

Capítulo 5

Síntesis Verde de Nanopartículas

Cristina Garcidueñas Piña

*Departamento de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Roberto Carlos Valerio García

Mariana Georgina Muñoz Carrillo

*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Los nanomateriales (NMs) son estructuras que miden entre 1 y 100 nm en una, dos o sus tres dimensiones, conocidos estos últimos como nanopartículas (NPs). Las NPs metálicas en especial las de oro (Au), hierro (Fe), platino (Pt), cobre (Cu) y plata (Ag) tienen aplicaciones en diferentes campos como en medicina, electrónica y agricultura. Las NPs de plata (AgNPs) se utilizan ampliamente como catalizadores y antimicrobianos. Estas pueden ser sintetizadas por métodos físicos, químicos y mediante síntesis verde. Con la síntesis verde se disminuye el uso de sustancias tóxicas, ya que se realiza con ayuda de un agente biológico. Pueden obtenerse AgNPs a partir de una sal u óxido metálico mediante la reducción con extractos de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Con este proceso se obtienen

AgNPs recubiertas de compuestos provenientes del extracto biológico que les da estabilidad, sin que se generen demasiados compuestos tóxicos. Las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs determinan su capacidad de reacción y su actividad biológica, por lo que es necesario caracterizarlas. Las técnicas que comúnmente se emplean en su caracterización son microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X, espectroscopía UV-visible, dispersión de luz dinámica y electroforesis láser Doppler, que aportan información acerca del tamaño, forma, composición y carga eléctrica. Las AgNPs presentan actividad antimicrobiana debido a la acción de las propias NPs, por los iones Ag^+ liberados y por las especies reactivas de oxígeno generadas. En el laboratorio de Biología molecular de plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se sintetizaron AgNPs utilizando extracto acuoso de hojas de *Raphanus sativus* (rábano), capaces de eliminar un 99.99 % de la bacteria *E. coli* en 15 min.

Introducción

Los nanomateriales (NMs) son estructuras que miden entre 1 y 100 nm en una, dos o sus tres dimensiones, conocidas como nanohojas, nanofibras, y nanopartículas (NPs), respectivamente. Existen NMs compuestos de: metales cero-valentes, óxidos metálicos, carbono, lípidos, o combinaciones de estos componentes (nanocompuestos). Las propiedades fisicoquímicas de los NMs, como temperatura de fusión, absorción óptica y reactividad química son muy diferentes a las de los materiales de mayor tamaño con la misma composición. Los NMs son generados de forma natural en diversos procesos como en erupciones volcánicas, incendios forestales, explosiones estelares y en el metabolismo bacteriano. Sin embargo, también pueden ser producidos de manera artificial, y se ha desarrollado una ciencia que permite diseñar y producir estas estructuras, la nanotecnología. Esto ha permitido manipular su síntesis para obtener NMs con características específicas, que en la actualidad cuentan con una gran cantidad de aplicaciones.

Las NPs metálicas, en especial las de oro, hierro, platino, cobre, plata se han destacado por tener aplicaciones en diferentes áreas como la medicina, óptica, electrónica y agricultura. Las NPs de plata (AgNPs), por su estabilidad química, sus propiedades físicas, su conductividad y sus propiedades biológi-

cas, se están utilizando ampliamente como catalizadores y antimicrobianos. Actualmente se comercializan alrededor de 300 productos basados en AgNPs aprobados por la FDA de Estados Unidos, entre los que está ropa, dispositivos anticonceptivos, tubos endotraqueales y prótesis óseas. Las AgNPs tienen características ideales para que las prótesis ortopédicas y cardiovasculares estén libres de microorganismos que pudieran infectar al paciente, para los apósitos para proteger y cubrir heridas, para el recubrimiento de instrumental quirúrgico y de prótesis de tipo óseo, y para facilitar la dosificación farmacológica. También, están siendo evaluadas para inhibir la proliferación de células cancerosas, como las células MCF7 de cáncer de mama. Las AgNPs también se están utilizando en la industria textil por su acción antibacteriana, para evitar malos olores, en la fabricación de prendas deportivas y calcetines. Además, las AgNPs tienen aplicaciones en la industria alimentaria como conservadores, intensificadores de sabor o para mejorar la apariencia de los alimentos.

Síntesis de nanopartículas

Se han desarrollado diversos métodos físicos, químicos y de síntesis verde de NPs metálicas, que han permitido controlar su morfología, dimensiones, composición, estabilidad en suspensión coloidal, recubrimiento, además de su comportamiento y de sus aplicaciones.

Los métodos físicos se basan en la subdivisión mecánica del metal. A partir del material macroscópico, mediante procesos físicos como la molienda o volatilización, se reduce la agregación hasta llegar a conseguir un material nanométrico (Fig. 5.1).

Con los métodos químicos se parte de moléculas de diferentes compuestos químicos que van a generar estructuras en una escala nanométrica (Fig. 5.1). La síntesis de las NPs puede llevarse a cabo por la reducción química de una sal u óxidos metálicos, lo que genera la liberación de iones de plata que sufren un proceso de nucleación para formar las NPs. La síntesis por métodos químicos ha sido ampliamente desarrollada, sin embargo, tienen el inconveniente de que utiliza agentes químicos, como solventes y surfactantes, que afectan al medio ambiente y que pueden contribuir a la toxicidad de las NPs.

La síntesis verde es un proceso que se caracteriza principalmente en que utiliza agentes biológicos, sustituyendo compuestos usados en la síntesis química.

mica, que resultan dañinos al medio ambiente. La síntesis verde puede llevarse a cabo aprovechando el metabolismo de la planta; al desarrollarse en medio con metales, mediante un proceso de biosíntesis, genera las nanopartículas metálicas. Otro sistema de síntesis verde es a partir de una sal u óxido metálico y de un agente reductor proveniente de extractos de cáscara, tallo y hojas de plantas, bacterias, algas, hongos, levaduras y virus (Fig. 5.1). En este acaso, al igual que con los métodos químicos, se parte de átomos o moléculas para obtener estructuras nanométricas, la diferencia es que se sustituyen algunos agentes químicos por biológicos, que en general son menos tóxicos. Las NPs obtenidas mediante síntesis verde son estables, ya que se forman recubiertas de compuestos provenientes del agente biológico que evitan aglomeraciones.

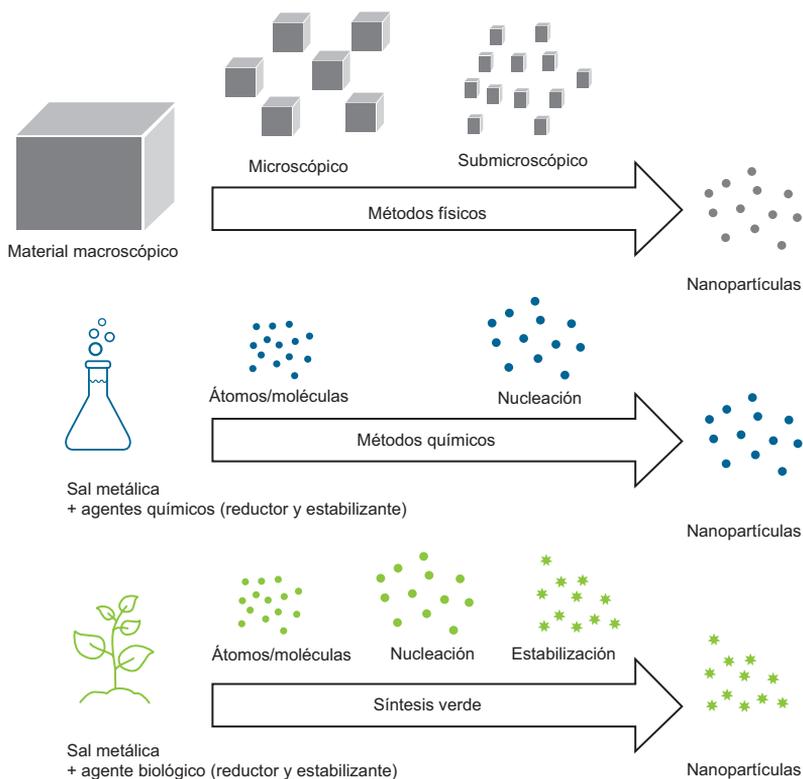


Figura 5.1. Métodos físicos, químicos y de síntesis verde para la obtención de nanopartículas.

Existen una gran cantidad de trabajos que reportan la síntesis verde de AgNPs utilizando nitrato de plata (AgNO_3) y extractos de plantas (Tabla 5.1). Tanto la concentración del AgNO_3 como la especie de planta influyen en el tamaño, solubilidad, carga superficial, forma y aglomeración de las AgNPs sintetizadas. Estas características, están relacionadas con sus propiedades biológicas, por ejemplo, entre menor sea tamaño de las NPs, es mayor la superficie de contacto con el entorno, lo que facilita su actividad biológica.

Tabla 5.1. Síntesis verde de AgNPs a partir de diferentes plantas

Material vegetal	<i>Ficus benghalensis</i>	Algarroba	Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Ajo (<i>Allium sativa</i>)
Tipo de extracto	Extracto acuoso de las hojas	Extracto acuoso de las hojas	Extracto acuoso	Extracto acuoso de las hojas	Extracto acuoso de cladidos	Extracto acuoso
Características de la síntesis	5 ml de extracto, 45 ml 10^{-3} M de AgNO_3 a 60 °C	5 ml extracto, 100 ml 1-4 mM AgNO_3 TA ³	Relación 9 :1 (4mM de AgNO_3 y extracto) a TA ³	10 ml del extracto, 90 ml de AgNO_3 1 mM a TA ³ , 40, 60, 80 °C	60 ml de H ₂ O, 4 ml de hidróxido de amonio 4 %, 8 ml de AgNO_3 10 mM, 8 ml de suspensión de extracto de nopal (0.2 g/ 8 ml)	50 ml de AgNO_3 (8.5, 10,12,17,20,24 y 85 mg), 5 ml de EAH ¹ o EAC ² , NaCl
Características de las AgNPs	Esféricas con un diámetro aproximado de 16 nm	Esféricas con un diámetro de 5-40 nm	No se reporta	Esféricas con un diámetro de 5-50 nm	Esféricas con un diámetro de 10 nm	Esféricas de aprox. 20 nm
Actividad	Actividad contra <i>E. coli</i>	Alta actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i>	Actividad antimicrobiana contra la bacteria fitopatogena <i>Phaseoli</i> pv phaseoli	Generan apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7)	No se reporta	No se reporta
Referencias	Saxena <i>et al.</i> , 2012	Awwad <i>et al.</i> , 2013	Travieso <i>et al.</i> , 2018	Venugopal <i>et al.</i> , 2017	Ledezma <i>et al.</i> , 2014	Calle y Londoño, 2014

¹EAH: extracto de ajo hervido, ²EAC: extracto de ajo cocido, ³TA: temperatura ambiente

Caracterización de las nanopartículas

Las propiedades fisicoquímicas de las NPs tales como forma, tamaño, composición química, carga superficial y estado de agregación, están directamente relacionadas con su capacidad de reacción. Para conocer estas propiedades, es necesario que las NPs sintetizadas sean caracterizadas mediante técnicas microscópicas y espectroscópicas. A continuación, se da una breve descripción de las técnicas más empleadas.

Microscopía electrónica de barrido. La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una de las técnicas que permite obtener información del tamaño y forma de las NPs. Su funcionamiento se basa en realizar un barrido con un haz de electrones sobre la muestra, posteriormente las señales generadas por la interacción del haz con la superficie de la muestra son recogidas con diferentes detectores. De tal forma que a medida que el haz de electrones realiza el barrido, se va presentando la imagen de la muestra en un monitor. Esta técnica posee una gran profundidad de campo y produce imágenes de alta resolución.

Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X. La técnica de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDRX) utiliza la radiación electromagnética característica que proviene de una muestra para identificar y cuantificar los porcentajes atómicos de los elementos presentes en ella. Consiste en bombardear el objeto con electrones primarios, que por sí mismos tienen la energía apropiada para la emisión de rayos X de la muestra bajo análisis. La espectroscopía se realiza habitualmente acoplada a un microscopio electrónico.

Espectroscopía ultravioleta visible. La espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) es una técnica muy útil y confiable para la caracterización primaria de las NPs. Las propiedades ópticas únicas de las NPs las hacen interactuar fuertemente con longitudes de ondas específicas de luz, por lo que la técnica de espectroscopía de luz UV-vis es muy sensible y selectiva para diferentes tipos de NPs. En las AgNPs, la banda de conducción y la banda de valencia se encuentran muy cercanas, por lo que los electrones se mueven libremente de una a otra. Estos electrones libres dan lugar a una banda de absorción de resonancia de plasmón superficial, que se produce debido a la oscilación colectiva de electrones de AgNPs en resonancia con la onda de luz. La absorción de las AgNPs depende de su tamaño, del medio dieléctrico y del entorno químico. La

observación de este pico, designado plasmón de superficie está bien documentada para varias NPs metálicas con tamaños que varían de 2 a 100 nm.

Dispersión de luz dinámica. Otra forma de conocer el tamaño de las partículas en suspensión es a través del diámetro hidrodinámico, el cual se mide con un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés). Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Debido a que esta capa influye en el movimiento de la partícula durante DLS, el diámetro medido de la partícula, que se conoce también como hidrodinámico, la mayoría de las veces es superior al diámetro que se mide con MEB.

Electroforesis láser Doppler. El potencial zeta es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión. Existe un potencial entre la superficie de la partícula y el líquido dispersante, que varía de acuerdo con la distancia desde la superficie de la partícula. En el plano de deslizamiento, este potencial se conoce como potencial zeta. El potencial zeta se mide utilizando una combinación de dos técnicas: electroforesis y velocimetría láser Doppler, denominada en algunos casos electroforesis láser Doppler. Este método mide la velocidad del movimiento de una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico sobre éste. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado se puede calcular el potencial zeta mediante la viscosidad y constante dieléctrica de la muestra.

Las nanopartículas como antimicrobianos

La plata ha sido utilizada por su actividad antimicrobiana desde hace mucho tiempo, aunque las AgNPs presentan una mayor actividad que la plata de mayores dimensiones debido a la relación área-volumen. Es bien conocida la actividad de estas NPs contra bacterias, hongos e incluso virus, aunque sigue en debate si la acción es producida por la AgNPs o por los iones liberados, las evidencias sugieren que el efecto es resultado de ambas acciones (Fig. 5.2).

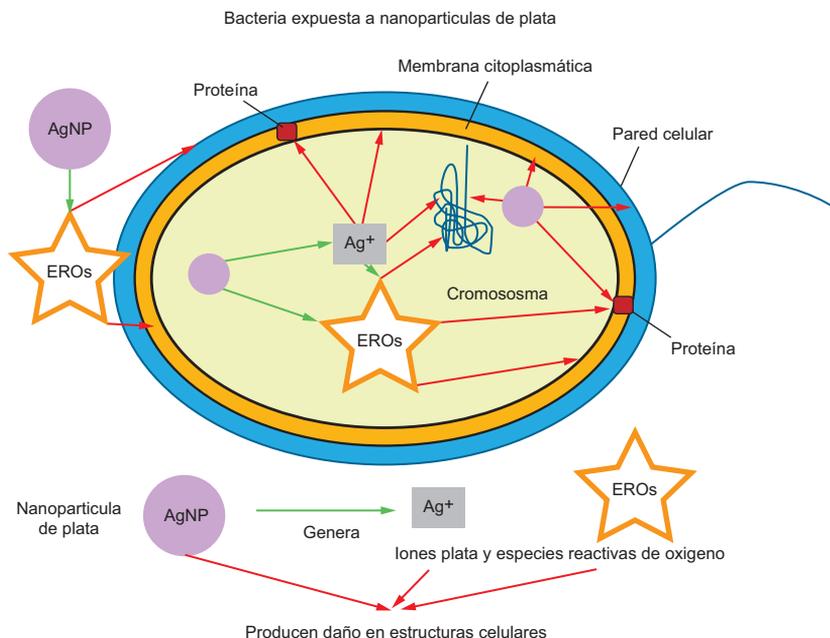


Figura 5.2. Mecanismos de acción de las AgNPs contra bacterias. Acción de las AgNPs, de los iones Ag^+ y de las especies reactivas de oxígeno en la pared celular, la membrana citoplasmática, proteínas y cromosoma (Adaptado de Eckhardt *et al.*, 2013).

En *Escherichia coli* expuesta a AgNPs se ha logrado observar la formación de poros en la pared celular y su acumulación en la membrana celular, lo que modificaría la permeabilidad, permitiendo el movimiento de moléculas al interior de la célula y la pérdida de nutrientes, provocándole la muerte. Mediante microscopía electrónica ha sido posible observar la interacción de la plata con las células bacterianas, el cambio morfológico en la pared celular y el daño en la membrana citoplasmática, siendo más evidente en bacterias Gram negativas como *E. coli*, que en Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, posiblemente por las diferencias estructurales entre ambas. El ingreso de las AgNPs a la célula puede producir daño a nivel celular, subcelular y de biomoléculas. La actividad antimicrobiana de las AgNPs es proporcional a sus dimensiones, son más activas las más pequeñas porque tienen mejor capacidad de ingreso a la célula para interactuar con diversas biomoléculas.

Como es conocido, los metales al ser oxidados químicamente en solución acuosa liberan iones metálicos, y de igual manera las AgNPs también son el origen de iones Ag^+ . Las AgNPs de menores dimensiones liberan una mayor cantidad de iones en condiciones aeróbicas. Los iones Ag^+ pueden interactuar con los iones negativos de azufre, fósforo o nitrógeno, constituyentes de componentes celulares, afectando la funcionalidad de la pared celular bacteriana, interfiriendo con la cadena respiratoria bacteriana o afectando la capacidad de replicación del ADN. Mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión se ha detectado la interacción de iones Ag^+ con el ADN de bacterias, también se ha identificado que estos iones tienen preferencia por las bases guanina y adenina, y mediante resonancia magnética nuclear se ha apreciado la distorsión de la doble hélice, lo que puede ocasionar una pérdida en la capacidad de replicación. Los iones Ag^+ tienen afinidad por la cisteína de las proteínas, y son capaces de desplazar iones esenciales en el funcionamiento de las enzimas, como al ion de cobre (Cu^+), inactivándolas. Esto fue observado con la enzima nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa de *E. coli*, que participa en la cadena respiratoria bacteriana, y cuya interacción con Ag^+ provocó la muerte celular.

Además, las AgNPs pueden interactuar con las enzimas que participan en la cadena respiratoria generando especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo o superóxido que producen estrés oxidativo, oxidación de lípidos, daño a proteínas, inhibición de la producción de ATP y de la replicación del ADN. Por su parte, los iones Ag^+ también participan en la generación de EROs. El estrés oxidativo en las células es mayor en condiciones aeróbicas que en anaeróbicas debido a la cantidad de radical superóxido que se genera, que es el que presenta una mayor actividad antimicrobiana.

Lo que es un hecho, es que a diferencia de los antibióticos que actúan de manera específica en algún receptor, los iones Ag^+ y las AgNPs afectan a la bacteria en diversos aspectos de su metabolismo y de su estructura al mismo tiempo y de manera inespecífica. El uso de plata como antimicrobiano fue abandonado con el descubrimiento de los antibióticos, pero con la aparición de bacterias resistentes, las AgNPs son una alternativa real en el tratamiento de infecciones, porque es más difícil que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia contra éstas. Sin embargo, se han encontrado bacterias capaces

de sobrevivir a concentraciones elevadas de plata, por adquisición de plásmidos de resistencia, aunque no se ha esclarecido los mecanismos.

Muchas de las AgNPs sintetizadas por estos procedimientos han sido evaluadas por su capacidad antimicrobiana. La mayoría de los reportes involucran bacterias patógenas de interés clínico como *E. coli*, que puede provocar trastornos gastrointestinales; *S. aureus*, que puede ocasionar infecciones en la piel, huesos, neumonía y endocarditis; *Streptococcus pneumoniae*, relacionada con neumonía, sinusitis y peritonitis; *Salmonella typhi*, asociada a la fiebre tifoidea; *Vibrio cholerae*, que provoca cólera. Además de otras como *Pseudomonas aeruginosa*, que es un patógeno oportunista en humanos, y *Bacillus subtilis* utilizado como organismo modelo en diversos estudios.

Los protocolos empleados en este análisis son mediante difusión o dilución. El técnica de difusión a partir de discos es muy recurrente en el análisis antimicrobiano. En este procedimiento se colocan discos de papel filtro impregnado de las AgNPs en la superficie de medio sólido en caja Petri previamente inoculado con la bacteria. Se espera que las AgNPs difundan radialmente a partir del disco, y que el crecimiento de la bacteria se vea inhibido alrededor del disco. Dependiendo del diámetro de los halos de inhibición, se puede conocer la actividad de las AgNPs contra esa bacteria y la resistencia o sensibilidad de las bacterias. Esta técnica permite la evaluación de diferentes concentraciones de AgNPs de una manera fácil, económica y rápida. Por ejemplo, las AgNPs sintetizadas a partir de extractos de semillas de fenogreco, una leguminosa de la India, utilizando dos variantes del proceso, agitación o sonicación fueron analizadas mediante el protocolo de difusión en agar. En ese experimento se demostró una mayor actividad de AgNPs sintetizadas por sonicación contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus* que las sintetizadas por agitación.

En otro tipo de análisis antimicrobiano, se calcula la inactivación de los microorganismos producida por las NPs. El procedimiento consiste en adicionar las AgNPs a una suspensión microbiana de concentración conocida, generalmente entre 10^4 y 10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Después de un tiempo de exposición las bacterias se inoculan en medio sólido, y mediante conteo de colonias, se calculan las UFC/ml sobrevivientes al tratamiento. La inactivación se expresa como $\log(N_0/N)$, o unidades logarítmicas, donde N y N_0 son las UFC/ml de la bacteria sobrevivientes e iniciales, respectivamente. Esta técnica permite la obtención de resultados muy

precisos que suelen ser más aceptables, y ha sido utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de diversas NPs.

Protocolos

Síntesis verde de AgNPs utilizando extracto acuoso de hojas de plantas

1. Licuar 50 g de hojas limpias con 250 ml de agua destilada estéril. Por ejemplo, pueden usarse hojas de rábano que, tomando las iniciales de su nombre científico, *Raphanus sativus*, las NPs sintetizadas se han denominado *RsAgNPs*.
2. Calentar en baño María durante 1 h, dejar enfriar a TA de 2 a 12 h.
3. Eliminar los residuos sólidos por sedimentación, centrifugación y filtración con papel cualitativo Whatman # 1.
4. Mezclar 10 ml del extracto filtrado con 90 ml de una solución de 2 mM AgNO_3 .
5. Incubar a TA protegido de la luz con agitación constante hasta observar cambio de coloración indicativo de la síntesis de AgNPs. En el caso de las *RsAgNPs* torna de amarillo a rojizo marrón (Fig. 5.3).

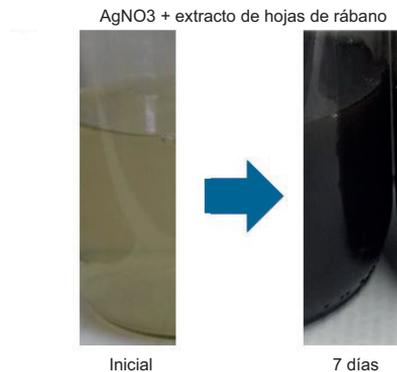


Figura 5.3. Reacción de síntesis de AgNPs a partir de AgNO_3 y extracto acuoso de hojas de rábano. Cambio de coloración característico de la formación de AgNPs.

- Tomar una alícuota de la mezcla de reacción y leer en el espectrofotómetro UV-vis haciendo un barrido de absorbancias de 300 a 800 nm. Comprobar la formación de AgNPs con el plasmón característico y el pico máximo de absorción en el rango entre 400 y 450 nm. En el caso de las RsAgNPs la máxima absorbancia resulta a los 425 nm (Fig. 5.4).

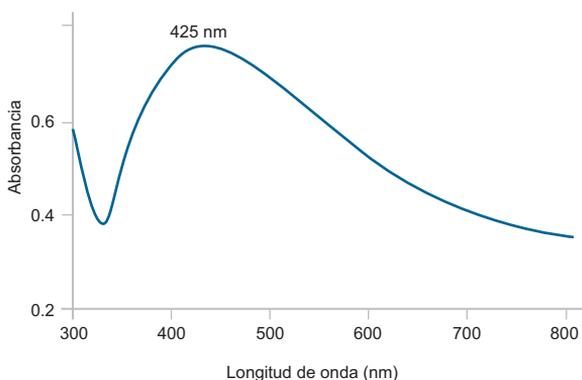


Figura 5.4. Plasmón característico de la formación de AgNPs. Espectro de absorbancia UV-vis de las AgNPs sintetizadas con extracto de hojas de rábano, con un pico de máxima absorbancia a 425 nm.

- Centrifugar la suspensión, eliminar el sobrenadante por decantación.
- Lavar el precipitado tres veces con agua destilada estéril y una vez con etanol al 96 % para eliminar cualquier residuo de la reacción.
- Secar las RsAgNPs a 37 °C por 24 h, dispersar por sonicación.

Caracterización de las AgNPs producidas:

- Análisis por MEB para observar la forma. Las fotografías de MEB pueden ser empleadas en la determinación del tamaño con ayuda del programa Image J2. El análisis por MEB de las RsAgNPs mostró que son esféricas y tienen un tamaño promedio de 82 nm (Fig. 5.5).
Estudio de EDRX para determinar la composición de elementos. Las AgNPs sintetizadas con extractos vegetales no sólo están constituidas por plata, sino que además están conformadas por componentes provenientes del extracto vegetal. El análisis de EDRX de las RsAgNPs mostró que

están conformadas principalmente por Ag (54.1 %), además de otros elementos que provienen del extracto vegetal, entre los que destacan carbono (16.35 %), cloro (14.13 %) y oxígeno (5.97 %) (Fig. 5.6).

2. Análisis mediante DLS para determinar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas. El valor del diámetro calculado mediante esta técnica generalmente es mayor que el determinado por microscopía electrónica, ya que se realiza en un medio líquido donde se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Por ejemplo, en las *RsAgNPs* se calculó un diámetro hidrodinámico de 118.8 nm en agua destilada, valor mayor que el calculado por MEB, de 80.32 nm (Fig. 5.5).
3. Estudio de electroforesis láser Doppler para determinar el potencial zeta, que indica la carga eléctrica de las *AgNPs*, la magnitud de la repulsión o atracción electrostática que existe entre estas, y su estabilidad. Por ejemplo, en las *RsAgNPs* se encontró un potencial zeta de -32.3 mV, donde el valor negativo indica una carga eléctrica superficial estable. Esta estabilidad es proporcionada por la materia orgánica proveniente del extracto vegetal y que recubre a las *AgNPs*.

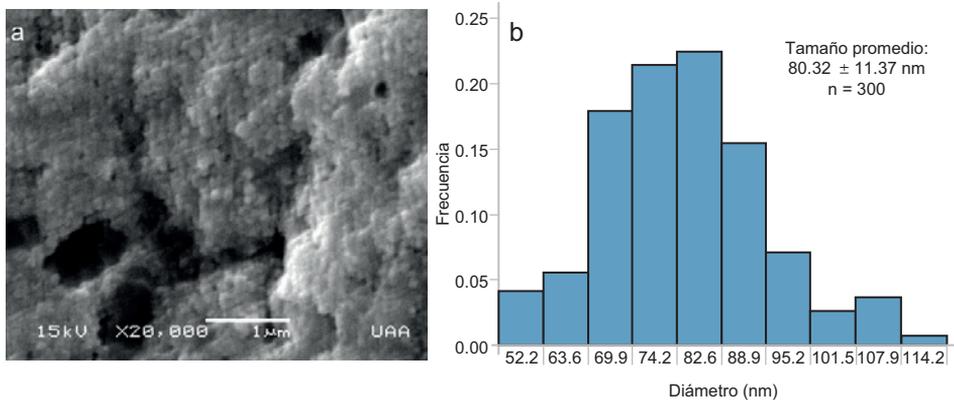


Figura 5.5. Nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de hojas de rábano. (a) Mediante microscopía electrónica de barrido se observan las *AgNPs* de forma esférica. (b) El histograma muestra la distribución de tamaño de la *AgNPs* medidas con ayuda del programa Image J2, con el que se calculó un diámetro promedio de 80.32 ± 11.37 nm.

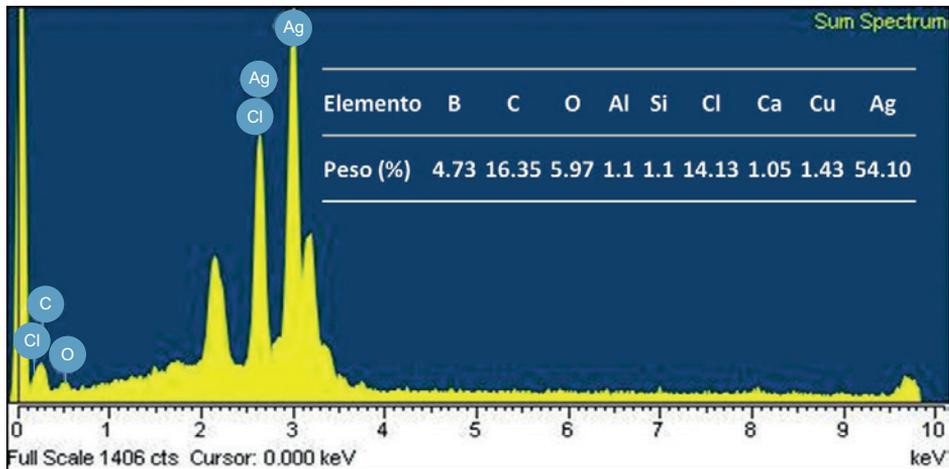


Figura 5.6. Análisis EDRX de AgNPs sintetizadas con extracto de hojas de rábano. Las RsAg-NPs están conformadas principalmente por plata, además de otros elementos que provienen del extracto vegetal, entre los que destacan carbono (C), cloro (Cl) y oxígeno (O).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de AgNPs

1. Cultivar en medio de cultivo líquido una colonia aislada de *E. coli* a 37 °C durante toda la noche.
2. Hacer diluciones seriadas del cultivo en buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7 estéril.
3. Sembrar cada una de las diluciones en medio sólido. Incubar durante toda la noche.
4. Contabilizar las colonias desarrolladas para calcular las UFC/ml.
5. Preparar una suspensión bacteriana con 1×10^6 UFC/ml en buffer de fosfatos en dos tubos con 1 ml cada uno.
6. Adicionar a un tubo, la suspensión AgNPs a una concentración de 0.1 mg/ml. El otro será el control negativo por lo que no se le adiciona nada.
7. Incubar a TA e inocular una alícuota de cada suspensión en medio sólido después de 15, 30 y 60 min de exposición.
8. Incubar a 37 °C por toda la noche.
9. Contar colonias y calcular las UFC/ml después de la exposición.

10. Calcular la inactivación logarítmica expresada en unidades logarítmica (U log) con la fórmula:

$$U \log = \log (N_0/N)$$

Donde N_0 y N son las UFC/ml de la bacteria iniciales y sobrevivientes, respectivamente.

En la valoración de la actividad antimicrobiana de *RsAgNPs* se observó una inactivación logarítmica de 4.3, 4.8 y 5.9 U log a los tiempos de 15, 30 y 60 min, respectivamente (Fig. 5.7). Estos datos demuestran que las *RsAgNPs*, pueden eliminar las bacterias de *E. coli* en un 99.99 % en 15 min, en un 99.999 % en 30 min y en un 99.9999% en 60 min.

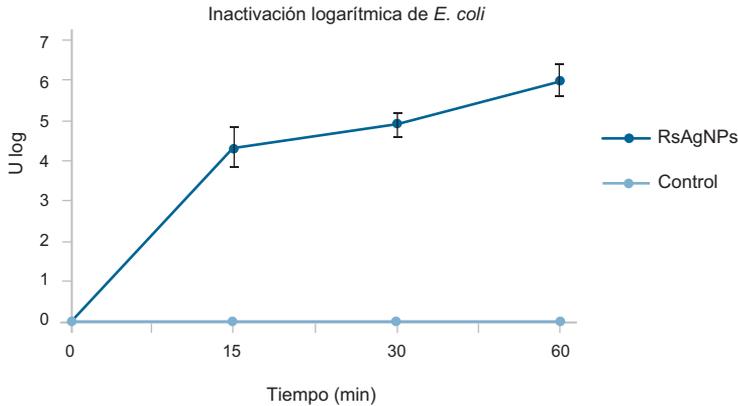


Figura 5.7. Actividad antibacteriana de las *RsAgNPs*. Cultivos bacterianos de *E. coli* fueron expuestos a 0.1 mg/ml de *AgNPs* sintetizadas con extracto de hojas de rábano durante 15, 30 y 60 min. Para determinar la inactivación logarítmica se contabilizó el número de unidades formadoras al inicio y después del tratamiento.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico, material genético y hereditario.

Ag^+ : iones de plata

$AgNO_3$: nitrato de plata

AgNPs: nanopartículas de plata

ATP: adenosín trifosfato o trifosfato de adenosina, nucleótido fundamental en la obtención de energía celular.

Cu⁺: iones de cobre

DLS: dispersión de luz dinámica

EDRX: espectroscopía de dispersión de energía de rayos X

EROs: especies reactivas de oxígeno

FDA: Siglas en inglés de *Food and Drug Administration*, que significa Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

g: gramos

h: hora

Log: logaritmo base 10

M: molar

MEB: microscopía electrónica de barrido

mg/l: miligramos por litro

ml: mililitros

mM: milimolar

nm: nanómetros

NMs: nanomateriales

NPs: nanopartículas

RsAgNPs: nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de hojas de rábano (*Raphanus sativus*).

TA: temperatura ambiente

UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro

U log: unidades logarítmicas

UV-vis: ultravioleta-visible

Glosario

Antimicrobiano. Sustancia química que tiene actividad contra microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su proliferación.

Antibacteriano. Sustancia que tiene actividad contra bacterias, matando o inhibiendo su proliferación.

Catalizador. Sustancia que aumentar la velocidad de una reacción sin ser consumida en el proceso.

Células MCF7. Línea celular aislada de un paciente con cáncer de mama, que es utilizada en investigación científica de esta enfermedad.

Escherichia coli (*E. coli*). Bacteria gramnegativa que coloniza el tracto gastrointestinal haciendo simbiosis con el organismo. Existen algunas cepas de esta bacteria que son patógenas y otras que son utilizadas en protocolos de investigación.

Fúngico. Relacionado con hongos.

Nucleación. Formación de cuerpos sólidos muy pequeños dentro de una fase líquida.

Inactivación logarítmica. Representación matemática de la capacidad de acción de una sustancia contra un microorganismo.

Bibliografía

- Abiola Grace Femi-Adepoju, Adewumi Oluwasogo Dadab, Kabir Opeyemi Otunc, Adeyinka Olufemi Adepojud & Ojo Paul Fatobae. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using terrestrial fern (*Gleichenia Pectinata* (Willd.) C. Presl.): characterization and antimicrobial studies. *Heliyon* 5 (2019) e01543. <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019. e01543>
- Awwad, A. M., Salem, N. M. & Abdeen, A. O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1186/2228-5547-4-29>.
- Chellaram, C., Murugaboopathi, G., John, A. A., Sivakumar, R., Ganesan, S., Krithika, S. & Priya, G. (2014). Significance of nanotechnology in food industry. *APCBEE procedia*, 8, 109-113. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.010>.
- Deshmukh, A. R., Gupta, A. & Kim, B. S. (2019). Ultrasound Assisted Green Synthesis of Silver and Iron Oxide Nanoparticles Using Fenugreek Seed Extract and Their Enhanced Antibacterial and Antioxidant Activities. *Hindawi BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2019/1714358>.
- Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B. & Fromm, K.M. (2013). Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and

- its uses in medicine. *Chem Rev*, 113(7), 4708-54. <http://doi.org/10.1021/cr300288v>.
- El Badawy, A., Silva, R., Morris, B., Scheckel, K., Suidan, M. & Tolaymat, T. (2011). Surfacecharge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ Sci Technol*, 4, 283-287. <http://doi.org/10.1021/es1034188>.
- Erdogan, O., Abbak, M., Demirbolat, G.M., BirtekocakI, F., Aksell, M., Passal, S. & CevikI, O. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: The characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells. *PLoS ONE*, 14(6), e0216496. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0216496>.
- Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I.E., Guzmán, P., Rico-Martínez, R., Morales-Domínguez, J.F. & Rubio-Franchini, I. (2016). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Nanostructured Materials of Titanium Dioxide Doped with Silver and/or Copper and Their Effects on *Arabidopsis thaliana*. *Hindawi Publishing CorporationInternational Journal of Photoenergy*, 2016, 8060847. <http://doi.org/10.1155/2016/8060847>
- Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L. & Michael, J.R. (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Springer Third edition XIX, 689.
- Gurunathan, S., Park, J. H., Han, J. W., & Kim, J. H. (2015). Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 10, 4203. <http://doi.org/10.2147/IJN.S83953>. PMID: 26170659; PMCID: PMC4494182.
- Iravani, S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 10, 2638. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>.
- Lee, K.X., Shameli, K., Mohamad, S.E., Yew, Y.P., Mohamed Isa, E.D., Yap, H.Y., Lim, W.L. & Teow, S.Y. (2019). Bio-Mediated Synthesis and Characterisation of Silver Nanocarrier, and Its Potent Anticancer Action. *Nanomaterials* (Basel), 9(10). <http://doi.org/10.3390/nano9101423>
- Liao, C., Li, Y. & Tjong, S.C. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 449. <http://doi.org/10.3390/ijms20020449>.
- Mariadoss, A.V.A., Ramachandran, V., Shalini, V., Agilan, B., Franklin, J.H., Sanjay, K., Alaa, Y.G., Tawfiq, M.A. & Ernest, D. (2019). Green synthesis,

- characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by *Malus domestica* and its cytotoxic effect on (MCF-7) cell line. *Microb Pathog*, 135,103609. <http://doi.org/10.1016/j.micpath>.
- Maurer-Jones, M.A., Lin, Y.S. & Haynes, C.L. (2010). Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano*, 4, 3363-3373. <http://doi.org/10.1021/nn9018834>.
- Mohanta, Y.K., Panda, S.K., Biswas, K., Tamang, A., Bandyopadhyay, J., De, D., *et al.* (2016). Biogenic synthesis of silver nanoparticles from *Cassia fistul* (Linn.): *in vitro* assessment of their antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. *IET Nanobiotechnol*, 10, 438-444. <http://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0104>.
- Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P.R., Kumari, M. & Nayak, B. (2016). Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Mater. Sci. Eng. C*, 58, 44-52. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.022>.
- Paladini, F., Pollini, M. (2019). Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application: Progress and Future Trends. *Materials* (Basel), 9, 12(16). <http://doi.org/10.3390/ma12162540>.
- Salari, S., Esmailzadeh Bahabadi, S., Samzadeh-Kermani, A. & Yosefzaei, F. (2019). *In vitro* Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Prosopis farcta* Fruit Extract. *Iran J Pharm Res*, 18(1), 430-455. PMID: 31089378; PMCID: PMC6487442.
- Saxena, A., Tripathi, R. M., Zafar, F. & Singh, P. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. *Materials letters*, 67(1), 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.09.038>.
- Siddiqi, K.S., Rashid, M., Rahman, A., Tajuddin, Husen, A. & Rehman, S. (2018). Biogenic fabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous-ethanolic extract of lichen (*Usnea longissima*) and their antimicrobial activity. *Biomater Res*, 21, 22:23. <http://doi.org/10.1186/s40824-018-0135-9>.
- Syafiuddin, A., Salmiati, Hidibarata, T., Hong Kueh, A. B. & Salim, M. R. (2018). Novel weed-extracted silver nanoparticles and their antibacterial appraisal against a rare bacterium from river sewage treatment plan. *Nanomaterials*, 8(9), 1-17. <http://doi.org/10.3390/nano8010009>.

- Taleb, A.; Petit, C. & Pileni, M.P. (1998). Optical properties of self-assembled 2D and 3D superlattices of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem*, 102, 2214–2220. <https://doi.org/10.1021/jp972807s>.
- Ullah Khan, S., Saleh, T.A., Wahab, A., Khan, M.H.U., Khan, D., Ullah Khan, W., Rahim, A., Kamal, S., Ullah Khan, F. & Fahad, S. (2018). Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int J Nanomedicine*, 13, 733-762. <http://doi.org/10.2147/IJN.S153167>.
- Venugopal, K., Rather, H.A., Rajagopal, K., Shanthi, M.P., Sheriff, K., Illiyas, M. & Maaza, M. (2017). Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167, 282-289. <http://doi.org/10.1016/j.jphoto-biol.2016.12.013>.
- Zetasizer Manual. (2004). Nano Series User MAN0317 Issue 1.1
- Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen, W. & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 17, 1534. <http://doi.org/10.3390/ijms17091534>.