticos, almacenamiento de alimentos, recubrimientos textiles, detergentes, aerosoles y en diferentes aplicaciones ambientales [53].

Se ha reportado que las AgNPs exhiben toxicidad específica, donde las vías involucradas en la actividad antibacteriana en medios biológicos dependen de su forma y sus propiedades fisicoquímicas y son estas características las que determinan su acción antimicrobiana [64], [65]. Una de estas propiedades es el tamaño, las NPs de menor tamaño se disuelven más rápidamente en el medio y por lo tanto poseen una mayor actividad antibacteriana, además las NPs pequeñas se transportan a las células mucho más rápido que las de mayor tamaño y tienen una mayor superficie disponible y activa, ideal para la interacción con diversos tipos de bacterias [64], [66].

Se ha reportado que, las NPs más pequeñas tienen una capacidad superior para penetrar en las bacterias; las interacciones con las membranas y el daño resultante, que conduce a la muerte celular, son en AgNPs de menor diámetro y potencial zeta positivo. Las fuerzas electrostáticas que se desarrollan cuando las NPs con carga positiva se encuentran con bacterias con una carga superficial negativa promueven una mayor atracción e interacción entre las dos entidades y posiblemente la penetración en las membranas bacterianas. La carga positiva junto con el tamaño de las NPs es un parámetro fundamental para controlar la actividad antimicrobiana y las NPs más eficaces tienen un potencial zeta positivo y un tamaño reducido [67].

A medida que disminuye el tamaño de las partículas, la relación entre el área superficial y el volumen aumenta considerablemente, como consecuencia las propiedades de las NPs son notablemente diferentes a las de este mismo material a granel [67]. Se ha observado que a medida que aumenta la relación superficie-volumen, también cambia el comportamiento de dominancia de los átomos en la superficie de la nanopartícula, que es un factor importante en el desarrollo de sus diferentes propiedades [64]. El tipo y cantidad de interacciones de las superficies bacterianas con las AgNPs también se ven influenciadas por esta relación, debido a la escala nanométrica, estas interacciones se facilitan y determinan una mayor actividad antibacteriana [67].

Otra característica importante de las AgNPs que le confiere sus propiedades antibacterianas es la forma de la nanopartícula. Pal et al., estudiaron el efecto de NPs con formas esféricas, triangulares y bastoncillos contra *E. coli*. Demostraron que todas tenían actividad antibacteriana, siendo las NPs triangulares cualitativamente más efectivas [68]. Además de las propiedades antes mencionadas, también influyen otras como los agentes de protección que se utilizan para modificar la superficie de las NPs, el recubrimiento de la nanopartícula, ya que esto puede afectar la cinética de disolución y la liberación de iones de plata activos de la superficie de la AgNP. Además de estas propiedades intrínsecas de las NPs, el medio circundante puede influir en la liberación de iones de plata; la presencia de componentes orgánicos e inorgánicos en el medio puede afectar la disolución de las NPs al propiciar la agregación de las AgNPs o formar complejos con iones de plata [64], [69].

Aunque el efecto antibacteriano de las NPs de plata ha sido reportado ampliamente, su mecanismo de acción aún no se ha dilucidado por completo. La potente actividad antibacteriana contra microorganismos morfológicamente diferentes parece estar correlacionada con un mecanismo multifacético mediante el cual las NPs interactúan con los microbios. El hecho de que la resistencia bacteriana a la plata elemental sea extremadamente rara, destaca la presencia de múltiples mecanismos bactericidas que actúan en sinergia [67]. Se han propuesto diferentes mecanismos citotóxicos que ocasionan daños en las funciones celulares, que en última instancia conduce a la necrosis y muerte celular, estos mecanismos se ven influenciados por parámetros críticos como la liberación de iones, el área superficial, la carga superficial, concentración y estado coloidal [65], [67].

El mecanismo principal de las NPs de plata se basa en su alta área superficial que permite la liberación de iones de plata Ag^+ . Las AgNPs en un ambiente acuoso se oxidan en presencia de oxígeno y protones, liberando iones a medida que se disuelve la superficie de la partícula [9]. El efecto antimicrobiano surge de la interacción de los iones Ag^+ cuando se unen a proteínas y ácidos nucleicos cargados negativamente, al interactuar con una serie de grupos funcionales como tioles, fosfatos, hidroxilos, imidazoles e indoles [67]. Debido a la atracción electrostática y la afinidad por los grupos azufre, los iones de plata pueden adherirse a la pared celular y la membrana citoplasmática; los iones adheridos pueden modificar la permeabilidad de la membrana citoplasmática y provocar la ruptura de la envoltura bacteriana [69]. Cuando los iones ingresan a las células bacterianas, pueden destruir una variedad de estructuras celulares que ocasionan cambios estructurales y deformaciones en la pared, membranas y ácidos nucleicos de la célula bacteriana; además afectan los procesos de respiración celular provocando la muerte bacteriana al interactuar con grupos tiol de enzimas y proteínas críticas en estos procesos [9], [66]. Otra consecuencia de la unión de iones de plata con grupos tioles de las proteínas es la formación de enlaces estables que pueden alterar la estructura 3D de las proteínas y bloquear los sitios de unión. Consecuentemente los iones de plata pueden afectar el transporte y liberación de potasio (K^+) y bloquean la síntesis de ATP. Además, los iones pueden coordinarse con otras biomoléculas como ADN, ARN y péptidos lo que dificulta la división y reproducción celular [65].

Además de poder liberar iones de plata, las NPs pueden matar bacterias por sí mismas. Las AgNPs pueden acumularse en los hoyos que se forman en la pared celular después de anclarse en la superficie celular y causar daños morfológicos como modificar la permeabilidad de las bacterias, la contracción del citoplasma y la desnaturalización de la membrana celular, que conlleva al daño de los orgánulos e incluso provocar la lisis celular [67], [69]. Este efecto está influenciado por las características fisicoquímicas mencionadas anteriormente; gracias a su tamaño nano tienen la capacidad de penetrar las paredes celulares y cambiar la estructura de su membrana. Además, las NPs de plata pueden participar en la transducción de señales bacterianas que pueden conducir a la apoptosis celular y la finalización de la multiplicación celular [69].

Se ha reportado que con el tratamiento con AgNPs cargadas positivamente, la carga negativa superficial de las bacterias se movió hacia la neutralidad, lo que alteró la

permeabilidad de la membrana celular y posteriormente provocó la muerte celular, además de presentar ondulaciones en la superficie, grandes espacios en la membrana y una gran cantidad de desechos celulares [65]. Asimismo, la adhesión de AgNPs en la superficie bacteriana, suscitado por la atracción electrostática por la diferencia de cargas entre las AgNPs y la membrana bacteriana, ocasiona otros mecanismos perjudiciales para la célula como el aumento de la rigidez de la membrana y descomposición de esta, así como de ácidos grasos, proteínas y carbohidratos. Además las NPs pueden unirse a las proteínas de membrana, como proteínas de la cadena respiratoria y de transporte, e interferir en la permeabilidad de la membrana, que ocasiona la fuga de contenido celular, la cadena de respiración, la división celular y el transporte de iones [65]. Las NPs de plata también pueden penetrar en las bacterias e interactuar con estructuras celulares y biomoléculas importantes, lo que lleva a la inhibición de la transcripción, el proceso de traducción, la síntesis de proteínas y la interrupción del funcionamiento celular [65]. Se ha reportado que las AgNPs más pequeñas y anisotrópicas, con área de superficie más grande mostraron más toxicidad y exhibieron una tasa de liberación de iones más rápida debido a la alta energía superficial que se origina en las formas muy curvas de las NPs. Esto quiere decir que la actividad antibacteriana de las AgNPs se atribuye tanto a sus propiedades fisicoquímicas como a la elución de los iones de plata [9], [67].

Las NPs de plata también generan un efecto tóxico causado por el aumento del estrés oxidativo, inducido por la liberación de ROS, formando radicales libres con una poderosa acción bactericida. En primer lugar, cuando entran en contacto con las células, estos radicales libres tienen la capacidad de generar poros que conducen a la muerte celular [9], [67]. En segundo lugar, las AgNPs y los iones de plata pueden servir como catalizadores para generar radicales libres en presencia de oxígeno disuelto, así como interrumpir los mecanismos de eliminación al unirse directamente a grupos tiol en enzimas relacionadas con estos mecanismos, lo que da como resultado concentraciones aumentadas de ROS y radicales libres [65]. Una cantidad excesiva de radicales libres puede causar daño directo en la membrana mitocondrial y reaccionar con los componentes del ADN, causando la rotura de la cadena sencilla del ADN, así como provocar la hiperoxidación de proteínas, lípidos, ADN y membrana celular [65]. Los mecanismos mencionados anteriormente se ven representados en la Figura 11.

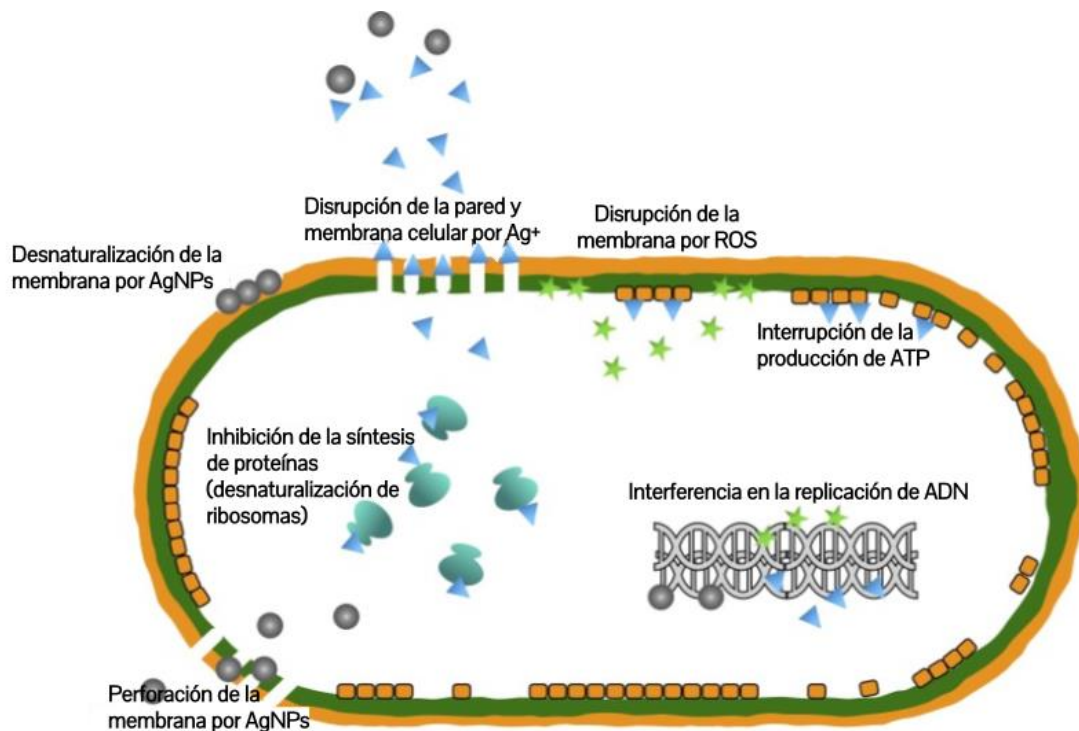


Figura 11. Mecanismos de actividad antibacteriana de las NPs de plata. Esquema modificado de [69].

Las NPs de plata se han utilizado ampliamente como capa antibacteriana en aplicaciones terapéuticas, como implantes cardiovasculares, apósitos para heridas, catéteres, implantes ortopédicos, compuestos dentales, etc. Por ejemplo, los catéteres utilizados en el entorno hospitalario tienen una gran tendencia a la contaminación, lo que puede provocar complicaciones indeseables; en este caso las AgNPs se ha utilizado como recubrimiento para disminuir el desarrollo de biopelículas en los catéteres [4]. Por otro lado, los apósitos con AgNPs se han utilizado para tratar diferentes lesiones; estos apósitos redujeron considerablemente el tiempo terapéutico de las lesiones mientras aumentaban la eliminación bacteriana [4]. Además de las aplicaciones médicas, el efecto citotóxico de las AgNPs se ha utilizado ampliamente en la industria sanitaria y alimentaria, en el almacenamiento y envasado de los alimentos para evitar su contaminación por más tiempo y la detección ambiental [9]. Un ejemplo del uso de NPs de plata en la industria alimenticia es el reportado por Tavakoli et al., quienes estudiaron el efecto de los envases con nanoplata en el aumento de la vida útil de algunos frutos secos (nueces, almendras, avellanas y pistachos), con el objetivo de prevenir las contaminaciones microbianas. Evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de AgNPs (0, 1%, 2% y 3%) sobre las muestras de los 4 tipos de nueces durante 24 meses. Los autores reportan que las

diferentes concentraciones de nanoplata redujeron significativamente el recuento microbiano total, así como el recuento de coliformes y moho en comparación con el grupo control, siendo la concentración de AgNPs al 3% la más eficaz. Gracias a la inhibición del crecimiento del moho, también se evitó la producción de aflatoxinas que son un tipo de toxinas producidas por algunos hongos en cultivos agrícolas como los frutos secos y pueden contaminarse en la cosecha o en el almacenamiento [70]. Los autores también reportan el aumento de la vida útil de las nueces, reportando tiempos de vida de 20, 19, 18 y 18 meses para pistachos, almendras, avellanas y nueces, respectivamente, en comparación con la vida útil de los grupos control que fue de 13 meses. De este estudio concluyen que el uso del empaque con AgNPs desarrollado es eficaz para aumentar la vida útil de las nueces y evitar la contaminación microbiana. Sin embargo, la posible introducción de la plata en los frutos secos no se investigó en este estudio, por lo que se necesita considerar esta posibilidad así como el efecto sobre la salud humana [71].

Pluta-Kubica et al. [72], reportan el desarrollo de una película de furcellarano, un biopolímero también conocido como carragenina proveniente de la pared celular de las algas rojas, con NPs de plata como un envase biodegradable y alternativo a los materiales a base de petróleo. Esta película biodegradable se probó para el almacenamiento de dos tipos de queso, uno de cuajo (gouda), que se produce y distribuye con una corteza seca que se puede recubrir con ingredientes a base de parafina para su conservación; el otro queso probado fue de tipo ácido (quark), el cual tiene una vida útil limitada debido a que su composición química constituye un medio perfecto para el crecimiento de microorganismos. Los resultados de los análisis microbiológicos en ambos quesos reportan que el número de *Lactococcus* y el recuento total de bacterias no difirieron durante el almacenamiento de gouda pero sí disminuyeron en las muestras de quark. Por otro lado, el uso de la película desarrollada retrasó e inhibió el crecimiento de levaduras y mohos en gouda y quarks respectivamente. Con estos resultados los autores concluyeron que la película activa utilizada mejoró la calidad microbiológica de ambos quesos durante el almacenamiento debido a la presencia de AgNPs. Este estudio también reporta la migración de NPs de plata a los alimentos, en gouda estaba presente en la parte exterior de la muestra a 3.897 ± 1.75 mg/kg, mientras que en el quark se encontraba tanto en la corteza (0.717 ± 0.690 mg/kg) como en el interior (0.036 ± 0.023 mg/kg), sin embargo los autores consideran que estos niveles no representan una amenaza

para la salud humana y que vale la pena continuar la investigación para la mejora de esta película biodegradable con AgNPs [72].

Otra aplicación relevante donde se puede aprovechar la actividad antibacteriana de las AgNPs es asociándose con antibióticos clásicos, siendo una alternativa a la disminución de la eficacia de estos. La administración de pequeñas cantidades de AgNPs en combinación con antibióticos puede reducir la dosis requerida de antibióticos para lograr el mismo efecto. Se ha reportado que la acción sinérgica de las AgNPs y los antibióticos resultó en efectos antibacterianos mejorados y puede dificultar el desarrollo de resistencia bacteriana gracias a la cantidad reducida de antibiótico administrado [67].

Un ejemplo de la relación sinérgica de las AgNPs y los antibióticos es la reportada por Awad et al. [73], quienes desarrollaron NPs de plata combinadas con vancomicina contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), la cual se considera una de las bacterias multirresistentes más graves del mundo. La vancomicina es el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones por SARM en todo el mundo, sin embargo, el aumento de infecciones por esta bacteria patógena en los hospitales culminó en el uso generalizado de vancomicina propiciando menor sensibilidad por parte de SARM. Debido a esto, los investigadores buscan evaluar la actividad antibacteriana de las AgNPs solas y cuando se combina con vancomicina. La concentración inhibitoria mínima (MIC) de vancomicina y AgNPS frente a SARM fueron de 1.56 y 3.13 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Este estudio demuestra que las AgNPS tienen actividad antibacteriana contra esta bacteria multirresistente y se reporta que el tamaño de las NPs tiene influencia en la interacción con las bacterias, ya que debido al tamaño reducido tienen más probabilidades de interactuar con las bacterias, como se ha mencionado anteriormente. Cuando se combinó vancomicina con las NPs se observó un efecto sinérgico y se redujo la MIC a 0.39 $\mu\text{g/ml}$. La influencia sinérgica puede deberse a que las AgNPS entregan el fármaco a la célula gracias a que la membrana celular es de naturaleza hidrófoba al igual que las NPs, mientras que la vancomicina es hidrofílica, por lo tanto, las AgNPS pueden atravesar la membrana celular y administrar fácilmente el antibiótico a la célula. Este estudio confirma que algunos antibióticos como la vancomicina puede aumentar su bioactividad y biodisponibilidad al conjugarse con AgNPs, lo que conduce al desarrollo de nuevos fármacos basados en este sistema [73].

Las NPs de plata tienen la capacidad de interactuar con varios microorganismos y afectar el crecimiento de biopelículas bacterianas maduras, las cuales son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie sólida, estas células se encuentran embebidas dentro de una matriz de producción propia de sustancia polimérica extracelular [67]. De hecho, las propiedades de las biopelículas son similares a las propiedades de un polímero y no a las propiedades de una suma de células y se desarrollan en sistemas acuáticos como tuberías de agua, en los dientes y dispositivos médicos y son particularmente difíciles de manejar [67].

Gracias a las propiedades antibacterianas eficaces de las AgNPs frente a distintos tipos de bacterias y las biopelículas que forman, pueden utilizarse como un antimicrobiano de amplio espectro [67]. Ya que las AgNPs son muy diversas en tamaño, forma y química de superficie, la comprensión de cómo estos factores afectan sus actividades antibacterianas permitirá ampliar aún más sus aplicaciones [65]. Finalmente, los estudios sobre el uso combinado de AgNPs con otros agentes antimicrobianos pueden ayudar a reducir el problema de toxicidad y evitar el desarrollo de resistencia y sobre todo potenciar el efecto microbicida, lo que los convierte en agentes prometedores para combatir infecciones en distintas áreas de aplicación [67].

2.4 Principales métodos de síntesis de nanopartículas

Los métodos de síntesis de NPs se dividen en dos categorías, las técnicas de “arriba hacia abajo” y “de abajo hacia arriba”, que se resumen en la Figura 12. En la primera clasificación se encuentran aquellas técnicas que comienzan con un bloque de material que se descompone en partículas para darle el tamaño y la forma deseada; la mayoría de estas técnicas consisten en métodos físicos como trituración, molienda, pulverización catódica y ablación térmica/láser [5], [11]. Estos métodos físicos presentan desventajas como que requieren mucha energía y costosos sistemas y equipos para preparar las NPs, además de que las NPs producidas por estos métodos no reúnen las características deseables [74].

En los métodos de abajo hacia arriba, las NPs se ensamblan a partir de unidades más pequeñas, ya sea átomos o moléculas, para formar estructuras más grandes. La ventaja de utilizar este tipo de técnicas es que las NPs metálicas resultantes tienen características físicas más deseables (tamaño, morfología, cristalinidad, etc.) y una

composición química más homogénea en comparación con las obtenidas por métodos físicos [5], [74]. La síntesis “de abajo hacia arriba” se basa principalmente en metodologías químicas y biológicas.

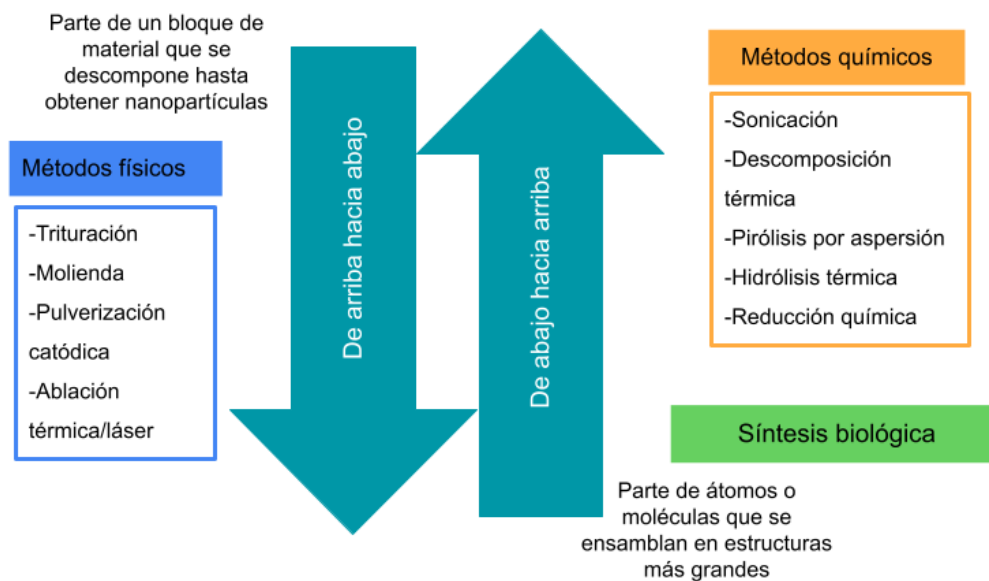


Figura 12. Clasificación de los métodos de síntesis de NPs.

2.4.1 Métodos químicos

Los métodos de síntesis química son los más utilizados para la obtención de NPs, incluye técnicas como sonicación, descomposición térmica, pirólisis por aspersión, hidrólisis térmica y reducción química, siendo esta última la más utilizada [75]. La reducción química se basa en el uso de productos químicos orgánicos e inorgánicos para la síntesis de partículas de metal coloidal. Los principales agentes reductores son el borohidruro de sodio o citrato de sodio sin embargo, la lista de agentes químicos no se limita a estos; dichos agentes reducen los compuestos metálicos y conducen a la formación de NPs [5]. El agente reductor es un factor importante en esta metodología, así como la presencia de un agente estabilizador/protector en la reacción, que evita la aglomeración de las NPs preparadas, estos factores, incluyendo la concentración de los iones metálicos, determinan el control del tamaño y la forma de las NPs [11].

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales de NPs a partir de la reducción de iones metálicos consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento y se muestran en la Figura 13. El tamaño y la forma de las NPs dependerá de las velocidades relativas de estos procesos, las cuales pueden ser controladas al

modificar los parámetros de reacción como la temperatura, el pH, concentración, etc., [76]. La formación de NPs se basa en la reducción de la sal metálica, que actúa como precursor, al correspondiente átomo metálico cero valente, que puede considerarse como la unidad de construcción de las NPs. Posteriormente, la nucleación ocurre cuando la concentración de unidades de construcción alcanza el nivel de saturación; estas unidades (átomos) actúan como centros de nucleación dando lugar a racimos químicos que seguirán creciendo mientras se mantenga el suministro de átomos formados. El crecimiento se da después del periodo de nucleación hasta que las especies en reacción alcanzan el equilibrio. Sin embargo, los coloides metálicos solo son estables cinéticamente, por lo que se necesitan moléculas estabilizadores que se absorban a la superficie y evitar la aglomeración [77], [78].

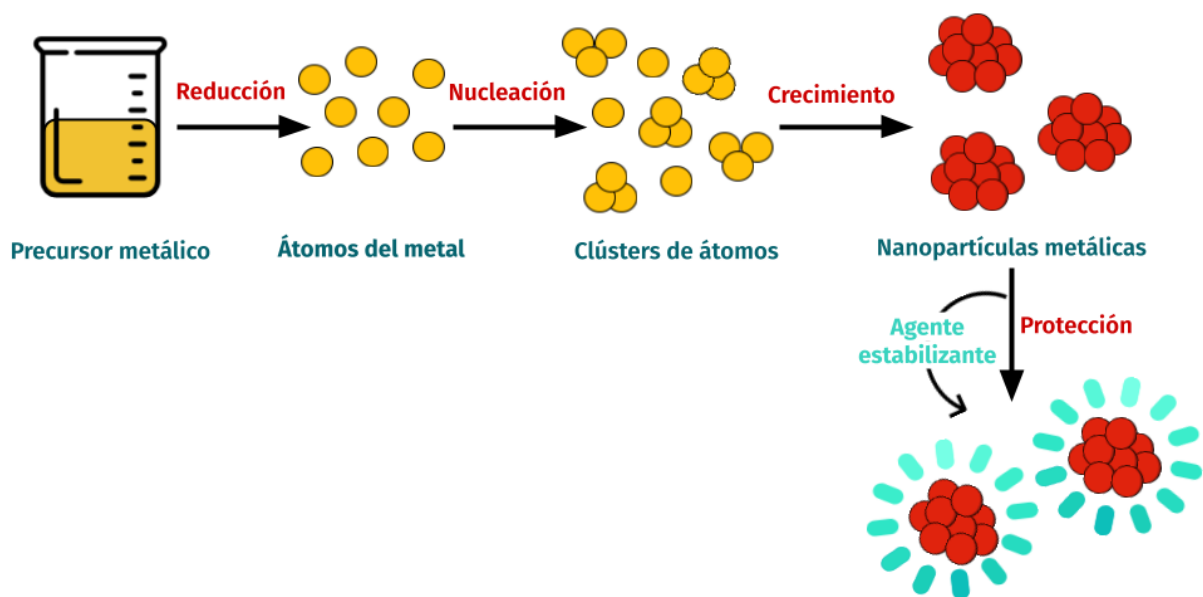


Figura 13. Mecanismo de formación de las NPs metálicas por reducción de iones.

Aunque los métodos químicos han demostrado ser técnicas eficientes para el desarrollo de NPs metálicas, presentan una serie de desventajas que hace que el uso de estas metodologías se cuestione cada vez más. Los solventes no polares, agentes reductores químicos u otros aditivos utilizados para la estabilización de las NPs, además de ser agresivos, son costosos y pueden producir productos secundarios sumamente tóxicos [44]. Es esta toxicidad de las nanoestructuras preparadas el principal inconveniente del uso de estas técnicas ya que afecta tanto al medio ambiente e incluso a los humanos, además el uso excesivo de estas sustancias dificultan los aspectos de aplicación de las NPs obtenidas por estos métodos, sobre todo en el área clínica [5], [74]. Es por eso que actualmente las investigaciones se

enfocan en desarrollar métodos económicos, biocompatibles y no tóxicos que sustituyan a las técnicas tradicionales para la síntesis de NPs.

2.4.2 Métodos biológicos

La síntesis verde, también conocida como síntesis biológica, de NPs se basa en el uso de material biológico y se consideran tres aspectos principales que la diferencian de los métodos físicos y químicos: el medio solvente, uso de agentes reductores no tóxicos y uso de estabilizadores de NPs ambientalmente seguros [79].

La bio-reducción es un proceso fundamental en este tipo de síntesis, la naturaleza de los reductores, así como de la concentración de estabilizadores en la reacción de síntesis definen la estabilidad, tamaño, forma y morfología de las NPs metálicas obtenidas y consecuentemente sus propiedades y campo de aplicación [80]. Se ha reportado que el uso de técnicas verdes en la preparación de NPs, genera NPs estables y con la facilidad de poder controlar el tamaño y forma deseada mediante el ajuste de ciertos parámetros de síntesis [75].

La síntesis verde implica la reducción de iones metálicos utilizando masa o extractos biológicos como agente reductor, los constituyentes pueden ser de naturaleza intracelular o extracelular siendo ventajoso este último porque minimiza los pasos de procesamiento posteriores. Se pueden utilizar levaduras, bacterias, hongos, virus, microalgas y plantas; las biomoléculas presentes en el material vegetal funcionan como estabilizadores, por lo que no se necesitan aditivos cuando se utiliza esta técnica de síntesis [5], [11].

Para ejemplificar la variedad de microorganismos en la síntesis de NPs, se rescata la investigación de Kaler et al. [81], donde utilizan *Saccharomyces boulardii*, una levadura comercial y de fácil acceso, en la síntesis de NPs de plata; este equipo de investigación reporta el uso de extracto libre de células (ELC) de *S. boulardii* al que se le añade nitrato de plata 1 mM, en una reacción a 35 °C y agitación en un ambiente oscuro durante 72 horas, reportan un cambio de color en la reacción de incoloro a marrón que indica la formación de las AgNPs y describen las NPs resultantes como pequeñas, uniformes, de naturaleza monodispersa y de rápida síntesis; además atribuyen la estabilización de la sal metálica a biomoléculas como proteínas, enzimas y aminoácidos presentes en el ELC y destacan que esta técnica resulta prometedora al evitar procesamientos posteriores tediosos y su aplicación en diferentes áreas de interés [81].

Por otro lado, Husseiny et al. [82], reportan el uso de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* para la biosíntesis de NPs de oro, en esta investigación se utilizaron tres cepas diferentes de *P. aeruginosa*: *P. aeruginosa* ATCC 90271, *P. aeruginosa* (1) y *P. aeruginosa* (2), la síntesis de AuNPs se realizó con tetracloroaurato de hidrógeno que se mezcló con 50 ml de sobrenadante libre de células y se incubó a 37 °C por 24 horas, reportan un cambio de color de amarillo pálido a azul pálido, rosa oscuro y rosa vino para *P. aeruginosa* ATCC 90271, *P. aeruginosa* (2) y *P. aeruginosa* (1), respectivamente y mencionan que el color cambia de rosa a azul a medida que el tamaño de las NPs aumenta; en otras palabras, las AuNPs preparadas con *P. aeruginosa* ATCC 90271 tienen un tamaño mayor que aquellas preparadas con *P. aeruginosa* (1 y 2) [82]. Esta investigación muestra que aun cuando se trata de la misma especie bacteriana, diferencias entre las cepas pueden formar partículas con diferentes características.

Bhambure et al. reportan el uso de hongos *Aspergillus niger* en la síntesis de AuNPs utilizando filtrado acuoso preparado de la fermentación del hongo y solución de cloruro áurico. Los autores reportan un cambio de color a rojo rubí después de 24 horas con NPs resultantes de 12.79 ± 5.61 nm e indican que la suspensión de AuNPs era estable sin ninguna agregación. La estabilidad se la atribuyen a las proteínas que pueden unirse a las NPs a través de los grupos amina libres o residuos de cisteína presentes en las proteínas, debido a la estabilidad de las AuNPs sintetizadas en solución. Este método resulta ventajoso y puede conducir al desarrollo de un bioproceso simple para la síntesis de AuNPs [83].

El método de síntesis biológica tiene distintas ventajas sobre los métodos químicos y físicos mencionados anteriormente. En primer lugar, usando estos métodos se evitan los compuestos tóxicos como el borohidruro de sodio, la hidracina y la dimetilformamida (DMF) [84] y consecuentemente se considera una técnica flexible, ya que puede implementarse en cualquier entorno al no necesitar condiciones de seguridad química extremas y se genera un entorno de trabajo seguro por no utilizar compuestos químicos peligrosos [75]. Además funciona como una alternativa sostenible y económica ya que las sustancias biológicas que son necesarias se usan en cantidades limitadas y se pueden obtener fácilmente [75]. Asimismo, el uso de metodologías biológicas no necesita condiciones de reacción extremas, mientras que en los métodos físicos se necesitan altas temperaturas de hasta 350 °C, en los métodos verdes normalmente se utilizan temperaturas de menos de 100 °C y se

determinan de acuerdo al medio de reacción [5]. En segundo lugar, la síntesis verde es beneficiosa desde el punto de vista de las aplicaciones biotecnológicas y médicas, ya que al no utilizar agentes químicos en la síntesis, permite su aplicación en sistemas biológicos [80]. Finalmente, las NPs sintetizadas por metodologías verdes incorporan metabolitos secundarios en su cubierta, que además de proporcionar estabilidad como agentes estabilizadores, la presencia de estos podría mejorar las bioactividades de las NPs y conferir propiedades catalíticas [85].

2.4.2.1 *Uso de extracto de plantas para la síntesis de NPs metálicas*

Aunque la reacción de reducción en la síntesis verde puede ocurrir *in vivo* utilizando organismos vivos como hongos, bacterias, algas y plantas, la síntesis verde *in vitro* utilizando extractos vegetales es el método más popular de síntesis debido a su simplicidad, bajo costo, facilidad de ampliación y naturaleza ecológica; de hecho la síntesis de NPs se puede lograr utilizando desechos vegetales agrícolas e industriales, que hace que el proceso sea más sostenible [85].

La reacción de síntesis de NPs ocurre cuando el extracto vegetal se mezcla con una solución de sal metálica en condiciones de reacción diversas. Los agentes reductores del extracto donan electrones a los iones metálicos y cuando la sal metálica se disocia, los cationes se saturan para formar complejos hidroxilo. Después de la sobresaturación comienza el crecimiento de las NPs metálicas, las cuales se encuentran en un estado de alta energía superficial y tienden a agregarse entre sí para pasar a su estado de baja energía, hasta la activación del agente protector de los extractos de plantas que se encarga de detener el crecimiento y la agregación de las NPs. La presencia de mayores cantidades de agentes reductores y estabilizadores previene su agregación y promueve la formación de NPs más pequeñas. La reacción de síntesis se completa en pocos minutos [22], [85].

Los extractos vegetales pueden ser obtenidos de diferentes partes de la planta, por ejemplo, el tallo, hojas, flor, frutos, raíz, semilla, etc. La diversidad de opciones para obtener el extracto vegetal, hace que los fitoquímicos o metabolitos secundarios involucrados en la reacción de síntesis abarque una amplia gama de compuestos como proteínas, carbohidratos, flavonoides, fenoles, vitaminas, alcaloides, polifenoles, antioxidantes, ácidos orgánicos, quinonas, etc., [11], [75]. La importancia de estos fitoquímicos presentes en las plantas se debe a su potencial uso en la reducción de metales pesados a su estado de oxidación cero, específicamente

aquellos con propiedades antioxidantes, se consideran una reserva de electrones y sirven como bloques de construcción para la conversión de iones metálicos en NPs, evitando el uso de agentes reductores tóxicos [41]. La formación de NPs mediante extractos vegetales se muestra en la Figura 14.

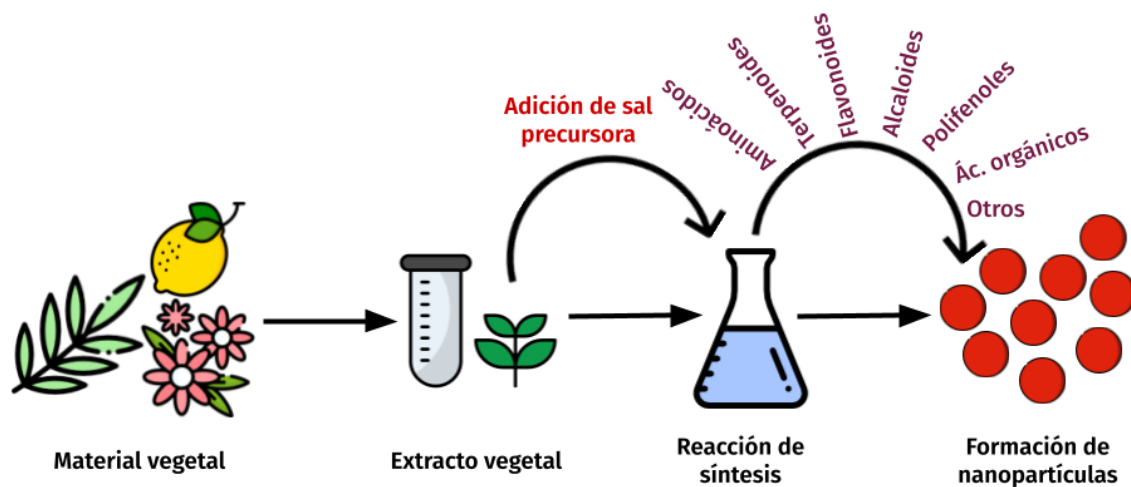


Figura 14. Biosíntesis de NPs a partir de plantas.

El uso de plantas y extractos vegetales para la síntesis verde de NPs, tiene ventajas sobre otros enfoques biológicos como el uso de bacterias y hongos, ya que al utilizar materia prima de fácil acceso, elimina los procesos de cultivo de microorganismo y reduce los tiempos de obtención de NPs de varios días a varias horas [80]. Así mismo el uso de extractos vegetales tiene otras ventajas que considera su uso como una alternativa viable y ecológica para la biosíntesis de NPs. Debido a que el extracto está compuesto de varios metabolitos que pueden ayudar a la reacción, el proceso se vuelve sencillo y con una tasa rápida de síntesis por lo que es una alternativa económica y segura de manejar, además los fitoquímicos presentes en el extracto se aprovechan para obtener NPs más estables y mejor control sobre el tamaño y la forma [5].

Un ejemplo del uso de especies vegetales para la síntesis de NPs metálicas es el reportado por Flores-López et al. [86], quienes utilizaron extracto de *Aloe vera* para la síntesis de AgNPs. Se basan en los datos reportados que sugieren que los extractos orgánicos de esta planta poseen propiedades antioxidantes; sus principales biomoléculas como lignina, hemicelulosa, pectina, flavonoides, polifenoles, ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido acético pueden actuar como agentes reductores y estabilizadores [15]. En esta investigación se enfocan en utilizar el extracto de *A. vera*

en la síntesis de AgNPs así como determinar la actividad fungicida, frente a *Candida* sp., y bacteriana de las NPs sintetizadas frente a diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los investigadores reportan la síntesis de AgNPs de forma esférica y con un tamaño entre 10-70 nm, además mostraron una alta actividad bactericida, principalmente frente a bacterias Gram positivas y actividad fungicida frente a especies de *Candida* [86].

Por otro lado, Morales-Luckie et al. reportan la síntesis de NPs de plata utilizando árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) y muestran su aplicación de forma más tangible al integrarlas en fibras naturales de agave lechuguilla y seda, con el objetivo de desarrollar un hilo de sutura con AgNPs integradas que podría reducir el riesgo de infección y minimizar la necesidad de tomar antibióticos externos. En esta investigación, la síntesis de NPs se realizó sobre la fibra de agave lechuguilla, las fibras se sumergieron en soluciones de nitrato de plata a diferentes concentraciones y posteriormente, se empaparon en soluciones de árnica mexicana y se secaron a temperatura ambiente; así mismo, para comprobar la eficacia de la árnica mexicana como agente reductor, el extracto vegetal se mezcló con nitrato de plata (AgNO_3) durante 10 minutos en condiciones ambientales y se detectó un cambio de color a marrón claro a medida que sucedía la reducción de iones de plata. Los autores reportan que las moléculas responsables de la reducción y estabilización de las AgNPs son aquellas con grupos fenólicos, sin embargo no se cierra la posibilidad de que otro tipo de biomoléculas presentes en el extracto de árnica mexicana estén involucradas en la síntesis debido a sus propiedades antioxidantes. En esta investigación se concluye que la árnica mexicana puede utilizarse en la biosíntesis de AgNPs en fibras de agave lechuguilla y seda, reportan que los hilos que contienen estas NPs son mejores en comparación a los hilos de sutura de seda comerciales, lo que hace que estas fibras naturales con AgNPs integradas sean candidatas interesantes para su uso en procedimientos quirúrgicos [29].

2.4.2.2 Factores que influyen en la síntesis biológica de NPs metálicas

Se ha reportado que la producción de NPs depende totalmente de los métodos de preparación, el ambiente, la temperatura, tiempo de reacción, pH, la naturaleza del extracto utilizado y su concentración; el efecto de estos factores varía de un método a otro y de acuerdo con las sustancias y compuestos que se usen [15].

Algunos de los principales factores que influyen en la síntesis verde son el pH y la temperatura, que afectan el tamaño, la forma y la velocidad con la que se sintetizan las NPs. Esto se debe a la formación de centros de nucleación que aumentan con el aumento del pH y/o la temperatura y se involucran en la reducción de iones metálicos a NPs, favoreciendo la tasa de biosíntesis; además el pH de la solución también influye en la actividad de los grupos funcionales presentes en el extracto orgánico [5]. Otros factores importantes son el tiempo de reacción y la cantidad de extracto utilizado, así como su origen. La concentración de biomasa a menudo decide la eficiencia de la síntesis de NPs; se ha reportado que el aumento de la cantidad de extracto mejora la producción de NPs y modifica su forma [5], así mismo, el tiempo de reacción influye en la forma y tamaño de las NPs sintetizadas [15].

Cada uno de estos factores pueden verse en la necesidad de alterarse cuando otro de los parámetros cambia, principalmente al variar la naturaleza del agente biológico reductor, ya que puede provenir de diferentes orígenes, además de que hay muchos componentes bioactivos presentes en los extractos y es difícil identificar cuáles son los realmente involucrados en el proceso de síntesis. Las condiciones de reacción varían para cada procedimiento por lo que existe una gran diversidad de metodologías reportadas y se está muy lejos de estandarizar los métodos de síntesis verde[11].

Salayová et al., demuestran la influencia del extracto vegetal sobre el tamaño y morfología de NPs de plata sintetizadas por una ruta verde, los autores emplean hojas de lavanda (*Lavandula angustifolia*), orégano (*Origanum vulgare*), semillas de mostaza negra (*Brassica nigra*), hojas de bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*) y raíz de agracejo (*Berberis vulgaris*) con el objetivo de sintetizar AgNPs y determinar el papel del contenido fenólico total (CFT) de los extractos en la síntesis de estas. La reducción de los iones de plata se vio favorecida al utilizar cualquiera de los extractos como agentes reductores, aunque las NPs resultantes tuvieron características diferentes de acuerdo con el extracto utilizado. Reportan que las sintetizadas con extracto de orégano y lavanda son más grandes en comparación con las obtenidas mediante los otros extractos; además muestran granos bastante unimodales y dispersos, mientras que el resto forma aglomerados. Estos resultados se relacionan con la cantidad de CFT, el contenido fenólico es principalmente responsable de la actividad antioxidante y posiblemente de la reducción de las NPs; en este caso se reporta al extracto de orégano como el de mayor contenido fenólico seguido del de lavanda, por lo que las características de las NPs obtenidas con estos extractos

pueden atribuirse a la cantidad de compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes. Este estudio demuestra lo universal que puede ser la síntesis verde al utilizar diferentes extractos de plantas y aporta evidencia sobre la influencia de la diversidad vegetal en las características de las NPs sintetizadas [87].

2.5 Extractos vegetales utilizados en la síntesis y fitoquímicos involucrados

Se ha notado que las plantas y sus partes que tienen aroma o color contienen aminoácidos, flavonoides, aldehídos, cetonas, fenoles, proteínas y distintos grupos funcionales que participan en la síntesis de NPs metálicas. Por lo tanto, deben seleccionarse plantas que contengan al menos uno de los productos químicos mencionados para que participe en la formación de NPs tras la reducción de sus sales precursoras y la estabilización de estas [6], [88]. Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de NPs involucra tres componentes principales que se definen como agentes reductores, agentes estabilizadores y medio solvente. Los fitocomponentes de los extractos vegetales actúan como los dos primeros; además debido a la naturaleza del extracto, estos procesos pueden llevarse a cabo en un medio acuoso en lugar de disolventes orgánicos convencionales [89]. Debido a la variedad de fitoquímicos presentes en los extractos de plantas, es complejo identificar el componente químico exacto responsable de la síntesis y estabilización de las NPs [6]. Sin embargo, se ha sugerido que los grupos OH actúan como agentes involucrados en la formación de las NPs [88]. En esta revisión se abordarán los grupos de fitoquímicos reportados a los que se les atribuye mayor relevancia en la síntesis de NPs, su estructura general se muestra en la Figura 15.

Se ha reportado que los polifenoles de los productos naturales tienen al menos dos grupos hidroxilo y que poseen una capacidad reductora de metales. Los compuestos polifenólicos pueden involucrar los grupos -OH de su estructura tras la formación de un complejo de transición de iones metálicos con los grupos hidroxilo y posteriormente, a través del proceso de oxidación, cambia a una quinona que genera NPs metálicas. Las quinonas operan como agentes tamponadores y ayudan a la coordinación de grupos oxo con las NPs metálicas recién formadas, lo que mejora su estabilidad [6].

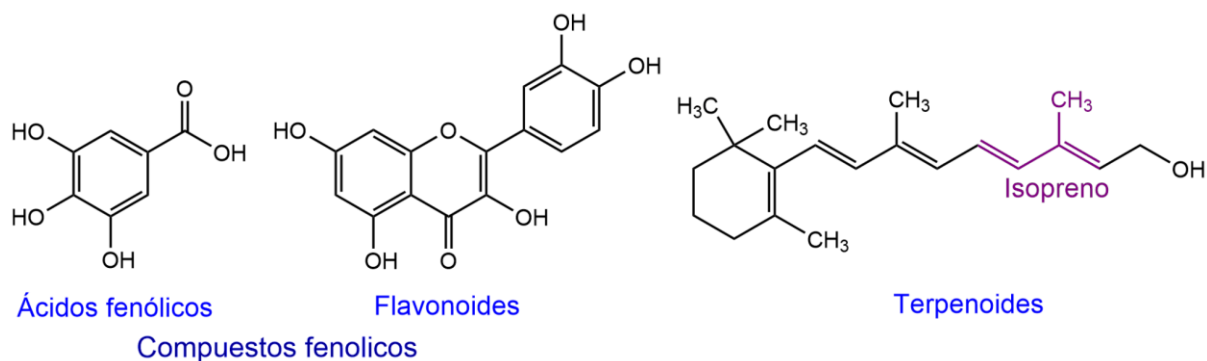


Figura 15. Fitoquímicos principales involucrados en la biosíntesis de NPs.

Otro fitoquímico involucrado en la síntesis de NPs metálicas son los flavonoides, los cuales constituyen los pigmentos vegetales y participan activamente en la supervivencia de las plantas en condiciones ambientales adversas [6]. Aunque los flavonoides pertenecen a una clase de compuestos polifenólicos, comprenden diferentes clases como flavonas, flavonoides, flavonoides, isoflavonas, etc. Los grupos cetona y ácido carboxílico presentes en las flavonoides han sido reportados como los principales actores en la formación de NPs [89]. Su potencial reductor está relacionado con su capacidad de donar átomos de hidrógeno o electrones. Aunque el mecanismo preciso para la reducción de NPs aún no se conoce con claridad, se ha considerado que involucra a los grupos hidroxilos presentes en los flavonoides en la reducción de iones metálicos y la quelación del metal gracias a la presencia de grupos oxo e hidroxilo. Se ha propuesto que los sustituyentes -OH de los flavonoides como la quercetina puede oxidarse a grupos carbonilo durante la reducción de iones metálicos [6]. Además, diversos autores sugieren que las conversiones tautoméricas activas en flavonoides (de forma enol a ceto), pueden liberar un hidrógeno reactivo responsable de la reducción de iones metálicos a sus NPs [6], [89].

Los terpenoides pertenecen a la categoría de terpenos sintetizados naturalmente y son responsables del aroma, sabor y color de varias especies de plantas. Se derivan de los aceites esenciales producidos por las plantas como metabolitos secundarios. Diversos estudios sugieren que estos metabolitos secundarios son los principales sintetizadores de NPs [6], [90]. El isoprenoide es la unidad básica de los terpenoides, la cual es una molécula de hidrocarburo simple, estas unidades se combinan para formar monoterpenoides y sesquiterpenoides y además de estar involucrados en la fabricación de otros metabolitos vegetales, se ha reportado que son los donantes clave para la síntesis de NPs [6]. Los grupos funcionales presentes en los terpenoides

como alcoholes, cetonas, aldehídos y lactonas pueden reducirse y participar en la formación de NPs. La reducción mediada por este tipo de fitoquímicos puede atribuirse a la implicación de grupos carbonilo ($R-C=O$) en una reacción redox, este grupo es de naturaleza aldehídica y se oxida a ácido carboxílico al reducir los iones metálicos a su forma elemental [6], [90]. Además se cree que pueden actuar como moléculas activas en la superficie de las NPs y podrían absorberse en la superficie por la interacción a través de electrones pi o grupos carbonilo, o bien recubrir las NPs evitando su agregación y proporcionando estabilidad durante un tiempo prolongado [90].

2.5.1 Extracto de Canela

La canela (*Cinnamomum zeylanicum* o *Cinnamomum verum*) es un árbol de hoja perenne de la familia Lauraceae, también conocida como canela verdadera, canela de Ceilán, canela mexicana, etc., es una de las especias más antiguas con usos medicinales y culinarios reportados en la literatura antigua desde hace más de 4000 años [91]. La canela es una de las plantas medicinales con diversas actividades farmacológicas que se utilizan con fines sanitarios debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiulcerosas, anticancerígenas, antiséptico, antialérgico, insecticidas, actividades antidiabéticas y anestésicas, entre otras [91].

C. verum es un reservorio rico de fitocompuestos de varias clases como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, hidrocarburos oxigenados, polifenoles, etc. Sin embargo, los principales compuestos identificados en esta especie vegetal pertenecen a dos clases químicas principales: polifenoles y fenoles volátiles [91], [92]. Los polifenoles de la canela contiene principalmente ácido vinílico, cafeico, gálico, p-cumárico y ferúlico, estos compuestos junto con el cinamaldehído y el eugenol, son los principales componentes fitoquímicos de la canela [92]. El cinamaldehído es el componente principal al que se le atribuyen la mayoría de las propiedades medicinales de la canela; dona átomos de hidrógeno a los radicales libres y previene el estrés oxidativo y los trastornos asociados como inflamación, diabetes, cáncer, etc., además tiene el poder quelante de metales [91]. En cuanto a los componentes volátiles, la composición química de los aceites esenciales depende de la parte de la planta de la que se extraen. Se ha reportado que en extractos provenientes de corteza de canela se han identificado compuestos como trans-cinamaldehído, ácido cinámico y procianidinas tipo A y B. El eugenol es el principal componente de extractos de hoja

de canela y en los extractos de flores y fruto, se reportaron (E)-acetato de cinamilo y cariofileno como los componentes principales [91], [92]. Este material vegetal proporciona cantidades significativas de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), que además de estar involucrados en la síntesis de NPs, se les atribuyen las propiedades antioxidantes y antibacterianas [93]. Los extractos, aceites naturales y componentes de la canela muestran actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ha reportado que esta propiedad se debe a fitoquímicos bioactivos como el cinamaldehído y el eugenol y se debe a su naturaleza hidrofóbica que les permite penetrar en las biopelículas e inhiben la colonización y crecimiento de las bacterias [91], [92].

Soni y Prakash reportan la síntesis de NPs de oro y plata utilizando extracto acuoso de canela para el control de larvas de los vectores de la malaria (*Anopheles stephensi*) y el vector de la filariasis (*Culex quinquefasciatus*). Para realizar el extracto la corteza de canela se lavó para eliminar las partículas de polvo y se dejó secar al aire para posteriormente convertirla en polvo. Se preparó un caldo de corteza colocando 10 g de polvo de canela en 250 ml de agua desionizada. Esta mezcla se hirvió a 60 °C por 5 minutos y se filtró. Para la obtención de las NPs metálicas, el extracto se trató con soluciones acuosas de ácido cloroáurico (HAuCl₄) y nitrato de plata (AgNO₃) 1 mM para la formación de NPs de oro y plata respectivamente y se incubaron a temperatura ambiente. La formación de AuNPs y AgNPs se indicó por la coloración morada y café oscuro de las soluciones, respectivamente. Las NPs sintetizadas tenían forma esférica y tamaños promedio de 46.48 nm para las AuNPs y 11.77 para las AgNPs y resultaron eficaces contra las larvas de especies vectores de la malaria y la filariasis. Los resultados obtenidos sugieren que el uso del extracto de canela es eficaz para la obtención de AuNPs y AgNPs y representa un enfoque ecológico ideal para el control de larvas [94].

2.5.2 Extracto de Café

El café (*Coffea arabica*) es un arbusto de la familia de Rubiaceae de importancia mundial, ocupando el segundo lugar después de la gasolina en el mercado internacional [95]. Ha sido reivindicado como una bebida funcional al ser una fuente importante de antioxidantes en la dieta humana. Los estudios con extractos de *C. arabica* han revelado importantes actividades biológicas como propiedades

antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, estimulación del sistema nervioso central, actividad diurética, etc., [96].

Los componentes químicos del café involucran compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), alcaloides (especialmente la cafeína), alcoholes, diterpenoides, carbohidratos, lípidos y compuestos volátiles y heterocíclicos [96]. Los compuestos fenólicos se forman debido a la isomerización, epimerización, lactonización e hidrólisis de los ácidos clorogénicos durante el proceso de tostado. Los ácidos clorogénicos son un tipo de compuestos fenólicos que se obtienen por la esterificación de otros compuestos fenólicos (ácidos transcinámicos) como ácido cafeico, p-cumárico, vainílico, ferúlico y protocatecuico con ácido quínico y melanoidinas [97]. Los compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a restablecer el daño de los radicales libres implicados en diversas enfermedades regenerativas [98]. Además de estos compuestos fenólicos, el café es reconocido por ser una fuente rica de alcaloides, siendo la cafeína el compuesto más representativo de este grupo; está presente en los granos y se le atribuye el amargor de la infusión [96]. Finalmente, los terpenoides son los responsables del aroma característico de esta especie y se encuentran en su contenido compuestos como colesterol, metilpropanal, α -2-furfuriltiol, 4-vinilguayacol, etc., [95]. Se ha reportado que los fitoquímicos presentes en el café dependen de la parte vegetal estudiada. Las semillas de café son ricas en polifenoles como el kaempferol, la quercetina y ácidos como el ferúlico, nicotínico, quinólico, tánico y pirogálico que poseen propiedades antioxidantes, antivirales, antibacterianas, etc., [95]. Los principales fitoquímicos del café como el ácido clorogénico, la cafeína, taninos, el ácido quínico e hidroxicinámicos son responsables de la actividad antimicrobiana del extracto de café ya que generan cambios en la membrana y pared celular bacteriana que generan daños irreversibles y conlleva a la muerte celular. Se ha reportado que el extracto de café tiene una actividad antibacteriana más eficiente frente a bacterias Gram positivas que en Gram negativas [99].

Dhand et al. [97], reportan la síntesis verde de NPs de plata utilizando extracto hidroalcohólico de semilla de café seca y tostada. El extracto se preparó triturando 10 g de semillas tostadas secas y se agitaron con una proporción de 1:1 de 50 ml de agua desionizada y 50 ml de etanol a 60 °C por 1 hora. La síntesis se llevó a cabo por el método de reducción con AgNO_3 y se agitó continuamente por 10 min e incubó por 2 horas. La bioreducción se completó cuando la mezcla cambió su color de café claro

a oscuro. Los autores reportaron la formación de NPs de forma esférica y elipsoidal y un tamaño medio entre 20 y 30 nm, así como una absorción máxima a 459 nm en el análisis UV-Vis, que representa un plasmón superficial característico de las AgNPs. Además realizaron un análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y reportan que los compuestos fenólicos del café son los responsables de la reducción activa de la solución de nitrato de plata. Finalmente, las NPs de plata presentaron actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus* [97].

2.5.3 Extracto de Jengibre

El jengibre (*Zingiber officinale*) es una hierba aromática, picante y especiada, perenne, miembro de la familia Zingiberacear y enriquecida con fitoquímicos naturales. Durante mucho tiempo se ha utilizado como agente aromatizante y sus rizomas tuberosos se han incluido en la lista principal de remedios populares contra el resfriado y el dolor de garganta [100], [101]. Se han documentado sus propiedades biológicas, tales como efectos antimicrobianos, antioxidantes, citotóxicos, insecticidas y antiinflamatorios, así como propiedades conservantes de alimentos [102].

Sus propiedades biológicas se atribuyen a los componentes químicos presentes en el jengibre, que consisten principalmente en hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y flavonoides. Los compuestos pueden dividirse en dos grupos como sabores picantes y aromáticos. Los constituyentes picantes son los gingeroles, shogaoles, zingeronas, gingeroles, gingerdiona y capsaicina; mientras que los compuestos aromáticos son el pineno, canfeno, geranial, curcumeno, borneol, bisaboleno y zingiberol [101], [102]. Se ha reportado que la estructura de los componentes químicos puede modificarse al obtener el extracto a partir de jengibre fresco o seco. Los gingeroles son los principales componentes cuando se encuentran los rizomas frescos, seguido del α -zingibereno, el curcumeno, geranial, bisaboleno y felandreno. En el rizoma seco dominan los shogaoles que son compuestos derivados de fenilpropanoides no volátiles de los gingeroles. Además, se encuentra la zingerona, otro constituyente picante de los rizomas y se produce durante el proceso de secado, bisaboleno, sesquifelandreno, etc. [101], [102].

Se ha reportado que los fitoquímicos del jengibre muestran actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas, incluso frente a algunos tipos de hongos; sin embargo no son efectivos frente a bacterias Gram negativas. Los compuestos a los

que se les atribuye la actividad antimicrobiana son α -zingibereno, curcumeno, bisaboleno y geranial [101].

Kalantari et al. [103] han reportado la síntesis asistida por autoclave de NPs de plata utilizando extracto acuoso de jengibre como agente reductor y estabilizador como un enfoque simple y ecológico. Para realizar el extracto de jengibre se utilizaron 50 g del rizoma, los cuales se lavaron con agua destilada, se secaron y posteriormente se cortaron en rodajas muy delgadas. Se utilizaron 200 ml de agua destilada para realizar el extracto el cual se filtró hasta que adquirió un color amarillo. Para la síntesis de AgNPs se añadieron 6 ml de solución de AgNO_3 0.01 M a 10 ml del extracto vegetal, se agitó 15 minutos y posteriormente se mantuvo en autoclave a 110 °C durante 5 minutos y 15 psi. El proceso de síntesis se observó con el cambio de color en la mezcla; el color amarillo del extracto se volvió café claro al agregar el AgNO_3 y el producto final después de la autoclave era marrón oscuro. Las AgNPs obtenidas tenían forma esférica con un tamaño aproximado de 17 nm, y se reportan actividades biológicas como antioxidantes y antibacterianas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los resultados del análisis espectroscópico UV-Vis describen que no se observó ningún pico en el espectro en las muestras a temperatura ambiente; en cambio en las muestras analizadas después del tiempo en la autoclave muestran la banda de SPR alrededor de 400 nm, que está en el rango característico de las AgNPs. Los autores reportan que la reducción de los iones de plata por el extracto de jengibre a temperatura ambiente fue muy lenta mientras que en las condiciones de temperatura y presión dadas por el autoclave, aumentó el grado de síntesis y estabilización de las AgNPs, además de acelerar la síntesis. Finalmente, basados en el análisis FTIR realizado, los autores atribuyen la reducción y estabilización de las AgNPs a los alcaloides, flavonoides y almidón presentes en el extracto de jengibre. Durante el tiempo en el autoclave y bajo la influencia de la temperatura y presión, los compuestos del extracto se vuelven más accesibles para que los iones de plata interactúen con sus grupos funcionales. La cantidad de grupos -OH presentes en el extracto facilita la formación de complejos de los iones Ag, mientras que los terminales aldehídos ayudan a la reducción de estos. Basados en estos resultados, los autores concluyen que el uso de extracto de jengibre como agente reductor y protector en la síntesis de NPs fue exitoso y representa un método simple, ecológico y rápido [103].

3 HIPÓTESIS

El uso de extractos naturales a partir de plantas como canela, café y jengibre como agentes reductores en la síntesis de NPs de oro y plata son una alternativa económica y amigable con el ambiente que permite obtener NPs cuyas características permitan ser empleados como sustancias antibacterianas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de oro y plata utilizando como agente reductor de los respectivos metales extractos de canela (*C. zeylanicum*), café (*C. arabica*) y jengibre (*Z. officinale*) y evaluar sus probables propiedades antibacterianas.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la influencia de la temperatura y pH en la síntesis de las nanopartículas de oro y plata
- Demostrar la formación de las NPs metálicas a través del color de la solución coloidal, característica para cada tipo de NPs
- Caracterizar las NPs sintetizadas mediante espectroscopía de UV-Vis y DLS
- Evaluar las posibles propiedades antimicrobianas de las soluciones coloidales de nanopartículas de oro y plata así como del extracto natural utilizado para su síntesis frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

5 METODOLOGÍA

5.1 Extractos

5.1.1 Obtención de polvos para los extractos

Debido al acceso restringido a la universidad por los protocolos de sanidad por COVID-19, esta primera etapa se realizó de forma doméstica, con los utensilios y electrodomésticos que se encuentran comúnmente en una cocina. Además, las plantas utilizadas para este trabajo se adquirieron en comercios locales.

5.1.1.1 Polvo de canela

Se pesaron 20 g de corteza de canela en rama, se separó en pedazos más pequeños. Se realizaron tres lavados con agua de garrafón y se dejaron secar por dos días a temperatura ambiente. Después del tiempo de secado, todos los pedazos se tostaron en una sartén durante 8 minutos y se movieron constantemente para evitar que se quemaran. Finalmente se licuaron las veces necesarias hasta conseguir un polvo fino.

5.1.1.2 Polvo de café

El café se compró en el municipio de Pahuatlán, Puebla donde los comerciantes muelen al momento de la compra los granos con un molino de café para obtener la clásica presentación para cafetera. Se optó por comprarlo así y no molerlo de manera casera como la canela y el jengibre ya que la textura del café molido no se hubiera conseguido con una licuadora común.

5.1.1.3 Polvo de jengibre

Se pesaron 110 g de rizoma de jengibre, se realizaron tres lavados con agua de garrafón y se dejó secar sobre papel absorbente por 20 minutos, posteriormente se retiró la parte externa del rizoma y se utilizó un rallador de cocina para rallar la parte interna. Posteriormente se extendió en una charola para hornear y se metió al horno de la estufa precalentado a una temperatura de 180 °C durante 2 horas y 20 minutos con la puerta entreabierta con el fin de deshidratar el jengibre rallado; durante este tiempo, el jengibre se estuvo moviendo cada 20 minutos para evitar que se pegara a la charola. Una vez que se consiguió la deshidratación del jengibre, se licuo repetidas veces hasta obtener un polvo fino.

5.1.2 Preparación del extracto

Para realizar los extractos se consideraron variaciones de temperatura con el fin de observar cómo esta influye en la obtención de NPs. Las variaciones de temperatura se realizaron con cada planta a 45 °C, 65 °C y 85 °C, por lo que se obtienen 3 extractos de cada una de ellas.

Se agregaron 2.5 g. de polvo de cada especie a 50 ml. de agua destilada y se mantiene en agitación por 10 minutos a la temperatura correspondiente. El extracto se dejó enfriar y posteriormente se filtró hasta obtener un líquido transparente libre de

sólidos y se mantuvo en refrigeración. Para los extractos de jengibre se realizó además una centrifugación por 30 minutos.

5.2 Síntesis de nanopartículas

Con el fin de observar cómo influye el pH en la síntesis de NPs coloidales, se utilizó un pH ácido, neutro y básico para esta parte experimental (pH = 4, 7 y 10, respectivamente). Se utilizó la cantidad necesaria de soluciones concentradas de HCl y NaOH para ajustar a pH ácido y básico de los extractos, respectivamente. Contemplando, las variaciones de temperatura y pH, así como los diferentes tipos de plantas utilizadas en este trabajo, se obtuvieron 27 muestras diferentes para utilizarse como agente reductor en la síntesis de NPs de oro y plata.

Posterior a la modificación del pH de los extractos, se mezclaron en una proporción en volumen 10:1 respecto al extracto con las soluciones acuosas de los precursores de oro y plata (HAuCl_4 y AgNO_3 1 mM, respectivamente) para llevar a cabo la síntesis de NPs de oro y plata, respectivamente y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta obtener el cambio de color característico de la formación de las NPs coloidales, siendo marrón para las NPs de plata y rojo/morado para las de oro; se mantuvo la agitación hasta que el color esperado se mantuvo estable.

5.3 Caracterización

5.3.1 UV-Vis

La formación de las NPs metálicas se determinó por espectroscopía de UV-Visible, que proporciona datos fácilmente al aprovechar las propiedades ópticas de las NPs, ya que muestra la banda de plasmones de superficie característica de cada tipo de nanopartícula. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis modelo Varian Cary 50 (Agilent Technologies) con lámpara de xenón y una celda de cuarzo de 1 cm y se obtuvieron espectros de absorción en un rango de 350-800 nm para las NPs de plata y de 400-800 nm para las de oro.

5.3.2 DLS

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que se utiliza para determinar el diámetro y la distribución de tamaño de las NPs, basado en el movimiento browniano de estas donde generalmente, es más rápido para partículas pequeñas en

comparación con partículas más grandes. Se utilizó el equipo Zetasizer ZEN3690, Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) programado a una temperatura de 25 °C y utilizando agua como dispersante. La medición se realizó por triplicado y los resultados se analizaron en las modalidades de “número” e “intensidad”.

5.4 Propiedades antimicrobianas

5.4.1 Preparación de inóculos de prueba

En medio de cultivo agar soya tripticaseína se realizaron cultivos de las cepas de prueba Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) y Gram positiva (*S. aureus* ATCC 25923) y se incubaron durante 18-24h a 37 °C. Posteriormente se tomaron UFC de cada cepa para preparar una suspensión bacteriana en un tubo con solución salina isotónica estéril hasta obtener una turbidez equivalente al 0.5 del estándar de McFarland.

5.4.2 Distribución de los ensayos

Los ensayos de sensibilidad microbiana se dividieron en dos partes: en el primer ensayo, se analizó las propiedades antimicrobianas del extracto de canela realizado a 85 °C, y las NPs de oro y plata sintetizadas a partir de este mismo extracto. El segundo ensayo se enfocó únicamente en el uso de las NPs de plata, debido a que las propiedades antimicrobianas de este tipo de NPs están reportadas como una característica representativa de estas.

5.4.3 Concentración inhibitoria mínima (MIC) por microdilución

En una placa de 96 pozos con fondo en U, representada en la Figura 16, se colocaron 50 µL de caldo Müller Hinton (del pozo 2 al pozo 12). Posteriormente, se colocaron 100 µL de la solución de interés (extracto de canela elaborado a 85 °C, AuNPs y AgNPs elaboradas con este mismo extracto a pH 10) al 100% en el pozo 1 y se tomaron 50 µL de este pozo para ser transferidos al número 2, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas 1:2 del pozo 2 al 11, con un volumen final de 50 µL, descartando 50 µL del pozo 11. Posteriormente se adicionaron 50 µL de la suspensión bacteriana preparada anteriormente ajustada al 0.5 del estándar de McFarland en los pozos del 1 al 11. En el pozo 12 se colocaron 50 µL de la solución de interés para

verificar que no estuviera contaminada. Finalmente se colocó la tapa a las placas, y éstas se incubaron a 35-37 °C por 18-24 h para su interpretación.

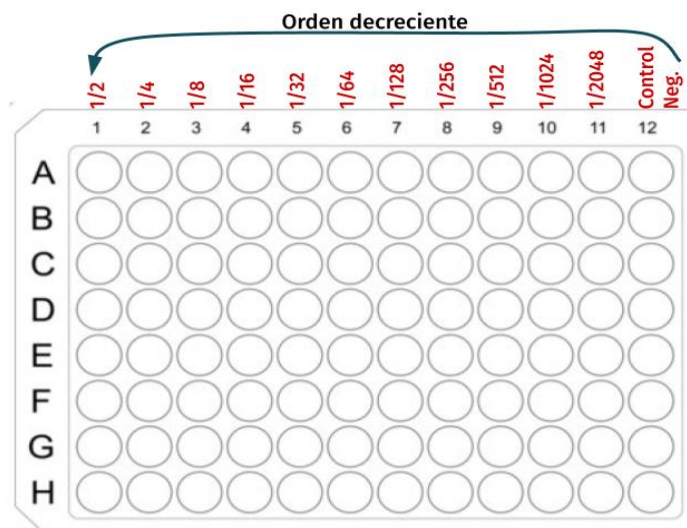


Figura 16. Placa de microdilución de 96 pozos con diluciones seriadas.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Síntesis de nanopartículas

6.1.1 Síntesis biológica de nanopartículas de oro

La síntesis de las NPs obtenidas a partir de extractos de canela y café quedó comprobada al observar el cambio de color del extracto vegetal (amarillo/café claro) a tonos rojos/morados (Figura 17). Aunque en todas las variantes de temperatura en la elaboración del extracto (45 °C, 65 °C y 85 °C) y pH en la reacción de reducción (pH 4, 7, 10) se obtuvo el cambio de color, los tiempos de formación fueron significativamente diferentes de acuerdo con las condiciones establecidas.

Para las NPs sintetizadas con extractos de canela, los tiempos de reacción fueron de menos de 5 minutos para todas las condiciones de pH estudiadas, incluso a pH ácido, donde se observó el tiempo más largo de reacción para todos los extractos. Por el contrario, al utilizar el extracto de café, los tiempos de reacción fueron considerablemente mayores, alcanzando tiempos de hasta 2 horas con 40 minutos al utilizar el extracto elaborado a 45 °C y pH ácido; el tiempo de reacción más corto utilizando café fue el de temperatura 85 °C con pH básico, en este caso el cambio de coloración se dio a los 10 minutos a una tonalidad morada/azul. Se observa que incluso el mejor tiempo de reacción utilizando extracto de café, no es comparable con

la rapidez de la síntesis al utilizar extractos de canela, con un tiempo de reacción de menos de la mitad de este.

Así mismo, en ambas síntesis, se observan diferentes tonalidades de color en las soluciones, siendo las NPs más grandes aquellas en las soluciones coloidales más oscuras. Esto indica que las condiciones de reacción están relacionadas con las características de las NPs sintetizadas. De manera general, las soluciones coloidales a partir de extractos de canela tienden a presentar colores rojizos y morados. Se observa que la coloración con tonos más rojizos son las sintetizadas en pH 10 en las tres variantes de temperatura, lo que demuestra que el pH básico favorece la reacción a NPs de menor tamaño, cuando se utiliza este extracto. Por otro lado, en las NPs elaboradas a partir de extractos de café, se observan tonalidades moradas y azules. La coloración de las soluciones coloidales se ve muy uniforme para todas las condiciones de pH utilizadas, por lo que se sugiere que no hay una variación de tamaño representativa entre ellas (Figura 17). La diferencia de coloración entre las NPs sintetizadas con canela y café sugiere una diferencia de tamaño de las NPs sintetizadas, por lo que la naturaleza del extracto vegetal tiene un papel importante en la síntesis debido a los fitoquímicos presentes en cada uno de ellos.

Cuando se utilizó extracto de jengibre como agente reductor para la síntesis de NPs, se obtuvieron resultados poco favorables comparados con los obtenidos anteriormente; los tiempos de reacción se llevaron hasta los 60 minutos y en ningún momento se visualizaron los colores rojos/morados característicos de la formación de NPs de oro, en su lugar las soluciones tomaron un color verdoso en los primeros minutos de la reacción y posteriormente cambiaron a tonos entre gris y negro, incluso en las soluciones de síntesis a partir del extracto de jengibre a 65 °C se formó un precipitado, antes de terminar el tiempo de reacción; finalmente, las muestras se volvieron casi transparentes con precipitados oscuros. Los resultados de este análisis a simple vista y la comparación con los descritos anteriormente, descartan de primera instancia la formación de AuNPs al utilizar extracto de jengibre para cualquier pH o temperatura probada.

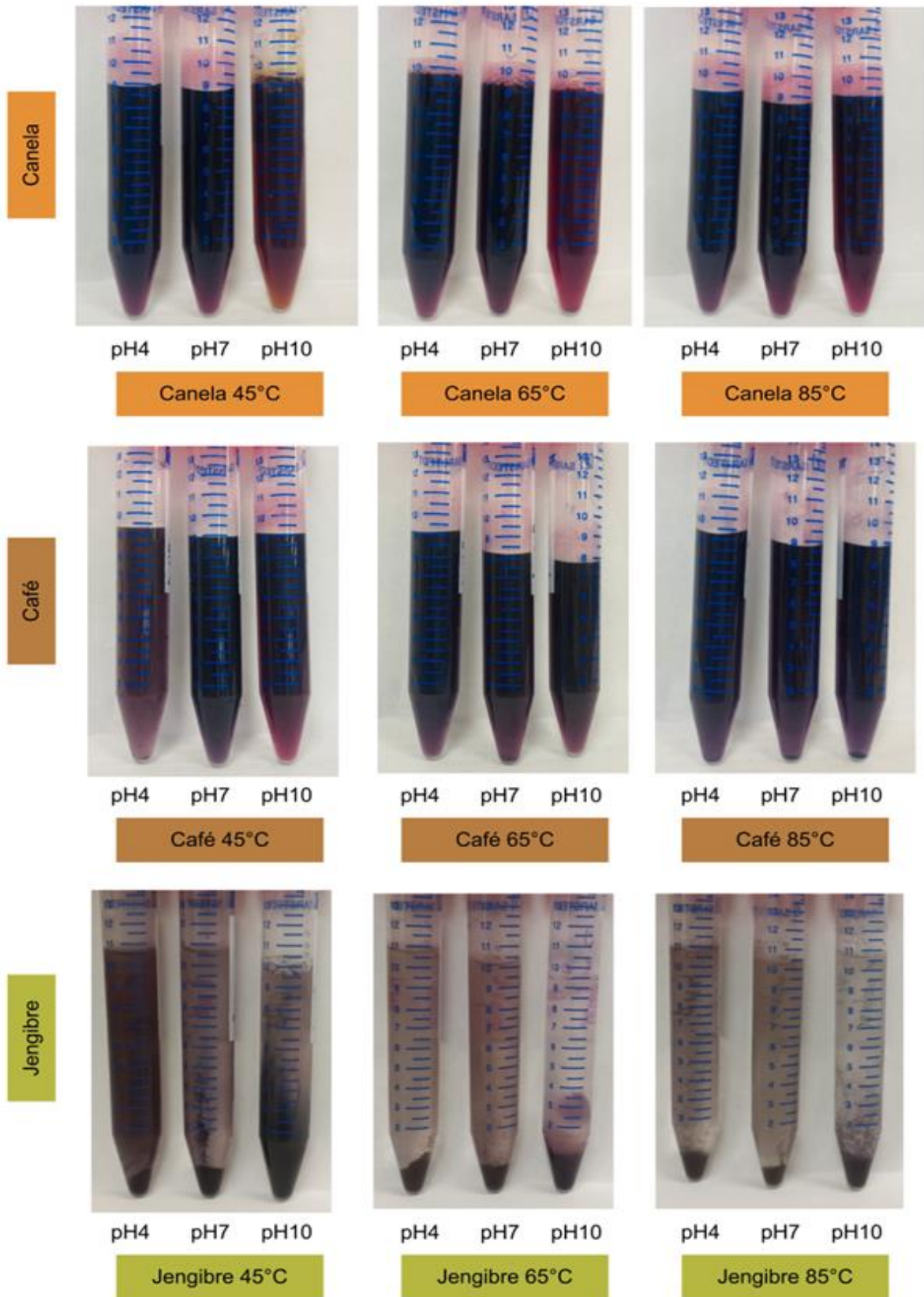


Figura 17. Soluciones coloidales de oro utilizando extractos de canela, café y jengibre elaborados a diferentes temperaturas, sintetizadas a diferentes pH.

6.1.2 Síntesis biológica de nanopartículas de plata

En la síntesis de NPs de plata, el cambio de coloración se dio de un amarillo/café claro a uno más oscuro, característico de la formación de este tipo de NPs metálicas, como se muestra en la Figura 18. En este caso, el cambio de coloración no se logró en todas las condiciones de reacción utilizadas; en la síntesis con extractos de canela, a pH 7 y 10 el cambio de color fue casi al momento de adicionar la solución de AgNO_3 al extracto y se mantuvo estable, por esta razón solo se mantuvo 5 minutos en agitación, ya que la reacción había ocurrido instantáneamente, sin embargo, la reacción a pH 4, se dejó en agitación durante 60 minutos y en ninguna de las variantes de temperatura hubo un cambio de color, al retirar la reacción de la agitación se obtuvo una solución casi transparente que se interpreta como la no formación de NPs de plata. En este caso es notorio como el pH es un factor importante para la síntesis de AgNPs, incluso por encima de la temperatura a la que se realizó el extracto. Con el paso de los días en refrigeración, las muestras a pH 4 tomaron un color diferente al inicial, sin embargo también se observó un precipitado, por lo que se respeta la idea de la no formación de NPs de plata a este pH.

Por otro lado, cuando se utiliza extracto de café como agente reductor en la síntesis de NPs, se obtienen resultados similares a los obtenidos para pH 7 y pH 10 con el extracto de canela, ya que también se observan cambios de coloración instantáneos al color deseado y estables; la diferencia se encuentra en el medio de reacción con pH ácido, al usar este extracto sí se observan cambios de coloración en las tres variantes de temperatura, sin embargo el tiempo de reacción se eleva hasta 25 minutos, por lo que este pH se sigue considerando como desfavorable para la síntesis de NPs de plata, además la intensidad de los colores de las soluciones es bastante parecida para pH 7 y 10 por lo que no hay una diferencia a simple vista significativa en realizar la reacción a pH neutro o básico.

En el caso de la síntesis realizada con extracto de jengibre, no se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con los otros dos extractos. Al igual que en la síntesis de AuNPs, los cambios de coloración no fueron coincidentes con los esperados para la formación de NPs de plata en ninguna de sus variantes de temperatura y pH, aun cuando se dio un tiempo de reacción de 60 minutos. Cuando la reacción se realizó a pH ácido, no se observa ningún cambio de coloración, cuando se realizó a pH neutro y básico, el cambio de color se dirigió a las tonalidades oscuras

como el negro; ninguno de estos colores corresponde a los característicos de la síntesis de AgNPs, además de que en todos los casos del uso del extracto de jengibre se forma un precipitado; por lo que se descarta la formación de estas.

Estos resultados demuestran la importancia e influencia de los factores de reacción en la síntesis verde de NPs. Se observa que el pH neutro y principalmente el pH básico favorecen la formación de NPs de oro y plata al presentar en todos los casos la coloración correcta así como tiempos de reacción más cortos en el caso de las soluciones a pH 10, cuando la síntesis se realizó a pH 4, los tiempos de reacción aumentaron incluso hasta 60 minutos, y en algunos casos no se obtuvo la formación de NPs, aun con el aumento de tiempo.

El factor de la temperatura a la que se realizó el extracto no muestra a simple vista una influencia importante en los resultados obtenidos ya que la coloración de las soluciones obtenidas y los tiempos de reacción son muy similares entre sí, por lo que, en este trabajo, el pH de reacción es un factor más determinante que la temperatura en la formación de NPs metálicas. Debe tenerse en cuenta que la variación de temperatura se hizo en la elaboración del extracto y no en la reacción de síntesis de NPs, por lo que podrían obtenerse resultados diferentes y probablemente una mayor influencia de la temperatura en la formación de NPs si estas variaciones se hubieran realizado en la reacción de reducción.

La naturaleza de los extractos repercute en diferentes aspectos. En primer lugar, la velocidad con la que se forman las NPs cambia cuando se utiliza un extracto u otro, en las NPs de oro, los tiempos de reacción son más cortos cuando se utiliza extracto de canela, al completarse la reacción en 5 minutos, en comparación a cuando se utiliza el extracto de café donde todos los tiempos de reacción fueron de más de 60 minutos. En el caso de las NPs de plata los tiempos de reacción son muy parecidos al utilizar cualquiera de los dos extractos, terminando la reacción en 5 minutos en los pH neutro y básico, la diferencia se encuentra en el pH ácido donde la reacción con extracto de café tuvo una duración de 30 minutos, mientras que la de extracto de canela se llevó hasta 60 minutos sin notar un cambio de coloración.

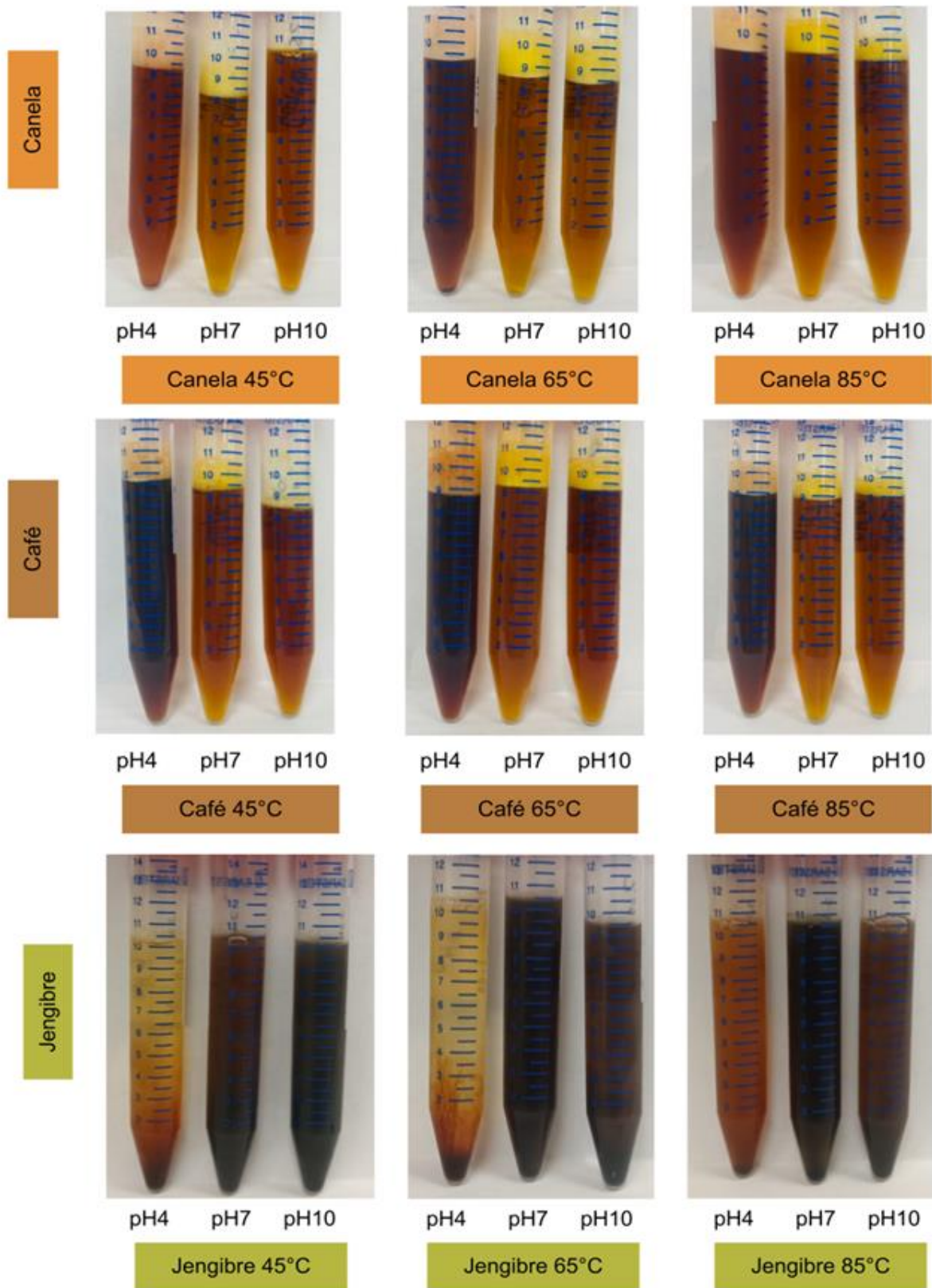


Figura 18. Soluciones coloidales de plata utilizando extractos de canela, café y jengibre elaborados a diferentes temperaturas, sintetizadas a diferentes pH.

Estas observaciones coinciden con lo reportado por Vijayaraghavan et al. y Al-khayri et al. [5], [15]; quienes reportan que la síntesis biológica de NPs dependen de varios factores, pero principalmente del pH, la temperatura y naturaleza del extracto y estos afectan el tamaño, forma y la velocidad de formación de las NPs. Hasta el momento se ha comprobado que estos factores sí modifican la velocidad de formación de las NPs de oro y plata.

Finalmente, el uso del extracto de jengibre en la síntesis de NPs de oro y plata no dio resultados positivos bajo ninguna condición de reacción utilizada en este trabajo. Dado que las condiciones de reacción mostraron ser favorables para la síntesis con extractos de canela y café y que se han reportado síntesis de NPs metálicas exitosas utilizando este extracto, como el reportado por Kalantari et al., 2019 [103] quienes sintetizaron exitosamente AgNPs utilizando extracto acuoso de jengibre en un método de síntesis asistida por autoclave, se atribuye que el proceso experimental diseñado para este trabajo no es compatible con el uso y/o la forma de obtención del extracto de jengibre para la obtención de NPs. Si se modifican algunos aspectos de la metodología hasta optimizarlos, podría llevarse a cabo la síntesis verde de NPs utilizando extracto de jengibre.

6.2 Caracterización

6.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis permite estimar la morfología y el tamaño de las NPs a partir de la forma y posición del espectro de absorción. Para este experimento, se realizó, en primer lugar, la espectroscopia de los extractos de canela y café para evidenciar las diferencias entre los espectros de absorción de los extractos vegetales y de las NPs sintetizadas a partir de estos. Como se observa en la Figura 19, los espectros de los extractos muestran curvas con pendientes negativas, esto quiere decir que no se presenta el fenómeno de absorción de plasmón, característico de las NPs.

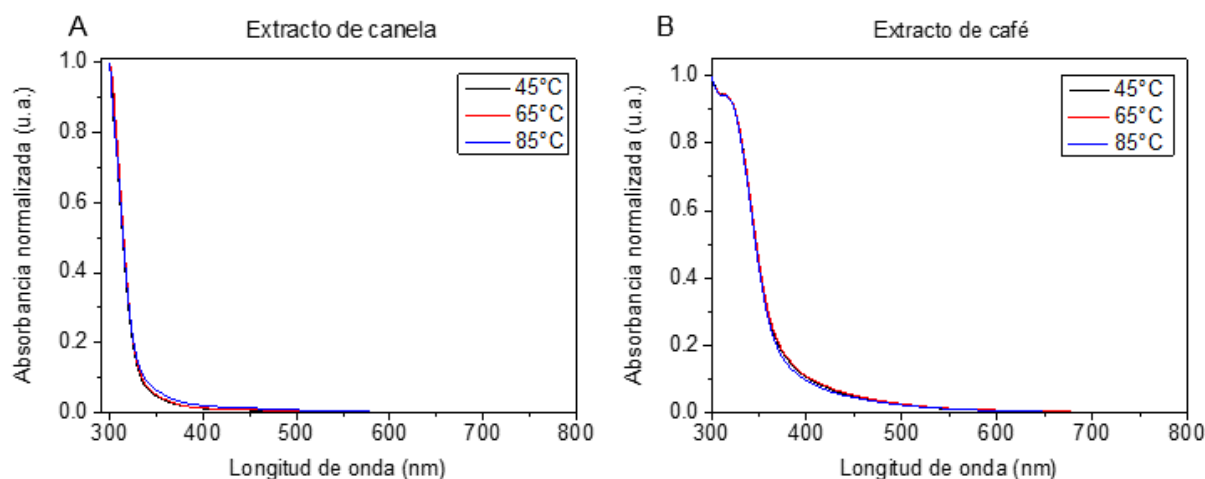


Figura 19. Espectros de absorción de extractos de (A) canela y (B) café, utilizados para la síntesis de NPs.

En el caso de NPs que son del mismo material pero de diferentes tamaños, absorben a diferentes longitudes de onda. En los espectros de las NPs esféricas, se observará una banda cuya posición dependerá del tamaño de la nanoestructura. Para una mejor interpretación de los resultados de esta sección, la Figura 20 muestra gráficas elaboradas con base en datos reportados en la literatura sobre la relación entre la longitud de onda máxima (λ_{max}) y el diámetro en nm de las NPs de oro y plata. Se reporta la ecuación de la recta para estimar el diámetro de las NPs sintetizadas en este trabajo.

A continuación se presentan espectros de absorción UV-Vis de las NPs de oro y plata sintetizadas utilizando como agente reductor extractos de canela y café elaborados a diferentes temperaturas y comparando los distintos valores de pH utilizados en la reacción de reducción.

6.2.1.1 UV-Vis de nanopartículas de oro

La Figura 21 muestra los espectros del análisis de UV-Vis para las AuNPs sintetizadas con extracto de canela elaborado a 45 °C, 65 °C y 85 °C (A, B y C, respectivamente) y café a 45 °C, 65 °C y 85 °C (D, E y F, respectivamente).

De manera general, las λ_{max} de las NPs sintetizadas con extracto de canela y café están en un rango muy cerrado de 532-542 nm; que se encuentra dentro del rango característico de NPs de oro que abarca de 520 a 580 nm.

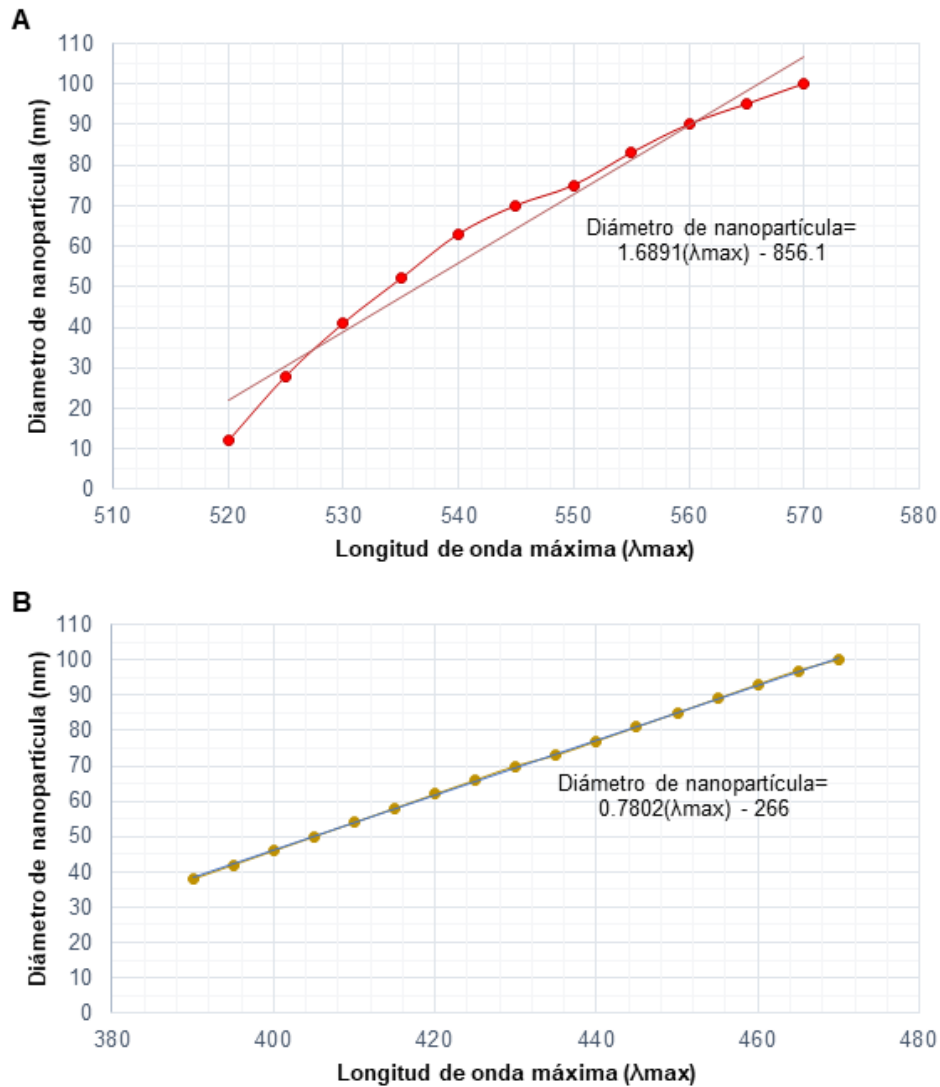


Figura 20. Gráficas del diámetro de NPs estimado correspondiente a la λ_{max} para las NPs de oro (A) y plata (B) a partir de datos reportados por [104], [105] y [106], respectivamente.

En los espectros de AuNPs sintetizadas con extracto de canela, se observa que las diferencias entre λ_{max} en cada espectro no es de más de 2 nm, habiendo casos (B y C) donde la λ_{max} es la misma para dos valores de pH distintos, por lo que se sugiere que para este método de síntesis, el pH de reacción no es un factor que afecte en gran medida el tamaño de las NPs al utilizar este extracto. Se observa que en A y B la curva de absorbancia de pH 10, marcada con azul, muestra la λ_{max} menor (532 y 534 nm, respectivamente), esto indica que son las NPs de menor tamaño en comparación con las de pH 4 y 7; sin embargo en la gráfica C donde se utilizó extracto de canela elaborado a 85 °C, la curva de las AuNPs sintetizadas a pH 10 presenta la λ_{max} mayor (536 nm) que representa el tamaño de NP más grande, esto quiere decir que para la síntesis realizada a pH básico, el aumento de temperatura en la

elaboración del extracto contribuye al aumento de tamaño de las NPs formadas. En las curvas de pH 7, se observa una disminución de la λ_{max} en el espectro C (de 536 nm, presente en A y B a 534 nm); en este caso, el aumento de temperatura hasta 85 °C resulta en una disminución del tamaño de las NPs. De estas observaciones se infiere que la temperatura a la que se realizó el extracto influye en el tamaño de las NPs por encima del pH. Por otro lado, en los tres espectros de AuNPs sintetizadas con extracto de canela, las curvas de absorción de pH 4 y 7, mostradas en negro y rojo respectivamente, muestran un ensanchamiento al final de la curva, esto puede atribuirse a la presencia de un doble plasmón debido a la formación de NPs no esféricas o anisotrópicas, ya que el plasmón, y por lo tanto, el espectro de absorbancia está condicionado por el tamaño y la forma de las NPs.

En los espectros de AuNPs sintetizadas con café se observa a simple vista curvas bastante uniformes en los tres espectros en comparación con las descritas anteriormente. Esto indica la estabilidad de las NPs sintetizadas y se les atribuye forma esférica por la forma definida y homogénea de las curvas. Las λ_{max} tienen diferencias de dos a cuatro nanómetros y, al igual que en las AuNPs sintetizadas con canela, hay un espectro (E) donde se reporta la misma λ_{max} para dos valores de pH distintos. En este caso también se atribuye poca dependencia del tamaño al pH de reacción, pues se observan λ_{max} muy homogéneas y por lo tanto NPs de tamaños similares entre sí. Otro dato relevante es que, al igual que en las AuNPs sintetizadas con extracto de canela, en los espectros de AuNPs sintetizados con extracto de café, la λ_{max} menor para los espectros D y E son las de pH 10 (536 nm, en ambos casos), lo que indica que a este pH y en esas temperaturas de elaboración del extracto (45 °C y 65 °C) se forman las NPs de menor tamaño. Estos resultados se ven modificados cuando se utiliza el extracto de café elaborado a 85 °C (F) donde la curva de absorción de pH 10 muestra una λ_{max} más grande (542 nm) e incluso se observa un ensanchamiento de la curva, lo que indica que cuando se utiliza este extracto, tanto el tamaño como la forma de las NPs obtenidas se modifica; esto confirma que la temperatura a la que se elaboró el extracto tiene un papel importante en la morfología de las NPs de oro. En las curvas de pH 7 se observa una disminución de la λ_{max} conforme se aumenta la temperatura de elaboración del extracto utilizado, es decir, cuando se utilizan los extractos realizado a 45 °C y 65 °C, la λ_{max} es de 536 nm en ambos casos y cambia al utilizar extracto a 85 °C, donde se reportan una λ_{max} de 534. En este caso, al igual que en las AuNPs sintetizadas con canela, se observa que

la temperatura de elaboración del extracto influye en la λ_{\max} y por lo tanto en el tamaño de las NPs sintetizadas.

Por otro lado, las NPs obtenidas en las diferentes condiciones de reacción muestran sólo seis λ_{\max} diferentes con una variación de 2 o 3 nm entre ellas, por lo cual se considera que las AuNPs obtenidas tienen un tamaño muy similar entre sí y, en este caso, las condiciones de temperatura o pH utilizadas para la síntesis no genera diferencias de tamaño trascendentales. A continuación se muestra una tabla con el tamaño del diámetro estimado de las AuNPs basado en el gráfico de la Figura 20A y la ecuación de la recta de este.

Tabla 1. Tamaño estimado de AuNPs sintetizadas.

λ_{\max}	Diámetro (nm)
532	43
534	46
536	50
538	53
542	60

Los datos de la Tabla 1 demuestran que las NPs de oro sintetizadas se encuentran dentro de la escala nanométrica y que la diferencia entre la partícula más pequeña y la más grande es de 17 nm. De esta manera, se infiere que el uso de cualquiera de los dos extractos utilizados, así como las condiciones de temperatura y pH permitirán la formación de NPs de oro bastante similares entre sí.

Espectros Uv-Vis de AuNPs

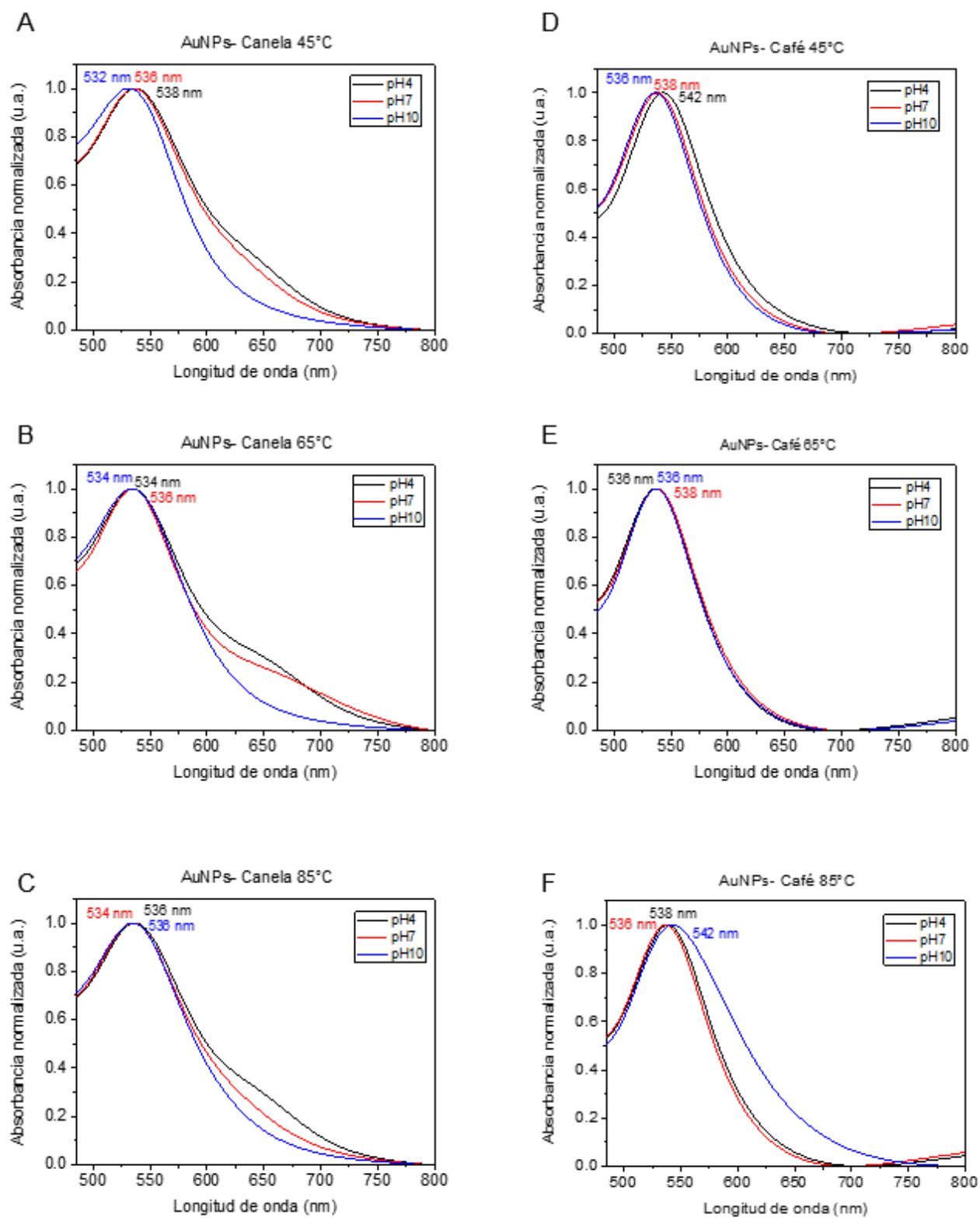


Figura 21. Espectros UV-Vis de AuNPs sintetizados con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E y F), donde se muestra la λ_{max} correspondiente a las NPs sintetizadas a diferente pH.

6.2.1.2 UV-Vis de nanopartículas de plata

La Figura 22 muestra los espectros del análisis de UV-Vis para las AgNPs sintetizadas con extracto de canela (A, B, C) y café (D, E y F) elaborados a las temperaturas reportadas con anterioridad comparando las λ_{max} obtenidas a diferente pH. El rango de longitud de onda obtenidos abarca 410-446 nm, valores que se encuentran en el rango de absorción característico de las AgNPs (380-450 nm) por lo que mediante este análisis se confirma la formación de NPs de plata.

Al observar los espectros de AgNPs sintetizadas a partir del extracto de canela (A, B y C), se observa en A y B que la λ_{max} más pequeña pertenece a las NPs sintetizadas a pH 7, sin embargo hay una diferencia de 4 nm entre estas (412 para A y 416 nm para B); en el espectro C, la λ_{max} perteneciente a la curva de pH 7 es la de mayor valor, aumentando 10 nm en comparación con la presentada en B (de 416 nm a 426 nm). Por otro lado, al observar las curvas de las NPs sintetizadas a pH 10, ocurre una disminución en la λ_{max} desplazándose hacia la izquierda 4 nm conforme aumentaba la temperatura de elaboración de los extractos, es decir, en el espectro A, la curva de las NPs a pH 10 presenta una λ_{max} de 424 nm, la cual disminuye a 420 nm en el espectro B y esta última se modifica a 416 nm en el espectro. Por otro lado, en los resultados obtenidos a pH 4, no es perceptible un patrón definido en el aumento o disminución del tamaño de las NPs; debido a esto se considera que el pH ácido no es un medio de reacción ventajoso para la síntesis ya que con los datos obtenidos no se puede formar una idea base del tamaño de NPs formadas y cómo modificar las características de reacción para sintetizar NPs del tamaño de interés. Con base en estos datos, se infiere que las diferentes combinaciones de temperatura de elaboración del extracto y pH de reacción repercuten en el tamaño de las AgNPs obtenidas; principalmente la temperatura, ya que una diferencia de 20 °C en la elaboración del extracto puede modificar el tamaño de las NPs, haciéndolas más grandes o más pequeñas.

En los espectro de las AgNPs sintetizadas con extracto de café (D, E y F) se observa que en los tres espectros la λ_{max} menor corresponde a la curva de las NPs sintetizadas a pH 10 siendo de 410, 416 y 410 nm, respectivamente; mientras que en las curvas de pH 7 se reportan 420, 424 y 418 nm. Se observa que al aumentar la temperatura de elaboración del extracto de 45 °C a 65 °C (D y E), las λ_{max} tanto del pH neutro como básico se recorren a la derecha en 4 y 6 nm, respectivamente con el

aumento de temperatura; sin embargo, cuando se utiliza el extracto sintetizado a 85 °C (F), la λ_{max} de las curvas de pH 7 y 10 disminuye en 6 nm en comparación con las λ_{max} presentadas en E, lo que indica una disminución del tamaño de las AgNPs sintetizadas. En la síntesis de AgNPs a partir de extracto de café, la temperatura de elaboración de este influye en el tamaño de las NPs obtenidas. Por otro lado, la curva de pH 10 en el espectro F muestra una desviación de la forma, lo que puede ser indicador de un segundo plasmón debido a la formación de AgNPs anisotrópicas. Esto significa que en medio básico y con el uso del extracto elaborado a 85 °C, inicia la formación de NPs no esféricas.

Por otro lado, a diferencia de los valores de λ_{max} obtenidos para AuNPs, los presentados en los espectros de AgNPs tienen una diferencia más notoria, ya que hay 14 valores de λ_{max} diferentes, razón por la cual hay una mayor divergencia en el tamaño de las NPs obtenidas. La temperatura y el pH modifican la λ_{max} de las NPs para ambos tipos de extractos y pueden considerarse los factores que afectan la morfología de las AgNPs sintetizadas. En la siguiente tabla se muestran los tamaños estimados de las AgNPs sintetizadas de acuerdo con su λ_{max} . La estimación del tamaño se hizo con base en la gráfica de la Figura 20B y su ecuación de la recta.

Tabla 2. Tamaño estimado de AgNPs sintetizadas.

λ_{max}	Diámetro (nm)	λ_{max}	Diámetro (nm)
410	54	424	65
412	55	426	66
414	57	430	69
416	58	432	71
418	60	440	77
420	62	442	79
422	63	446	82

Aunque el crecimiento del diámetro de las NPs no varía mucho entre un valor de λ_{max} y otro, debido a que hay varios valores presentados, hace que el rango de tamaño aumente habiendo una diferencia de 28 nm entre la AgNP más pequeña y la más grande. Esto confirma que para la síntesis de NPs de plata, el extracto utilizado y las condiciones de reacción influyen en el tamaño de las NPs.

Espectros Uv-Vis de AgNPs

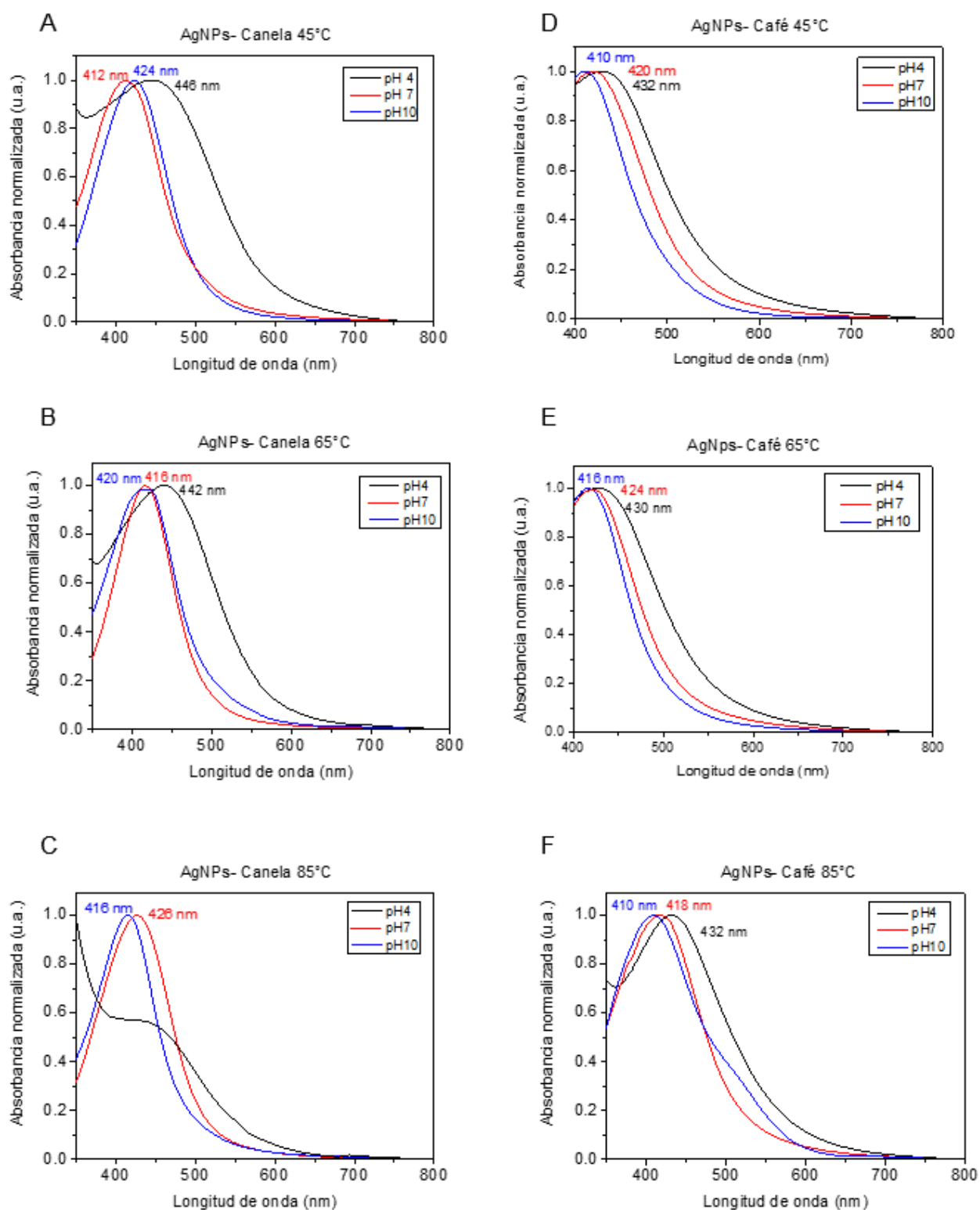


Figura 22. Espectros UV-Vis de AgNPs sintetizadas con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E, F), donde se muestra la λ_{max} correspondiente a las NPs sintetizadas a diferentes pH.

De manera general, al observar las diferencias entre los espectros de los extractos vegetales (Figura 19) y los espectros de las NPs metálicas sintetizadas (Figuras 21 y 22), se determina que las curvas de absorción de estas últimas figuras pertenecen a las NPs de oro y plata y no a cualquier otro compuesto vegetal presente en los extractos.

Por otro lado, las diferencias en la forma de las curvas que se ven a simple vista tanto en los espectros de AuNPs como de AgNPs muestran que el material vegetal utilizado también influye en el tamaño y forma de las NPs. De no ser así, los espectros de canela y café serían iguales ya que se utilizaron las mismas temperaturas para elaborar el extracto y el mismo pH en la reacción de síntesis; sin embargo se encuentran diferencias en las λ_{max} obtenidas y en la forma de las curvas, mostrando ensanchamientos en algunos casos. Esta diferencia puede atribuirse a los diferentes fitoquímicos característicos de cada extracto que se involucran de diferente manera en la síntesis y formación de las NPs.

Como se describió anteriormente, aunque el mecanismo por el cual las plantas están involucradas en la síntesis de NPs no se conoce con certeza, los fitoquímicos presentes en la canela y el café tienen en su mayoría grupos hidroxilo y carbonilo capaces de donar electrones que permiten la reducción del metal a su forma elemental y la consecuente formación de NPs. Además de actuar como agentes reductores, estos fitoquímicos son capaces de unirse a las NPs formadas y mejorar sus estabilidad. La diferencia de tamaño entre las NPs se puede atribuir en primer lugar a la parte de la planta utilizada para la elaboración del extracto, los métodos de preparación y la temperaturas a la que fueron realizados; estos factores pueden modificar la presencia o disponibilidad de ciertos fitoquímicos en el extracto. Por otro lado, el oro y la plata pueden interactuar de diferente manera con los principales grupos funcionales de estos, que hace que las NPs resultantes presenten una variación en el tamaño o su estabilidad.

Los resultados obtenidos mediante el análisis UV-Vis confirman y coinciden con los reportados en la sección de "Síntesis de NPs", los cuales son de tipo cualitativo debido a que están basados en la observación y perspectiva personal. El análisis de UV-Vis brinda información que no estaba esclarecida en dicha sección; por ejemplo, la formación de las AgNPs a pH 4 estaba en duda debido a los tiempo de reacción prolongados y, en el caso de aquellas donde se utilizó el extracto de canela como agente reductor, la falta de un cambio de color en la reacción característico de la

formación de NPs. Los espectros de UV-Vis demuestran la presencia de NPs sintetizadas a este pH, sin embargo se encuentran en bajas concentraciones, por lo que se mantiene la idea de que el medio ácido es desfavorable para la síntesis de NPs al utilizar extractos de canela y café.

6.2.2 DLS

Para esta sección y la siguiente, se consideran sólo los resultados de las NPs sintetizadas a pH 10, debido a que en general, los resultados obtenidos a este pH tanto en la síntesis como en el análisis de UV-Vis, define a este como el medio más favorable para la formación de NPs y muestra curvas de absorbancia bien definidas en los espectros de UV-Vis.

6.2.2.1 DLS de nanopartículas de oro

La Figura 23 muestra los espectros de intensidad de las NPs de oro sintetizada con los extractos de canela (A, B y C) y café (D, E y F) elaborados a las temperaturas mencionadas anteriormente y sintetizadas a pH 10, donde la curva indica el tamaño de las NPs.

En los espectro de AuNPs elaboradas con canela se observa que el tamaño está en un rango de 33-59 nm y aumenta al incrementar la temperatura de elaboración del extracto. En este caso el espectro B, puede interpretarse como el que presenta las AuNPs más estables, ya que presenta una sola curva bien formada con un tamaño de NPs casi en la mitad de la escala nanométrica (51 nm). Se observa que en los espectro A inicia una curva alrededor de los 400 nm, que puede atribuirse a agregados de partículas fuera del rango nanométrico y en el espectro C se observa un alargamiento de la curva que no alcanza el valor cero en el eje x.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el análisis UV-Vis reportados en la Figura 20 (A, B y C), se observa que el tamaño de las NPs reportado por el análisis DLS no coincide con los estimados en la Tabla 1, de acuerdo con las λ_{max} obtenidas, pero sí se encuentran en un rango muy cercano de tamaño. En donde los resultados de ambos análisis coinciden es que al aumentar la temperatura de elaboración del extracto, también aumenta el tamaño de las AuNPs; estos datos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AuNPs sintetizadas con extractos de canela.

Extracto utilizado	λ_{max}	Diámetro estimado a partir de λ_{max} (nm)	Diámetro reportado a partir de DLS (nm)
Canela 45°C	532	43	33
Canela 65°C	534	46	51
Canela 85°C	536	50	59

Los espectros de AuNPs elaboradas con café (D, E y F) muestran en los tres casos un pico de valores muy pequeños que no se consideran como NPs formadas y se atribuye a errores de medición u otro tipo de partículas presentes en la muestra. Los picos de mayor intensidad muestran NPs en un rango de tamaño de 58-91 nm. Al igual que en las NPs sintetizadas con canela, las NPs más pequeñas son las elaboradas con el extracto preparado a menor temperatura (45 °C), sin embargo en las sintetizadas con extracto a 65 °C hay un incremento de tamaño hasta 91 nm y este decae cuando se utiliza extracto preparado a 85 °C. En este caso, la combinación de factores de reacción en el espectro B forman las NPs de oro de mayor tamaño.

Los resultados de DLS no son coincidentes con los reportados para estas mismas condiciones de reacción en UV-Vis. Mientras que en los espectros D y E de la Figura 21 se reporta la misma λ_{max} y por lo tanto se considera que las NPs obtenidas deben ser del mismo tamaño, los resultados de DLS reportan tamaños desiguales con una diferencia de 33 nm. Por otro lado, en el análisis UV-Vis se reporta una λ_{max} mayor para las AuNPs sintetizadas a partir del extracto de café a 85 °C, donde se infiere que estas NPs son las de mayor tamaño, mientras que en los resultados de DLS son las correspondientes a las elaboradas con extracto de canela a 65 °C. Estos datos se muestran en la Tabla 4.

La diferencia de tamaño entre las NPs sintetizadas con extracto de canela a diferentes temperaturas es menor y los resultados son más coincidentes con los obtenidos en el análisis UV-Vis en comparación con los resultados de las AuNPs a base de café. Además, se observa que el uso de extracto de canela forma NPs de menor tamaño que las sintetizadas con extracto de café. Así mismo, se observa que la temperatura de preparación del extracto tiene un papel importante en el tamaño de las NPs obtenidas ya que en este caso se analizaron las NPs sintetizadas a pH básico en todos los casos, por lo que las diferencias en las dimensiones se atribuyen a la temperatura.

Espectros DLS de AuNPs

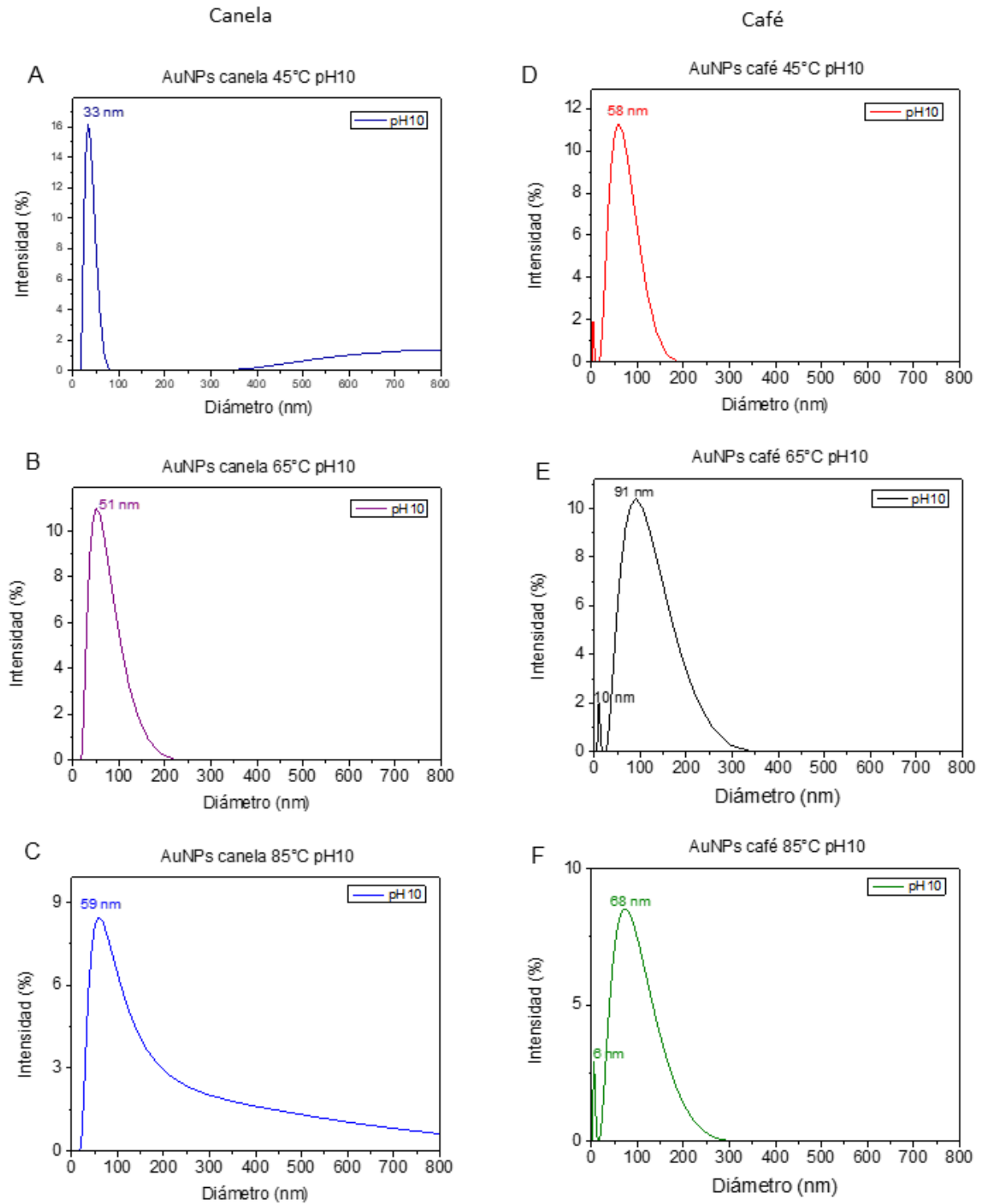


Figura 23. Espectros DLS de intensidad correspondientes a AuNPs sintetizadas con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E, F), donde se muestra el diámetro en nm correspondiente a las NPs sintetizadas a pH 10.

Tabla 4. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AuNPs sintetizadas con extracto de café.

Extracto utilizado	λ_{max}	Diámetro estimado a partir de λ_{max} (nm)	Diámetro reportado a partir de DLS (nm)
Café 45°C	536	50	58
Café 65°C	536	50	91
Café 85°C	542	60	68

6.2.2.2 DLS de nanopartículas de plata

La Figura 24 muestra los espectros de intensidad de AgNPs sintetizada con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E y F) elaborados a diferentes temperaturas y sintetizadas a pH 10 donde la curva indica el tamaño de las NPs.

En los espectros correspondientes a las AgNPs sintetizadas con extracto de canela se observan dos curvas en cada uno de los espectros (A, B y C) donde en todos los casos la segunda curva reporta valores que sobrepasan la escala nanométrica considerada (1-100 nm); por lo que se considera que las partículas correspondientes a estos resultados son agregados de NPs muy grandes, ya que sobrepasa la escala nanométrica por más de 100 nm. Los primeros picos muestran la formación de NPs de 33 nm (A) y 14 nm (B y C); se observa que en este caso, el tamaño de las NPs disminuye cuando se aumenta la temperatura de preparación del extracto.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el análisis UV-Vis se observa que son desiguales, en primer lugar los tamaños estimado de acuerdo con la λ_{max} obtenida en el análisis UV-Vis reporta valores de más de 50 nm; por el contrario, los tamaños de NPs basados en los resultados de DLS indican tamaños de no más de 33 nm. En un dato donde sí coinciden es que las NPs de mayor tamaño en ambos casos son las sintetizadas a partir del extracto de canela a 45 °C, aunque la diferencia de tamaños sea de 32 nm. Estos datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AgNPs sintetizadas con extracto de canela.

Extracto utilizado	λ_{max}	Diámetro estimado a partir de λ_{max} (nm)	Diámetro reportado a partir de DLS (nm)
Canela 45°C	424	65	33
Canela 65°C	420	62	14
Canela 85°C	416	58	14

Los espectros DLS de las NPs elaboradas con extracto de café, muestran una segunda curva en D y E al igual que en los espectros de AgNPs sintetizadas con canela, sin embargo el tamaño reportado apenas sobrepasa la escala nanométrica por 22 y 64 nm respectivamente, por lo cual se considera que, si bien en este caso también se forman agregados de NPs, son de menor tamaño que los formados con los extractos de canela. Al observar las curvas de los tres espectros que reportan valores dentro de la escala nanométrica, el tamaño de las AgNPs está en un rango de 18-33 nm y crece conforme aumenta la temperatura de preparación del extracto de café. En el espectro F, se observa un solo pico con un tamaño de NPs dentro de la escala nanométrica, por lo que se atribuye que en estas condiciones de reacción se obtienen las AgNPs más estables.

Los resultados del análisis DLS difieren con los tamaños de NPs estimados por UV-Vis. Mientras que las NPs elaboradas con extracto de café a 45 y 85 °C presentan la misma λ_{max} y, por lo tanto, se infiere que tendrían el mismo tamaño, los resultados de DLS muestran que hay una diferencia de 15 nm. Además, en el análisis de UV-Vis, el tamaño más grande de NPs se atribuye a la λ_{max} mayor presentada a este pH, que en este caso corresponde a las AgNPs sintetizadas con extracto de café a 65 °C, sin embargo, el análisis de DLS muestra que el tamaño más grande de NPs corresponde a las sintetizadas con café a 85 °C. Estos datos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de tamaños estimados y obtenidos por UV-Vis y DLS para AgNPs sintetizadas con extracto de café.

Extracto utilizado	λ_{max}	Diámetro estimado a partir de λ_{max} (nm)	Diámetro reportado a partir de DLS (nm)
Café 45°C	410	54	18
Café 65°C	416	58	21
Café 85°C	410	54	33

Espectros DLS de AgNPs

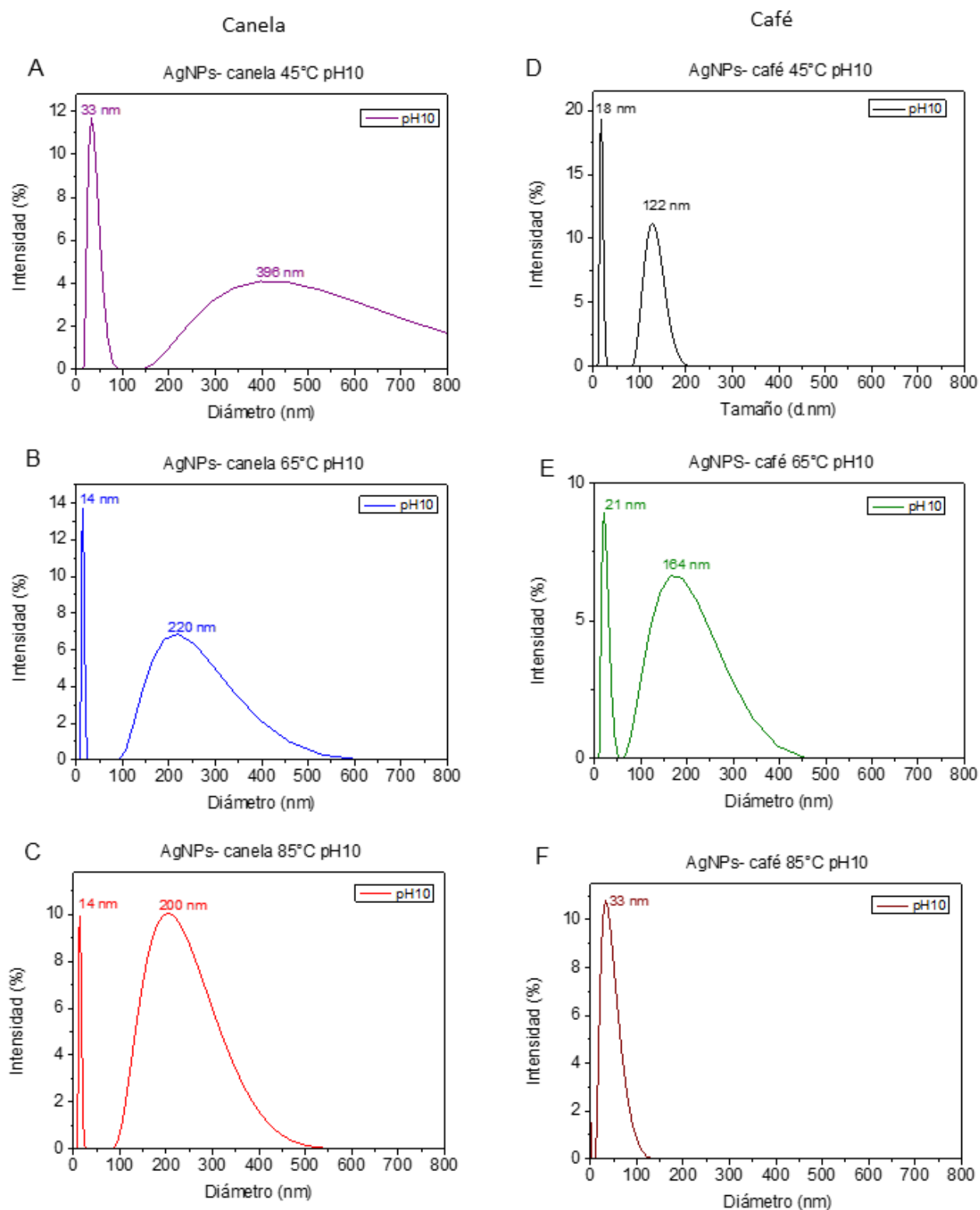


Figura 24. Espectros DLS de intensidad correspondientes a AgNPs sintetizadas con extractos de canela (A, B y C) y café (D, E, F), donde se muestra el diámetro en nm correspondiente a las NPs sintetizadas a pH 10.

En general, el uso de extracto de café para la síntesis de AgNPs, permite la formación de NPs más grandes en comparación de aquellas que se sintetizaron con canela; además de un aumento progresivo al aumentar la temperatura de elaboración del extracto. Por otro lado, los resultados obtenidos en el análisis UV-Vis no se asemejan con los obtenidos por DLS en ningún caso; mientras que los diámetros estimados a partir de λ_{max} , determinada mediante UV-Vis, son todos mayores a 50 nm, el diámetro calculado mediante DLS no sobrepasa los 35 nm.

Aunque los resultados obtenidos en los análisis de UV-Vis y DLS no son coincidentes al 100%, puede considerarse que ambas técnicas son complementarias y que demuestran el punto principal que es la formación de NPs y que el tamaño de las partículas obtenidas se encuentra en la escala nanométrica. Las variaciones en los datos obtenidos se pueden atribuir a la formación de posibles agregados de NPs que modifican la λ_{max} o el tamaño obtenido en DLS. Además, debe tenerse en cuenta que la estimación del tamaño de las NPs se realiza con base en lo reportado en artículos que calcularon el tamaño de las NPs metálicas teóricamente por lo que puede haber una diferencia de los valores reales al obtener las NPs de manera experimental. Así mismo, el equipo de DLS considera las moléculas que están alrededor de las NPs y las considera para calcular el tamaño del diámetro hidrodinámico de las NPs, por lo que debe tenerse en cuenta que el tamaño reportado no corresponde en su totalidad al de las NPs de la muestra.

De acuerdo con lo observado en los espectros de DLS de las NPs de oro y plata, se nota a simple vista que en general las AgNPs obtenidas son de menor tamaño y son más propensas a formar agregados, por lo que se infiere que son menos estables que las AuNPs formadas en las mismas condiciones de reacción. Estos resultados también demuestran la importancia de los factores de reacción y específicamente de la temperatura de preparación del extracto en la formación de las NPs metálicas, ya que el tamaño de estas y la formación de agregados se ve influenciada por este aspecto. Así mismo, el tipo de extracto e incluso el tipo de metal utilizado para la síntesis de NPs permite la obtención de NPs de distintos tamaños; en otras palabras, la combinación de estos factores en todas las variantes probadas en este trabajo conceden resultados distintos y deben elegirse aquellas que resulten en NPs del tamaño más conveniente para la aplicación donde quieran utilizarse.

6.3 Propiedades antimicrobianas

El análisis de las propiedades antibacterianas se dividió en dos partes; en la primera parte, se examinó el potencial antimicrobiano de las AuNPs y AgNPs sintetizadas con pH 10 en la reacción y a partir de extracto de canela elaborado a 85 °C, también se examinó este mismo para determinar si contaba con propiedades antibacterianas por sí solo. La Figura 25 muestra los resultados de esta primera parte y señala en recuadros negros los pocillos donde el crecimiento bacteriano es inhibido por la solución de interés, en otras palabras, muestra los pozos donde se observan propiedades de inhibición antimicrobiana.

En el caso del extracto de canela, aunque se han reportado propiedades antibacterianas de este, experimentalmente no se han obtenido resultados favorables de inhibición. El extracto muestra un efecto bactericida únicamente frente a *S. aureus*, por lo que puede considerarse que el extracto de canela tiene propiedades antibacterianas frente a algunas cepas bacterianas, en este caso de tipo Gram positivas (carril F de la Figura 25A), pero no es tan eficiente para considerar su aplicación en campos que necesiten inhibir potencialmente el crecimiento bacteriano; esta poca eficiencia puede atribuirse a la concentración de fitoquímicos presentes en el extracto debido al método de elaboración y el medio acuoso en el que está.

En los carriles de las AuNPs, hay crecimiento bacteriano en todos los pozos y para los tres tipos de cepas bacterianas (carriles B y G de la Figura 25A y carril B de la Figura 25B), lo que implica que este tipo de NPs no tienen actividad de inhibición bacteriana frente a las cepas utilizadas en el ensayo. Estos resultados son coincidentes por lo citado por [35], quien reporta que las AuNPs no tienen propiedades antibacterianas por sí mismas, como es el caso de las AgNPs, por lo que para utilizarlas en aplicaciones antibacterianas es necesario conjugarlas con otros compuestos que favorezcan la actividad antibacteriana y aun aprovechar la estabilidad y mantener las propiedades fisicoquímicas de las NPs de oro, las cuales se aprovechan para alcanzar el efecto antimicrobiano.

Finalmente las AgNPs sí muestran efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias (carriles C y H de la Figura 25A y carril C de la Figura 25B), en diferente concentración para los tipos de cepa utilizados en el ensayo, debido a estas observaciones se considera que a mayor o menor concentración de AgNPs, las propiedades de

inhibición estarán presentes en este tipo de NPs metálicas por sí mismas, sin la necesidad o dependencia de otros compuestos para presentar dichas propiedades.

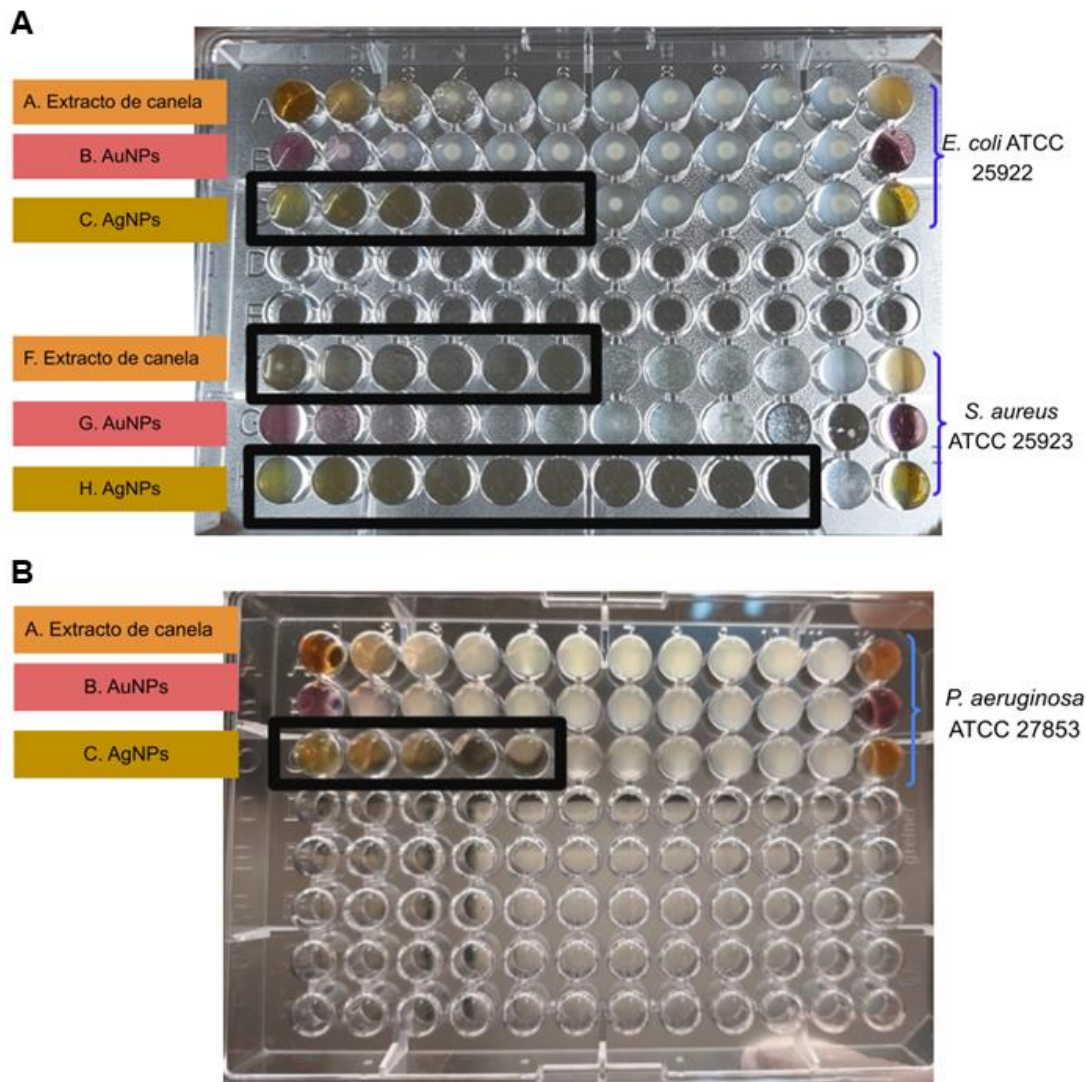


Figura 25. Propiedades de inhibición del crecimiento del extracto de canela elaborado a 85 °C, AuNPs y AgNPs frente a diferentes cepas bacterianas.

La segunda parte de este análisis de propiedades antibacterianas se enfocó en la determinación de la MIC de las NPs de plata frente a las tres cepas mencionadas anteriormente, el ensayo de microdilución se hizo por duplicado para cada una de las cepas y los resultados se muestran en la Figura 25, donde se marca con recuadros amarillos la columna de pozos donde se no se detecta crecimiento bacteriano visible, que corresponde al MIC de AgNPs.

En la Figura 26, se observa que no hay crecimiento bacteriano visible en ninguna de las concentraciones de AgNPs probadas, es decir, la MIC para esta cepa está por

debajo del 0.048%, lo que indica que la eficacia de inhibición de *S. aureus* es muy alta. En el caso de la MIC contra bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) se necesita una concentración de AgNPs del 3.12% y 6.25% respectivamente, en otras palabras, aunque ambas cepas pertenecen a la misma clase de bacterias, se necesita una mayor concentración de AgNPs para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en comparación con *E. coli* y aún más en comparación con *S. aureus*. Estos resultados coinciden con datos reportados por Zaidi et al., 2017 y Wang et al., 2017 [33], [34], donde se menciona que las AgNPs son más eficaces frente a bacterias Gram positivas sobre Gram negativas y se atribuye a las características de las paredes celulares bacterianas que presentan cada una de ellas. La pared celular de las bacterias Gram positivas es porosa, lo que permite el paso de moléculas externas y posteriormente el enlace de estas a componentes de la pared celular que conlleva a la muerte celular. Por otro lado, la pared celular Gram negativa no es porosa y actúa como una barrera que dificulta el paso de las partículas en escala nanométrica. A pesar de estas características de difícil acceso para las NPs, el efecto antimicrobiano de estas no queda anulado, solo ocasionan que se necesite una concentración mayor de AgNPs para la inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que no se puede negar su efecto antimicrobiano.

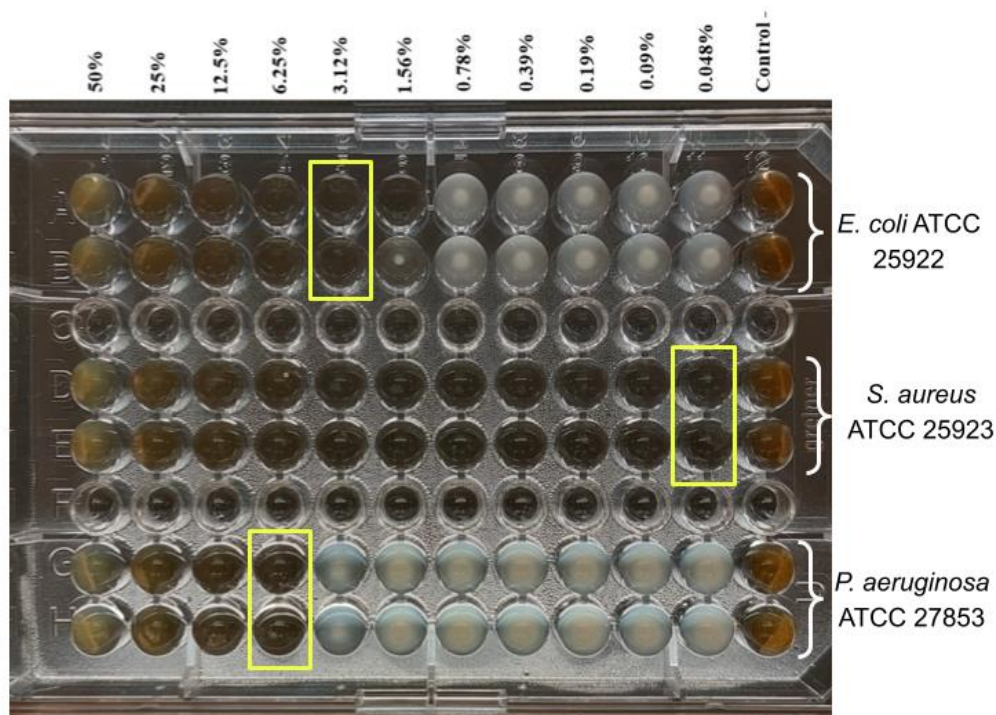


Figura 26. Concentración inhibitoria mínima de AgNPs frente a tres cepas bacterianas diferentes. A y B: *E. coli* ATCC 25922 (MIC = 3.12%); D y E: *S. aureus* ATCC 25923: (MIC \leq 0.048%); G y H: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC = 6.25%).

7 CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se sintetizaron nanopartículas de oro y plata utilizando como agente reductor extractos de canela (*C. zeylanicum*), café (*C. arabica*) y jengibre (*Z. officinale*) y se evaluaron sus propiedades antibacterianas. Bajo las condiciones de reacción planteadas en este trabajo se logró exitosamente la síntesis verde de AuNPs y AgNPs al utilizar los extractos de canela y café, sin embargo, no fueron favorables para la formación de NPs al utilizar el extracto de jengibre, debido a que no se logró la formación de soluciones coloidales estables comparadas con las obtenidas al utilizar los otros dos extractos.

La formación de NPs de oro y plata se demostró cualitativamente al observar un cambio de color en la solución coloidal característico de la formación de NPs a tonos rojos-morados y cafés, respectivamente, al adicionar el agente reductor a la sal metálica. En este punto también se determinó la influencia de las condiciones de síntesis (temperatura y pH), propuestas en este trabajo, en la obtención de NPs comprobando que estos factores, así como la naturaleza del extracto, afectan el tamaño y la velocidad de síntesis de las NPs y que las diferentes combinaciones de estos elementos en el proceso de reacción pueden modificar de distintas maneras las NPs obtenidas. Se observó que las mejores condiciones de reacción en este trabajo son el uso de extracto de canela y pH alcalino y temperaturas del extracto de 65 °C y 85 °C, debido a los tiempos reducidos de síntesis, la uniformidad de las curvas presentadas en los análisis UV-Vis y el tamaño de las NPs reportado por DLS.

Las condiciones de reacción y elaboración de los extractos utilizados suponen un aporte a los trabajos de investigación de este campo al analizar cómo estas impactan en la formación de AuNPs y AgNPs, sobre todo al proponer variaciones de temperatura en la elaboración del extracto natural y no en la reacción de reducción; y representan un punto de partida para optimizar dichas condiciones de acuerdo a las características que se deseen en las NPs metálicas de acuerdo con el campo de aplicación donde quieran utilizarse.

Se caracterizaron las NPs sintetizadas mediante UV-Vis y DLS. La λ_{max} obtenida mediante el análisis UV-Vis están dentro de los rangos reportados para las AuNPs y AgNPs y el tamaño de NPs estimados con base en estos resultados, así como los obtenidos por el análisis DLS demuestran que el tamaño de las partículas metálicas obtenidas se encuentra en la escala nanométrica, por lo que se determina

que la síntesis fue exitosa. Así mismo, los resultados de estas técnicas de caracterización demostraron la importancia de las condiciones de reacción, principalmente de la temperatura de elaboración del extracto, en la obtención de NPs metálicas y sus características de tamaño, forma y tendencia a la agregación entre ellas.

Finalmente, se evaluaron las propiedades antibacterianas de las soluciones coloidales de AuNPs y AgNPs sintetizadas a pH 10 a partir del extracto de canela elaborado a 85 °C, así como este extracto frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los resultados de esta evaluación demostraron las propiedades antibacterianas del extracto de canela únicamente frente una bacteria de tipo Gram positiva (*S. aureus*) y de las NPs de plata frente a ambos tipos de bacterias, siendo más eficaces al utilizarse con Gram positivas en comparación con las Gram negativas al necesitar una MIC más baja para inhibir el crecimiento bacteriano de las primeras. Con base en lo anterior, se comprueba que el uso de extractos naturales de canela y café como agentes reductores en la síntesis, permite la obtención de NPs que representan una alternativa económica y amigable con el ambiente al utilizar elementos comerciales y de fácil disponibilidad para la elaboración del extracto y no se requiere de otro tipo de sustancias químicas, como estabilizadores, en la reacción de síntesis.

8 PERSPECTIVAS A FUTURO

En futuras investigaciones, sería conveniente enfocarse en probar otras condiciones de reacción para observar cómo estas nuevas variantes modifican las características de las NPs obtenidas hasta encontrar un método eficaz de acuerdo con lo que se desee en cada investigación. Es importante mencionar que una de las principales limitantes de la síntesis verde es que al haber tanta variedad de material biológico que puede utilizarse y que a cada uno de estos le afecta de manera diferente las condiciones de reacción, hasta ahora no se ha podido estandarizar o predecir el tipo de NPs a obtener, por lo que vale la pena centrar la atención de futuras investigaciones en este aspecto.

Otro aspecto que considerar sería una evaluación más amplia de las propiedades antibacterianas de las NPs. Puede considerarse un catálogo más extenso de bacterias y considerar cepas clínicas o multidrogorresistentes para determinar su eficacia contra ellas y compararla con la efectividad de los antibióticos tradicionales

para la posible aplicación de estas como una alternativa a la resistencia de antibióticos que es considerado como una problemática importante actualmente.

9 BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. E. Friedersdorf and Q. A. Spadola, "Introduction to Nanotechnology," in *Women in Nanotechnology*, Springer, Cham, 2020, pp. 1–14.
- [2] C. Buzea and I. Pacheco, "Nanomaterials and their classification," *Adv. Struct. Mater.*, vol. 62, pp. 3–45, Nov. 2017, doi: 10.1007/978-81-322-3655-9_1/COVER.
- [3] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, pp. 1578–1586, 2008, doi: 10.1021/ar7002804.
- [4] M. Rafique, I. Sadaf, M. S. Rafique, and M. B. Tahir, "A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications," *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 45, no. 7, pp. 1272–1291, Oct. 2017, doi: 10.1080/21691401.2016.1241792.
- [5] K. Vijayaraghavan and T. Ashokkumar, "Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 5, pp. 4866–4883, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.JECE.2017.09.026.
- [6] M. Ovais *et al.*, "Role of plant phytochemicals and microbial enzymes in biosynthesis of metallic nanoparticles," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 16, pp. 6799–6814, Aug. 2018, doi: 10.1007/S00253-018-9146-7.
- [7] B. Bhushan, "Introduction to Nanotechnology," *Springer Handbooks*, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1007/978-3-662-54357-3_1.
- [8] S. Srivastava and A. Bhargava, *Green Nanoparticles: The Future of Nanobiotechnology*. 2022.
- [9] S. H. Lee and B. H. Jun, "Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 4, Feb. 2019, doi: 10.3390/IJMS20040865.
- [10] Y.-C. Lee and J.-Y. Moon, "Introduction to Nanotechnology and Bionanotechnology," in *Introduction to Bionanotechnology*, Springer, Singapore, 2020, pp. 1–14.
- [11] J. R. Peralta-Videa *et al.*, "Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis?," *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2016 11, vol. 1, no. 1, pp. 1–29, Aug. 2016, doi: 10.1007/S41204-016-0004-5.
- [12] P. N. Sudha, K. Sangeetha, K. Vijayalakshmi, and A. Barhoum, "Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market," *Emerg. Appl. Nanoparticles Archit. Nanostructures Curr. Prospect. Futur. Trends*, pp. 341–384, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-323-51254-1.00012-9.
- [13] T. A. Saleh, "Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities," *Environ. Technol. Innov.*, vol. 20, p. 101067, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.ETI.2020.101067.
- [14] A. García-Contreras and A. Castañeda-Facio, "Obtaining Metallic Nanoparticles Using Green Methodologies," *J. BioProcess Chem. Technol.*, vol. 14, no. 24, pp. 8–15, 2020.
- [15] J. M. Al-khayri, M. I. Ansari, and A. K. Singh, *Nanobiotechnology Mitigation of Abiotic Stress in Plants*. 2021.
- [16] N. Tepale *et al.*, "Nanoengineering of Gold Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization, and Applications," *Cryst. 2019, Vol. 9, Page 612*, vol. 9, no. 12, p. 612, Nov. 2019, doi: 10.3390/CRYST9120612.
- [17] J. F. Masson, "Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors," *Analyst*,

- vol. 145, no. 11, pp. 3776–3800, Jun. 2020, doi: 10.1039/D0AN00316F.
- [18] D. A. Cruz, M. C. Rodríguez, J. M. López, V. M. Herrera, A. G. Orive, and A. H. Creus, “NPs metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda,” *Av. en Ciencias e Ing.*, vol. 3, no. 2, pp. 67–78, 2012, [Online]. Available: <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3962777.pdf%5Cnhttp://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=3962777>.
- [19] L. Pereira, F. Mehboob, A. J. M. Stams, M. M. Mota, H. H. M. Rijnaarts, and M. M. Alves, “Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation,” <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.819484>, vol. 35, no. 1, pp. 114–128, Mar. 2015, doi: 10.3109/07388551.2013.819484.
- [20] R. Hawk, “What Is a Colloidal Suspension?,” 2023. <https://www.allthescience.org/what-is-a-colloidal-suspension.htm> (accessed Jan. 31, 2023).
- [21] N. Sarfraz and I. Khan, “Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications,” *Chem. - An Asian J.*, vol. 16, no. 7, pp. 720–742, 2021, doi: 10.1002/asia.202001202.
- [22] A. K. Mittal, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, “Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, pp. 346–356, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2013.01.003.
- [23] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, “The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine.,” *Molecules*, vol. 25, no. 1, pp. E112–E112, Dec. 2019, doi: 10.3390/MOLECULES25010112.
- [24] D. J. Barber and I. C. Freestone, “an Investigation of the Origin of the Colour of the Lycurgus Cup By Analytical Transmission Electron Microscopy,” *Archaeometry*, vol. 32, no. 1, pp. 33–45, 1990, doi: 10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x.
- [25] F. J. Heiligttag and M. Niederberger, “The fascinating world of nanoparticle research,” *Mater. Today*, vol. 16, no. 7–8, pp. 262–271, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.MATTOD.2013.07.004.
- [26] J. M. Oliva Montero, “Copa de Licurgo: Cuando la ciencia y arte se dan la mano para hacer historia,” pp. 1–2, 2010.
- [27] R. Morones, “Historia de la plata : su impacto en las antiguas civilizaciones y la sociedad moderna,” *Rev. Digit. Univ.*, vol. 11, no. 7, pp. 1–9, 2010, [Online]. Available: <http://www.revista.unam.mx/vol.11/num7/art70/index.html>.
- [28] P. Medina and M. T. Mejía, “Monografía de la plata.” Servicio Geológico Mexicano.
- [29] R. A. Morales-Luckie *et al.*, “Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Heterotheca inuloides* as reducing agent and natural fibers as templates: Agave lechuguilla and silk,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 429–436, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.06.066.
- [30] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, and M. K. Danquah, “Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations,” *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, p. 1050, Apr. 2018, doi: 10.3762/BJNANO.9.98.
- [31] B. Nowack, H. F. Krug, and M. Height, “120 years of nanosilver history: Implications for policy makers,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 4, pp. 1177–1183, Feb. 2011, doi: 10.1021/ES103316Q/SUPPL_FILE/ES103316Q_SI_001.PDF.
- [32] R. Krahne, G. Morello, A. Figuerola, C. George, S. Deka, and L. Manna, “Physical properties of elongated inorganic nanoparticles,” *Phys. Rep.*, vol. 501, no. 3–5, pp. 75–221, 2011, doi: 10.1016/j.physrep.2011.01.001.
- [33] S. Zaidi, L. Misba, and A. U. Khan, “Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 7, pp. 2281–2301, Oct. 2017, doi:

- 10.1016/J.NANO.2017.06.015.
- [34] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, "The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, p. 1227, Feb. 2017, doi: 10.2147/IJN.S121956.
- [35] R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, "Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 13–14, pp. 1803–1815, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.ADDR.2013.07.011.
- [36] M. Mittal, M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy, and A. B. Malik, "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 20, no. 7, pp. 1126–1167, Mar. 2014, doi: 10.1089/ARS.2012.5149/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE12.JPEG.
- [37] S. M. Dizaj, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M. H. Zarrintan, and K. Adibkia, "Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 44, pp. 278–284, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.MSEC.2014.08.031.
- [38] M. RA *et al.*, "Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 64, no. 3, pp. 211–222, 2005, doi: 10.3354/DAO064211.
- [39] J. J. Picazo, "Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos," *Procedimientos en Microbiol. Clínica*, pp. 18–23.
- [40] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, and R. W. Murray, "Gold nanoparticles: Past, present, and future," *Langmuir*, vol. 25, no. 24, pp. 13840–13851, 2009, doi: 10.1021/la9019475.
- [41] N. U. Islam, K. Jalil, M. Shahid, N. Muhammad, and A. Rauf, "Pistacia integerrima gall extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and their biological activities," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 8, pp. 2310–2319, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.ARABJC.2015.02.014.
- [42] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, and M. A. El-Sayed, "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, p. 2740, Apr. 2012, doi: 10.1039/C1CS15237H.
- [43] P. Moitra *et al.*, "Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 14, no. 6, pp. 7617–7627, Jun. 2020, doi: 10.1021/ACSNANO.0C03822/SUPPL_FILE/NN0C03822_SI_004.MP4.
- [44] Q. Y. Wei, K. M. He, J. L. Chen, Y. M. Xu, and A. T. Y. Lau, "Phytofabrication of Nanoparticles as Novel Drugs for Anticancer Applications," *Molecules*, vol. 24, no. 23, Nov. 2019, doi: 10.3390/MOLECULES24234246.
- [45] S. Patskovsky, E. Bergeron, and M. Meunier, "Hyperspectral darkfield microscopy of PEGylated gold nanoparticles targeting CD44-expressing cancer cells," *J. Biophotonics*, vol. 8, no. 1–2, pp. 162–167, Jan. 2015, doi: 10.1002/JBIO.201300165.
- [46] P. Singh, S. Pandit, V. R. S. S. Mokkalapati, A. Garg, V. Ravikumar, and I. Mijakovic, "Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.3390/IJMS19071979.
- [47] G. Ku, Q. Huang, X. Wen, J. Ye, D. Piwnica-Worms, and C. Li, "Spatial and Temporal Confined Photothermolysis of Cancer Cells Mediated by Hollow Gold Nanospheres Targeted to Epidermal Growth Factor Receptors," *ACS Omega*, vol. 3, no. 5, pp. 5888–5895, May 2018, doi: 10.1021/ACSOMEGA.8B00712/ASSET/IMAGES/LARGE/AO-2018-00712Y_0004.JPEG.
- [48] A. Alshammari, V. N. Kalevaru, A. Alshammari, and V. N. Kalevaru, "Supported Gold Nanoparticles as Promising Catalysts," *Catal. Appl. Nano-Gold Catal.*, Aug. 2016, doi: 10.5772/64394.
- [49] S. A. C. Carabineiro, "Supported Gold Nanoparticles as Catalysts for the Oxidation of Alcohols and Alkanes," *Front. Chem.*, vol. 7, p. 702, Nov. 2019, doi: 10.3389/FCHEM.2019.00702/BIBTEX.
- [50] M. Shah, V. Badwaik, Y. Kherde, H. K. Waghvani, T. Modi, and Z. P. Aguilar, "Gold nanoparticles: various

- methods of synthesis and antibacterial applications,” *Front. Biosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 1320–1344, 2014.
- [51] G. V. Vimbela, S. M. Ngo, C. Frazee, L. Yang, and D. A. Stout, “Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, p. 3941, May 2017, doi: 10.2147/IJN.S134526.
- [52] Y. Cui, Y. Zhao, Y. Tian, W. Zhang, X. Lü, and X. Jiang, “The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 7, pp. 2327–2333, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.057.
- [53] E. Abbasi *et al.*, “Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties,” <http://dx.doi.org.proxydgb.buap.mx/10.3109/1040841X.2014.912200>, vol. 42, no. 2, pp. 173–180, Mar. 2014, doi: 10.3109/1040841X.2014.912200.
- [54] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.3390/IJMS17091534.
- [55] A. Loiseau, V. Asila, G. Boitel-Aullen, M. Lam, M. Salmain, and S. Boujday, “Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing,” *Biosensors*, vol. 9, no. 2, Jun. 2019, doi: 10.3390/BIOS9020078.
- [56] D. D. Evanoff and G. Chumanov, “Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays,” *ChemPhysChem*, vol. 6, no. 7, pp. 1221–1231, 2005, doi: 10.1002/cphc.200500113.
- [57] S. S. Naqvi, H. Anwar, A. Siddiqui, and M. R. Shah, “Sensitive and highly selective colorimetric biosensing of vitamin-C and vitamin-B1 by flavoring agent-based silver nanoparticles,” *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 27, no. 4–5, Aug. 2022, doi: 10.1007/S00775-022-01944-5.
- [58] J. Park, S. H. Cha, S. Cho, and Y. Park, “Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 1–13, Jun. 2016, doi: 10.1007/S11051-016-3466-2/METRICS.
- [59] M. T. Alula, L. Karamchand, N. R. Hendricks, and J. M. Blackburn, “Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1007, pp. 40–49, May 2018, doi: 10.1016/j.aca.2017.12.016.
- [60] M. Peña-Sanoja and J. De Sanctis, “Autgafia y respuesta,” *Invest. Clin.*, vol. 54, no. 3, pp. 325–337, 2013.
- [61] W. Zhou, Y. Ma, H. Yang, Y. Ding, and X. Luo, “A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, p. 381, 2011, doi: 10.2147/IJN.S13249.
- [62] B. Li *et al.*, “Fluorometric detection of cancer marker FEN1 based on double-flapped dumbbell DNA nanoprobe functionalized with silver nanoclusters,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1148, p. 238194, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.12.069.
- [63] M. Azizi, H. Ghourchian, F. Yazdian, S. Bagherifam, S. Bekhradnia, and B. Nyström, “Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-05461-3.
- [64] V. Pareek, R. Gupta, and J. Panwar, “Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 90, pp. 739–749, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.04.093.
- [65] S. Tang and J. Zheng, “Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 13, p. 1701503, Jul. 2018, doi: 10.1002/adhm.201701503.
- [66] S. M. Mousavi *et al.*, “Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study,” *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 46, no. sup3, pp. S855–S872, Nov. 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1517769.
- [67] G. Franci *et al.*, “Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents,” *Molecules*, vol. 20, no. 5, p. 8856,

- 2015, doi: 10.3390/MOLECULES20058856.
- [68] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, "Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, p. 1712, Mar. 2007, doi: 10.1128/AEM.02218-06.
- [69] I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, M. L. Mei, Q. Li, and C. H. Chu, "The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, p. 2555, 2020, doi: 10.2147/IJN.S246764.
- [70] NIH, "Aflatoxinas - NCI," 2018. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/sustancias/aflatoxinas/aflatoxinas> (accessed Feb. 14, 2023).
- [71] H. Tavakoli, H. Rastegar, M. Taherian, M. Samadi, and H. Rostami, "The effect of nano-silver packaging in increasing the shelf life of nuts: An in vitro model," *Ital. J. Food Saf.*, vol. 6, no. 4, pp. 156–161, Oct. 2017, doi: 10.4081/IJFS.2017.6874.
- [72] A. Pluta-Kubica, E. Jamróz, G. Khachatryan, A. Florkiewicz, and P. Kopel, "Application of Furcellaran Nanocomposite Film as Packaging of Cheese," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 9, May 2021, doi: 10.3390/POLYM13091428.
- [73] M. Awad, M. Yosri, M. M. Abdel-Aziz, A. M. Younis, and N. M. Sidkey, "Assessment of the Antibacterial Potential of Biosynthesized Silver Nanoparticles Combined with Vancomycin Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Induced Infection in Rats," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 199, no. 11, pp. 4225–4236, Nov. 2021, doi: 10.1007/S12011-020-02561-6.
- [74] S. M. Amini, "Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 103, p. 109809, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.109809.
- [75] E. Alphandéry, "Natural Metallic Nanoparticles for Application in Nano-Oncology," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1–12, Jun. 2020, doi: 10.3390/IJMS21124412.
- [76] M. Monge, "NPs de plata : métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas," *Investig. Quim.*, no. August, pp. 33–41, 2009.
- [77] D. Alvear, S. Galeas, V. H. Guerrero, and A. Debut, "Síntesis y Caracterización de NPs de Magnetita," *Rev. Politécnica*, vol. 39, no. 2, pp. 61–66, 2017, [Online]. Available: <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/rpolit/v39n2/2477-8990-rpolit-39-02-00061.pdf>.
- [78] J. M. Ibarra, "Síntesis y caracterización de NPs de plata por el método de reducción química: optimización del método," Centro de Investigación en Materiales Avanzados, 2014.
- [79] P. Cheviron, F. Gouanvé, and E. Espuche, "Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites," *Carbohydr. Polym.*, vol. 108, no. 1, pp. 291–298, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2014.02.059.
- [80] B. Sadeghi, "Zizyphus mauritiana extract-mediated green and rapid synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial activity," *J. Nanostructure Chem.* 2015 53, vol. 5, no. 3, pp. 265–273, Apr. 2015, doi: 10.1007/S40097-015-0157-Y.
- [81] A. Kaler, S. Jain, and U. C. Banerjee, "Green and Rapid Synthesis of Anticancerous Silver Nanoparticles by *Saccharomyces boulardii* and Insight into Mechanism of Nanoparticle Synthesis," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/872940.
- [82] M. I. Hussein, M. A. El-Aziz, Y. Badr, and M. A. Mahmoud, "Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 67, no. 3–4, pp. 1003–1006, Jul. 2007, doi: 10.1016/J.SAA.2006.09.028.
- [83] R. Bhambure, M. Bule, N. Shaligram, M. Kamat, and R. Singhal, "Extracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles using *Aspergillus niger* – its Characterization and Stability," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 32, no. 7, pp. 1036–1041, Jul. 2009, doi: 10.1002/CEAT.200800647.

- [84] S. Kaabipour and S. Hemmati, "A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 12, p. 102, 2021, doi: 10.3762/BJNANO.12.9.
- [85] G. Marslin *et al.*, "Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles," *Mater. 2018*, Vol. 11, Page 940, vol. 11, no. 6, p. 940, Jun. 2018, doi: 10.3390/MA11060940.
- [86] N. S. Flores-Lopez, J. A. Cervantes-Chávez, D. G. Téllez de Jesús, M. Cortez-Valadez, M. Estévez-González, and R. Esparza, "Bactericidal and fungicidal capacity of Ag₂O/Ag nanoparticles synthesized with Aloe vera extract," <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1925492>, vol. 56, no. 7, pp. 762–768, 2021, doi: 10.1080/10934529.2021.1925492.
- [87] A. Salayová *et al.*, "Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 4, p. 1005, Apr. 2021, doi: 10.3390/NANO11041005/S1.
- [88] K. S. Siddiqi and A. Husen, "Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 40, pp. 10–23, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.JTEMB.2016.11.012.
- [89] J. O. Adeyemi, A. O. Oriola, D. C. Onwudiwe, and A. O. Oyedeji, "Plant Extracts Mediated Metal-Based Nanoparticles: Synthesis and Biological Applications," *Biomolecules*, vol. 12, no. 5, 2022, doi: 10.3390/biom12050627.
- [90] Z. ur R. Mashwani, M. A. Khan, T. Khan, and A. Nadhman, "Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 234, pp. 132–141, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.CIS.2016.04.008.
- [91] N. Singh *et al.*, "Phytochemical and pharmacological review of Cinnamomum verum J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition," *Food Chem.*, vol. 338, p. 127773, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.127773.
- [92] S. F. Nabavi, A. Di Lorenzo, M. Izadi, E. Sobarzo-Sánchez, M. Daglia, and S. M. Nabavi, "Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries," *Nutrients*, vol. 7, no. 9, p. 7729, Sep. 2015, doi: 10.3390/NU7095359.
- [93] L. B. de Lima *et al.*, "Chemical and antibacterial analysis of Cinnamomum verum leaves extract and fractions against multidrug resistant bacteria," *Nat. Prod. Res.*, vol. 36, no. 10, pp. 2559–2564, 2022, doi: 10.1080/14786419.2021.1902323/SUPPL_FILE/GNPL_A_1902323_SM4970.DOCX.
- [94] N. Soni and S. Prakash, "Green Nanoparticles for Mosquito Control," *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/496362.
- [95] É. B. Patay, T. Bencsik, and N. Papp, "Phytochemical overview and medicinal importance of Coffea species from the past until now," *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 9, no. 12, pp. 1127–1135, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.APJTM.2016.11.008.
- [96] R. C. L. Affonso *et al.*, "Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1923754.
- [97] V. Dhand, L. Soumya, S. Bharadwaj, S. Chakra, D. Bhatt, and B. Sreedhar, "Green synthesis of silver nanoparticles using Coffea arabica seed extract and its antibacterial activity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 36–43, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2015.08.018.
- [98] B. Nemzer, N. Abshiru, and F. Al-Taher, "Identification of Phytochemical Compounds in Coffea arabica Whole Coffee Cherries and Their Extracts by LC-MS/MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, no. 11, pp. 3430–3438, 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c05937.
- [99] W. Khochapong, S. Ketnawa, Y. Ogawa, and N. Punbusayakul, "Effect of in vitro digestion on bioactive

- compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract,” *Food Chem.*, vol. 348, p. 129094, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.129094.
- [100] S. Rampogu *et al.*, “Ginger (*Zingiber officinale*) phytochemicals—gingerenone-A and shogaol inhibit SaHPPK: molecular docking, molecular dynamics simulations and in vitro approaches,” *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 17, no. 1, p. 16, Apr. 2018, doi: 10.1186/S12941-018-0266-9.
- [101] M. Talebi *et al.*, “*Zingiber officinale* ameliorates Alzheimer’s disease and Cognitive Impairments: Lessons from preclinical studies,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 133, p. 111088, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2020.111088.
- [102] M. Sharifi-Rad *et al.*, “Plants of the Genus *Zingiber* as a Source of Bioactive Phytochemicals: From Tradition to Pharmacy,” *Mol. A J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.*, vol. 22, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22122145.
- [103] K. Kalantari, A. M. Affi, M. Moniri, A. B. Moghaddam, A. Kalantari, and Z. Izadiyan, “Autoclave-assisted synthesis of AgNPs in *Z. officinale* extract and assessment of their cytotoxicity, antibacterial and antioxidant activities,” *IET Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 3, pp. 262–268, May 2019, doi: 10.1049/IET-NBT.2018.5066.
- [104] P. N. Njoki *et al.*, “Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 40, pp. 14664–14669, 2007, doi: 10.1021/jp074902z.
- [105] I. Ruiz De Larramendi, “Influencia del propiedades físicas de NPs de Au,” *Nanotecnología en Aliment.*, pp. 1–12, 2016.
- [106] A. Amirjani, F. Firouzi, and D. F. Haghshenas, “Predicting the Size of Silver Nanoparticles from Their Optical Properties,” *Plasmonics*, vol. 15, no. 4, pp. 1077–1082, 2020, doi: 10.1007/s11468-020-01121-x.
- [107] J. Tom, “Espectroscopía UV-Vis: principio, fortalezas y limitaciones y aplicaciones,” *Análisis y separaciones*, 2021. <https://www.news-courier.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>.
- [108] F. S. Rocha, A. J. Gomes, C. N. Lunardi, S. Kaliaguine, and G. S. Patience, “Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis,” *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 96, no. 12, pp. 2512–2517, Dec. 2018, doi: 10.1002/CJCE.23344.
- [109] Z. Chen *et al.*, “UV-Vis Spectroscopy,” in *Photoelectrochemical Water Splitting*, Springer, New York, NY, 2013, pp. 49–62.
- [110] R. García, “Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro,” *Av. en Química*, vol. 13, no. 3, pp. 79–82, 2021, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/journal/933/93368279004/html/>.
- [111] I. Insua, “Polyion complex (PIC) nanoparticles for the targeted and passive delivery of antimicrobial polymers and peptides,” University of Birmingham, 2017.
- [112] Malvern Instruments, “Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes Introduction,” pp. 1–8, 2015.
- [113] Malvern Instruments Ltd., “Size theory,” *Zetasizer Nano User Man.*, vol. MAN0485, no. 11, p. 250, 2013, [Online]. Available: [https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS measurement principles.pdf](https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS%20measurement%20principles.pdf)
[https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf](https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf).
- [114] E. Summary and D. L. Scattering, “Application of Dynamic Light Scattering (DLS) to Protein Therapeutic Formulations : Principles , Measurements and Analysis - 3 . DLS Deconvolution Algorithms,” 2014.
- [115] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, “Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,” *Biophys. Rev.*, vol. 8, no. 4, p. 409, Dec. 2016, doi: 10.1007/S12551-016-0218-6.

10 ANEXOS

10.1 Técnicas de caracterización de Nanopartículas

10.1.1 UV-Visible

La espectroscopia UV-Vis es una técnica analítica rápida que mide la cantidad de las longitudes de onda discretas de luz UV o visible que son absorbidas o transmitidas a través de una muestra en comparación con una muestra de referencia o blanco. Proporciona información sobre lo que hay en la muestra y en qué concentración [107]. Aunque la longitud de onda UV varía de 100 a 380 nm y el componente visible sube a 800 nm, el rango práctico para la espectroscopia UV-vis varía de 200 a 800 nm o incluso llega a utilizar longitudes de onda en el infrarrojo cercano hasta 1100 nm [108]. En general, un espectrofotómetro consta de ciertos componentes principales que se mencionan a continuación y se muestran en la Figura 27.

- Fuente de luz: debe proporcionar longitudes de onda de luz adecuada e intensidad constante. La elección de la lámpara depende del rango de longitud de onda deseado. Típicamente se utilizan lámparas de tungsteno que proporciona luz en la longitud de onda de 380 a 800 nm y cubre el rango de la región visible. Para trabajos que requieren una gran cantidad de radiación UV en el rango de 160 a 400 nm, son preferibles las lámparas de deuterio [107],[109], [110] .
- Selector de longitud de onda: se deben seleccionar ciertas longitudes de onda de luz adecuadas para el tipo de muestra para el análisis de la muestra a partir de las longitudes de onda emitidas por la fuente de luz. Usualmente se utiliza un monocromador generalmente se coloca antes o después de la muestra y se encarga de elegir la longitud de onda que pasa a través de la rendija de salida [108], [109].
- Portador de muestra: se utilizan celdas o cubetas que contienen la muestra para su análisis. Se debe medir una muestra de referencia o muestra blanco, como una cubeta llena con un disolvente similar al que se utiliza para preparar la muestra. Posteriormente, el instrumento utiliza la señal de la muestra de referencia como base para obtener los valores reales de absorción [107].

- Detector: se utiliza para convertir la luz en una señal electrónica legible. La información de espectroscopia UV-Vis puede presentarse como un gráfico de absorbancia, densidad óptica o transmitancia en función a la longitud de onda, siendo el gráfico de absorbancia el que se presenta comúnmente [107].

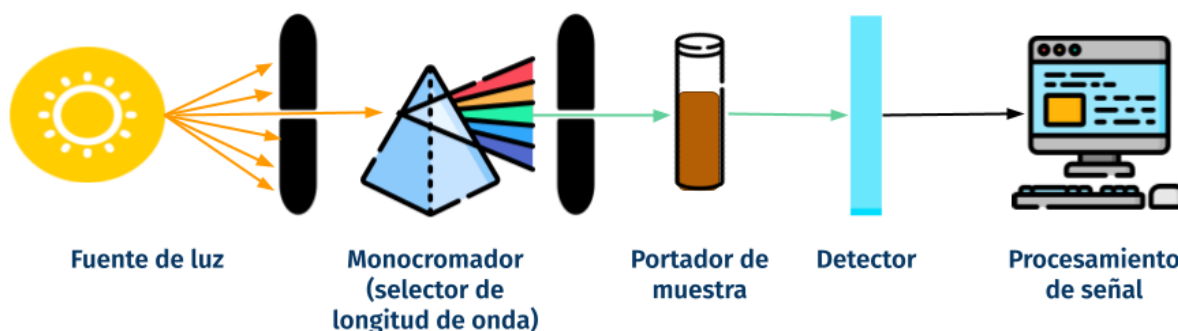


Figura 27. Esquema simplificado de los componentes principales de un espectrofotómetro UV-Vis.

En síntesis, los espectrofotómetros UV-Vis dirigen una fuente de luz a través de una muestra y un detector en el lado opuesto registra la luz transmitida. Los gráficos de los datos tienen la línea base en la parte inferior con los picos apuntando hacia arriba e informan la longitud de onda en nanómetros en el eje x y la absorbancia en el eje y. La absorbancia representa la cantidad de luz que se absorbe en cada longitud de onda y es útil para analizar o identificar diferentes sustancias localizando las longitudes de onda específicas correspondientes a la absorbancia máxima, es decir, el pico más alto presente en el gráfico [107], [108].

La espectroscopia UV-Vis se basa en transiciones electrónicas de moléculas que absorben luz y excitan electrones desde un orbital de menor energía a un orbital desocupado de mayor energía. La energía de longitud de onda de la luz absorbida debe ser igual a la brecha de energía del paso de un orbital a otro [108]. Esta propiedad está descrita por la ley de Lambert-Beer, mostrada a continuación, que dice que la absorbancia de luz es proporcional a la longitud del camino de la luz a través de la muestra, la concentración y una absortividad molar característica de cada compuesto [108], [109].

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

donde:

A= absorbancia de la luz

ϵ = coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$)

b= longitud del camino de la luz a través de la muestra (cm)

C= concentración (M)

La espectroscopia UV-Vis es una técnica analítica popularmente usada debido a las ventajas que tiene utilizarla, por ejemplo no es una técnica destructiva, lo que permite reutilizar la muestra o continuar con su procesamiento, además se pueden realizar mediciones rápidamente; los instrumentos son fáciles de usar y los datos requieren el procesamiento mínimo por lo que requiere poca capacitación del usuario para su uso. El instrumento es generalmente económico para adquirir y operar, haciendo una técnica de análisis accesible [107].

10.1.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de la luz, también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elástica, es una técnica para medir el tamaño de las partículas en la región submicrónica. Lo hace iluminando las partículas con un láser, analizando las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada por las partículas en suspensión a lo largo del tiempo y lo correlaciona con el tamaño de estas [111–113].

Esta técnica analítica mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de las partículas en solución debido a las colisiones impulsadas térmicamente de las moléculas de disolvente con las partículas de interés [114]. El movimiento browniano de las partículas depende de su tamaño, las partículas más pequeñas son mayormente “impulsadas” por las moléculas del solvente y se mueven más rápidamente; por otro lado, cuanto más grande sea la partícula, más lento será el movimiento browniano [112]. Además del tamaño, el movimiento de las macromoléculas depende de la temperatura y viscosidad del solvente por lo tanto, es esencial conocer la temperatura precisa para las mediciones de DLS, ya que la viscosidad del solvente es dependiente de la temperatura, además esta última debe ser estable, de lo contrario, las corrientes

de convección en la muestra provocarán movimientos no aleatorios que pueden interferir en la interpretación correcta del tamaño [111], [112].

La intensidad de la luz dispersada por una suspensión de partículas variará con el tiempo a medida que las partículas en movimiento browniano salgan y entren en el espacio iluminado de análisis [111]. Cuando un haz de luz monocromático se encuentra con una solución que contiene macromoléculas, la luz se dispersa en todas las direcciones en función al tamaño y la forma de las macromoléculas. Si en una muestra se tuvieran partículas estacionarias y se iluminan con un láser, los resultados presentan un patrón moteado clásico que será estacionario tanto en tamaño como en posición de motas porque todo el sistema es estacionario; en este caso la dispersión de luz estática, la intensidad de la luz dispersada se analiza como una intensidad promediada en el tiempo [112], [115]. En la práctica, las partículas suspendidas en un líquido nunca están estacionarias. Las partículas se mueven constantemente debido al movimiento browniano y el patrón de motas también dará la impresión de moverse. A medida que las partículas se mueven, la intensidad en cualquier punto en particular parece fluctuar. La técnica de DLS mide la tasa de fluctuación de la intensidad y luego la usa para calcular el tamaño de las partículas [113].

La velocidad del movimiento browniano está definida por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión (D). La técnica DLS correlaciona la frecuencia de las fluctuaciones en la luz dispersada por una suspensión a lo largo del tiempo con el coeficiente de difusión de las partículas. El coeficiente de difusión dependerá del tamaño del núcleo de la partícula y de cualquier estructura superficial, así como de la concentración y tipos de iones del medio [111], [112]. El valor calculado de D puede transformarse en un parámetro de tamaño conocido como diámetro hidrodinámico (d_H) usando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde:

k= constante de Boltzmann

T= temperatura absoluta

D= coeficiente de difusión

η = Viscosidad de la solución

El d_H de una partícula se define como el diámetro de una esfera teórica que tiene el mismo coeficiente de difusión que la partícula bajo análisis. Por lo tanto, DLS proporciona un valor de tamaño teórico para las partículas bajo análisis inferido de la velocidad a la que se difunden [111].

De acuerdo con Malvern Instruments Ltd., 2013 [113], el sistema óptico de dispersión de luz se conforma de seis elementos principales, mostrados en la Figura 28 y mencionados a continuación:

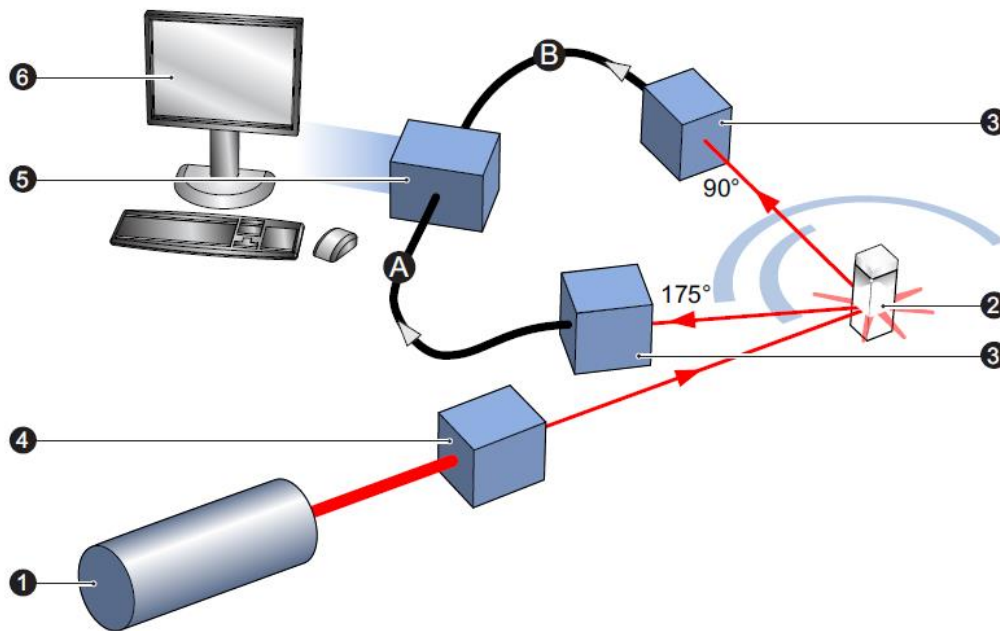


Figura 28. Componentes principales del equipo DLS. Imagen tomada de [113].

1. Láser: proporciona una fuente de luz para iluminar la muestra
2. Celda: contiene la muestra para su análisis
3. Detector: la mayor parte del láser pasa a través de la muestra, pero una parte es dispersada por las partículas dentro de la muestra en todos los ángulos. Se utiliza el detector para medir la luz dispersada.
4. Atenuador: la intensidad de la luz debe estar dentro de un rango específico para que el detector la mida adecuadamente. Si se detecta demasiada luz, el atenuador reduce la intensidad de la fuente de láser y, por lo tanto, reduce la intensidad de la dispersión, evitando que el detector se sobrecargue. Por el contrario, para muestras que no dispersan mucha luz, se debe aumentar la cantidad de luz dispersada, en este caso el atenuador se encarga de pasar más luz láser a la muestra.

5. Correlador: es una placa de procesamiento digital por la cual pasa la señal de intensidad de dispersión del detector. El correlador compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo sucesivos para derivar la velocidad a la que varía la intensidad.
6. Software: la información del correlador pasa a una computadora donde el software del equipo analiza los datos para obtener información sobre el tamaño [112], [113].

Básicamente, un correlador es un comparador de señales. Mide el grado de similitud entre dos señales, o una señal consigo misma durante intervalos de tiempo variables [112], [113]. Si la intensidad de la señal en el tiempo (t) se compara con la intensidad de un tiempo muy cercano ($t+\delta t$), habrá una fuerte relación o correlación entre las intensidades de dos señales. Si la señal en t se compara con la señal en $t+2\delta t$, aun habrá una correlación razonable entre las dos señales, pero no será tan buena como la comparación en t y $t+\delta t$, en otras palabras, la correlación se reduce con el tiempo. El periodo de tiempo suele ser muy pequeño (nanosegundos o microsegundos) y se denomina tiempo de muestra de correlacionador. Si la intensidad de la señal t se compara consigo misma, existe una correlación perfecta, ya que las señales son idénticas y se representa con la unidad (1) y la ausencia de correlación se indica con cero (0). La correlación de una señal disminuye con el tiempo ($t+2\delta t$, $t+3\delta t$, $t+4\delta t$, etc.) hasta que en algún momento $t=\infty$ donde no habrá correlación. Considerado el movimiento browniano de las partículas, si estas son grandes, la señal cambiará lentamente y la correlación persistirá durante mucho tiempo. Si las partículas son pequeñas y se mueven rápidamente, la correlación se reducirá rápidamente [112], [113].

El tamaño se obtiene a partir de la función de correlación utilizando diferentes algoritmos. Se pueden tomar mediante dos enfoques diferentes:

1. Ajustar un solo exponencial a la función de correlación para obtener el tamaño promedio y una estimación del ancho de distribución (índice de polidispersidad)
2. Ajustar un exponencial múltiple a la función de correlación para obtener la distribución de tamaños de partículas para obtener una imagen más completa de la distribución de tamaño de partículas cuando se trata una muestra con varios grupos de tamaño de partículas [112],[114]. La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de la luz dispersada por

partículas en varias clases de tamaño y por lo tanto se conoce como distribución de tamaño de intensidad.

Aunque la distribución de tamaño generada por DLS es una distribución de intensidad, esto se puede convertir en una distribución de volumen, y a su vez también se puede convertir en una distribución numérica [113]. Para explicar la diferencia entre estos tres tipos de distribuciones, representadas en la Figura 29. Malvern Instruments Ltd., 2013, [113], lo ejemplifica considerando dos poblaciones de partículas esféricas de 5 nm y 50 nm de diámetro presentes en números iguales. Si se traza una distribución numérica de estas poblaciones, se obtendrá un gráfico con dos picos de una proporción 1:1. Si esta distribución numérica se convirtiera en volumen, entonces los 2 picos cambiarán a una proporción de 1:1000 (considerando que el volumen de una esfera es igual a $4/3\pi(d/2)^3$). Si esto se convierte en una distribución de intensidad, se tendría una relación 1:1000000 entre ambos picos (ya que la intensidad de la dispersión es proporcional a d^6). En términos generales se verá que $d(\text{intensidad}) > d(\text{volumen}) > d(\text{número})$ [112], [113].

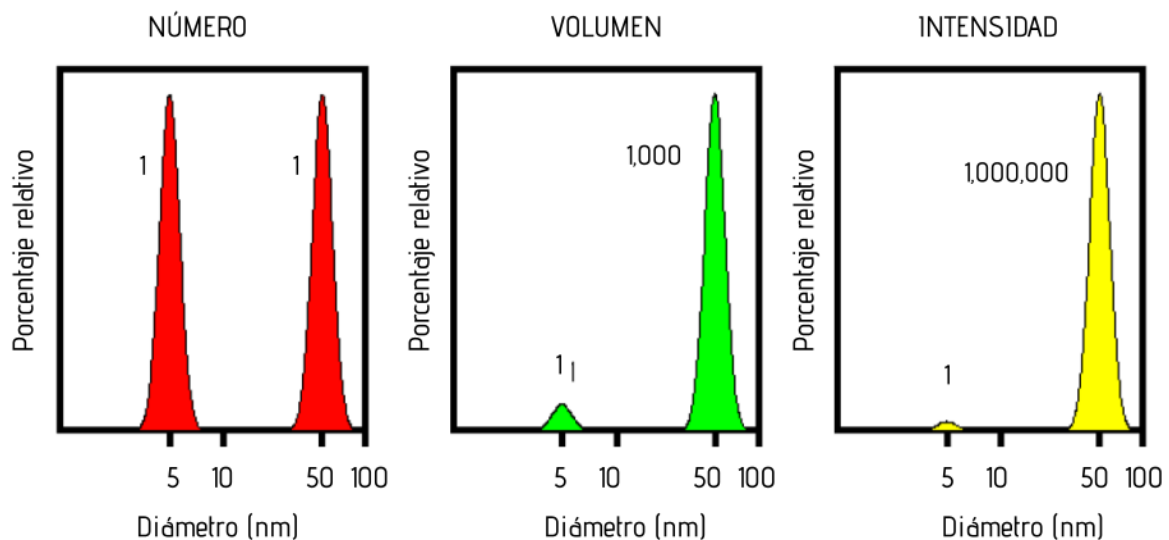


Figura 29. Distribuciones de número, volumen e intensidad en poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm en cantidades iguales. Imagen modificada obtenida de [112].