



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

Estudio del mecanismo de citotoxicidad en levaduras como modelo eucariota de nanopartículas y nanoensambles (Ag), sintetizados por medio de *Sedum praealtum*”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales

PRESENTA:

M.C. José Luis Landeros Páramo

DIRECTOR DE TESIS

DR. Gerardo Antonio Rosas Trejo

CODIRECTOR DE TESIS

DR. Francisco Alfredo Saavedra Molina

Morelia, Michoacán, Marzo 2023.

DEDICATORIA

A Dios, porque me ha mantenido en pie y me ha permitido llegar hasta aquí otorgándome, sabiduría, entendimiento y constancia. A pesar de todas las dificultades y momentos difíciles vividos me ha permitido llegar hasta aquí. ¡Gracias!

A mis padres, hermanos y sobrinos, que con su inmenso e incondicional apoyo, me estuvieron acompañando y alentando en mis decisiones durante este viaje creyendo en mí. Aunque no me podrá ver lograr esta meta, mi madre espero que donde sea que esté, sepa que este logro también es de ella. ¡Gracias!

A mi pareja Elizabeth que me ha acompañado en este último trayecto, apoyándome, impulsándome y no dejándome caer, alentándome en cada reto y dificultad para seguir adelante. ¡Vamos pa´ arriba!

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente al Dr. Gerardo A. Rosas Trejo, por todo el apoyo y confianza brindada durante mi formación académica. Por ser un excelente asesor y brindarme de sus conocimientos, consejos y experiencia. Además, de su paciencia y dedicación, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos.

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina, por su co-asesoría en la que brindó todo su apoyo, confianza, correcciones, consejos y guía, excelente disposición y aporte sustancial al desarrollo de este trabajo y a mi formación académica.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Diana Fabiola Cholico, Dr. Ariosto Medina, Dr. Daniel Bahena, Dr. Mario Gómez Hurtado y Dr. Alejandro Verduzco, por todos sus consejos, observaciones y apoyo valioso para este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, por el acceso a sus instalaciones y equipo necesarios para llevar a cabo las actividades de investigación y formación académica.

A la Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, principalmente a la Dra. Yvain de los A. Salinas y al Mtro. Luis A. Bretado, por todo su apoyo en el uso de las instalaciones, equipo y materiales para el desarrollo de la estancia de investigación.

Al CONACYT por el apoyo otorgado para la culminación en tiempo y forma de la presente investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Objetivo general.....	3
1.3 Objetivos particulares	3
1.4 Justificación	4
1.5 Hipótesis	5
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Nanociencia y nanotecnología	7
2.2 Nanomateriales	7
2.3 Clasificación de nanomateriales	8
2.3.1 Dimensionalidad.....	8
2.4 Nanopartículas y autoensambles.....	8
2.4.1 Nanopartículas.....	8
2.4.2 Autoensambles de Ag.....	10
2.5 Métodos de síntesis de nanomateriales.....	12
2.5.1 Síntesis por reducción química verde.....	12
2.6 Mecanismo de nucleación y crecimiento.....	13
2.6.1 Nucleación.....	14
2.6.2 Crecimiento	16
2.7 Planta	18
2.7.1 Características de la planta <i>Sedum praealtum</i>	18
2.8 Levadura	19

2.9	Antecedentes	20
2.9.1	Síntesis de AgNEs	20
2.9.2	Actividad catalítica en colorantes de AgNEs y AgNPs.....	28
2.9.3	Actividad antibacterial de AgNEs y AgNPs	32
2.9.4	Actividad citotóxica de AgNEs y AgNPs.....	34
3	METODOLOGÍA	37
3.1	Preparación de extracto acuoso y análisis de <i>S. praealtum</i>	38
3.1.1	Adquisición de la planta	38
3.1.2	Preparación de extracto acuoso de <i>S. praealtum</i>	39
3.1.3	Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu	39
3.1.4	Cuantificación de flavonoides totales.....	40
3.1.5	Análisis proximal y fitoquímico de <i>S. praealtum</i>	40
3.1.6	Actividad quelante de extracto de <i>S. praealtum</i> mediante iones ferrosos	42
3.2	Preparación de sal precursora	42
3.3	Síntesis de AgNPs y AgNEs	43
3.3.1	Síntesis de AgNPs	43
3.3.2	Síntesis de AgNEs	43
3.4	Caracterización	44
3.4.1	Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-Vis)	44
3.4.2	Microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (MET)	44
3.4.3	Difracción de Rayos X (DRX)	45
3.4.4	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	45
3.4.5	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (¹ H-RMN)	45
3.5	Evaluación de propiedades de las nanoestructuras de plata.....	45
3.5.1	Antibacterial	45
3.5.2	Propiedad catalítica en la degradación de colorantes	46
3.5.3	Actividad biológica y citotoxicidad.....	47
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1	Análisis fitoquímicos del extracto y la planta <i>S. praealtum</i>	50
4.1.1	Análisis proximal.....	50
4.1.2	Análisis fitoquímicos.....	51

4.2	Síntesis de AgNEs mediante el extracto acuoso de <i>Sedum praealtum</i>	52
4.2.1	Evidencia en el cambio de color.....	52
4.2.2	Efecto de la concentración del extracto <i>Sedum praealtum</i>	53
4.2.3	Efecto de la concentración de la sal precursora (AgNO_3).....	56
4.2.4	Efecto de la temperatura y la agitación sobre la síntesis de AgNEs.....	59
4.3	Síntesis de AgNPs.....	65
4.4	Análisis de reducción y crecimiento y mecanismo de formación de AgNEs	68
4.5	Evaluación de las propiedades de los AgNEs y AgNPs	77
4.5.1	Actividad catalítica	77
4.5.2	Actividad antibacterial.....	84
4.5.3	Citotoxicidad en levaduras como modelo eucariota.....	88
5	CONCLUSIONES	95
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
7	ANEXOS.....	120
7.1.	Anexo 1	120
7.2	Anexo 2	120
7.3	Anexo 3	121
7.4	Anexo 4	121
7.5	Anexo 5	122
8	PRODUCTOS OBTENIDOS	123
	Artículos indexados	123
	Proceedings.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Métodos Bottom up de síntesis de nanomateriales que pertenecen de acuerdo a Srivastaba y col.	12
Figura 2.2	Clasificación del fenómeno de nucleación.	15
Figura 2.3	Representación de las $\Delta\mu_v$, $\Delta\mu_s$ y ΔG energías libres volumétricas, de superficies y totales en función del radio del núcleo.	16
Figura 2.4	Micrografías de microscopía de barrido mostrando que están formadas por subunidades manométricas.	21
Figura 2.5	Diagrama esquemático para el proceso de formación de plata jerárquica con diferentes microestructuras.	21
Figura 2.6	Imágenes de SEM de diferentes muestras (a). y el efecto de la variación de la sal de $[\text{AgNO}_3] = 1.45 \text{ mol/L}$, (b) $[\text{AgNO}_3] = 1.55 \text{ mol/L}$, (c) $[\text{AgNO}_3] = 1.65 \text{ mol/L}$, (d) $[\text{AgNO}_3] = 1.75 \text{ mol/L}$ (b).	22
Figura 2.7	Imágenes SEM de estructuras Ag preparadas por la asistencia de cada aminoácido diferente.	24
Figura 2.8	Micrografías electrónicas de barrido de nanoestructuras de plata de tipo flor. Variando las concentraciones de AgNO_3 2–8 μM (A–C), dextrosa 3–9 mM (D–F); NaOH 0,1–0,5 mM (G–I).	25
Figura 2.9	Micrografías de nanoflores de Ag obtenidas con medios de lavado con tolueno (a-b) y DMSO (a-d).	26
Figura 2.10	Análisis morfológico de AgNPs (a), histograma (b) y partículas de tipo flor obtenidas después de lavado con etanol (c-d).	26
Figura 2.11	Partículas esféricas de Ag, obtenidas a diferentes aumentos para relaciones de volumétrica sal precursora-extracto 10:1 (a–c) y 12:1 (d–f).	27
Figura 2.12	Micrografías electrónicas de barrido obtenidas con diferentes amplificaciones de nanoflores de Ag (a–c) y dendritas de Ag (d–f).	27
Figura 2.13	(a) Espectros UV-Vis de la degradación fotocatalítica del azul de metileno en presencia de nanoflores de Ag con diferentes disolventes: agua (nanopartículas), DMSO y tolueno y (b) su cinética de degradación.	29
Figura 2.14	Espectros UV-visible de degradación del tinte de las nanoestructuras obtenidas bajo dos proporciones volumétricas, la primera (10:1); (a) RhB, (b) MO y (c) MB. el segundo (12:1); (d) RhB, (d) MO y (f) MB.	29
Figura 2.15	Espectros UV-visible de degradación sobre azul de metileno usando AgNPs (a), y gráfico que muestra la reusabilidad de las AgNPs hasta el 4to ciclo.	30

Figura 2.16	Espectros UV-Vis de reducción de azul de metileno en presencia de sólo NaBH ₄ y (B), espectros UV-Vis de reducción de azul de metileno en presencia de AgNPs con NaBH ₄ .	31
Figura 2.17	Rendimiento de reutilización de AgNPs después de la reducción de colorantes.	31
Figura 2.18	Ensayos antibacterial de Ag nanoflores contra <i>E. coli</i> (a). <i>S. aureus</i> (b). Y dendritas contra <i>E. coli</i> (c) y <i>S. aureus</i> .	33
Figura 2.19	Antibiograma de las nanoflores de Ag (a) contra (a-b) <i>S. aureus</i> , (c) MIC, (d-e) y <i>E. Coli</i> , (f) MIC y gráfico de las zonas de inhibición en función de la concentración.	33
Figura 2.20	Placas representativas del ensayo de difusión en disco de AgNPs en forma de nanoestructuras con una concentración de 0.5–4 mg/mL contra (a) <i>E. coli</i> y (b) <i>S. aureus</i> .	34
Figura 2.21	Curvas de viabilidad celular dosis-respuesta de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 expuesta a AgNPs de 10 y 80 nm recubiertas con citrato y AgNO ₃ (A) y AgNPs de 10 y 80 nm recubiertos con polietilenimina (B).	35
Figura 2.22	Concentración de absorción de AgNPs contra concentración de dosificación Ag Ag/célula en la evaluación de diferentes tamaños de AgNPs.	35
Figura 2.23	Gráficos de barras que muestran los ensayos de crecimientos para las cepas de <i>S. cerevisiae</i> (a-b) y <i>K. marxianus</i> (c-d) expuestas a AgNPs sintetizadas por extracto de <i>Lavandula angustifolia</i> .	36
Figura 3.1	Procedimiento general a seguir en el proyecto de investigación.	38
Figura 4.1	Pruebas cualitativa para la identificación de fitoconstituyentes de la planta y extracto de <i>S. praealtum</i> .	52
Figura 4.2	Extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> (a) y cambio de coloración de acuerdo a la evolución reacciones de síntesis de AgNEs utilizando <i>S. praealtum</i> (b-d).	53
Figura 4.3	Espectros UV-Vis de las variación de la concentración del extracto <i>S. praealtum</i> .	53
Figura 4.4	Micrografías (MEB) de AgNEs obtenidos a diferentes concentraciones de extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> : a) 0.625, b) 1.25, c) 2.5, d) 5, e) 10 mg/mL.	54
Figura 4.5	Análisis químico elemental EDS de los AgNEs.	55
Figura 4.6	Patrón de difracción de DRX de la muestra a 10 mg/mL de extracto y 10 mM de AgNO ₃ .	55
Figura 4.7	Espectros UV-Vis de la variación de concentración de AgNO ₃ .	56
Figura 4.8	Micrografías (MEB) de AgNEs obtenidos a diferentes concentraciones de AgNO ₃ : a) 5 mM, b) 10 mM y c) 15 mM.	58
Figura 4.9	Patrones de difracción XRD de AgNPs y AgNEs.	59

Figura 4.10	Espectros UV-Vis de AgNEs sintetizados usando extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> bajo diferentes valores de temperatura: ambiente (22 °), 60 °C y 80 °C.	59
Figura 4.11	Micrografías SEM a diferentes aumentos de los AgNEs a temperatura ambiente (a-c), 60 °C (d-f) y 80 °C (g-i).	60
Figura 4.12	Micrografías MEB mediante la técnica LABE de AgNEs sintetizadas a temperatura ambiente (a-b), a 60 °C (c-d) y 80 °C (e-f).	61
Figura 4.13	Imágenes de mapeo químico y EDS de AgNEs sintetizadas a temperatura ambiente (a-c), a 60 °C (d-f) y 80 °C (g-i).	63
Figura 4.14	Curvas cinéticas de la producción de AgNPs construida a partir de la absorbancia del RPS de Ag (a), y cambio de pH (b).	63
Figura 4.15	Espectros UV-Vis de AgNEs sintetizadas usando extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> para ver el efecto de la agitación.	64
Figura 4.16	Micrografías MEB de AgNEs a diferentes amplificaciones, control sin agitación (a-c) y bajo agitación magnética (c-e).	65
Figura 4.17	AgNPs sintetizadas utilizando extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> un espectro UV-Vis y un patrón de difracción DRX.	66
Figura 4.18	Micrografías MET de los AgNPs: (a-b) micrografías de campo claro, (c-d) micrografías HRTEM con su rápida transformada de Fourier.	67
Figura 4.19	Espectro UV-Vis de las muestras después de una hora de reacción a diferentes temperaturas y lavado exhaustivo (a), e imágenes MEB de AgNPs a 22 °C (b), 60 °C (c) y 80 °C(d).	68
Figura 4.20	Espectros de ¹ H RMN del extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> . (a) Antes y (b) después de la reacción, y su respectiva expansión en la región de carbohidratos (c-d).	69
Figura 4.21	Espectros de FTIR obtenidos de (a) extracto de <i>S. praealtum</i> , (b) sobrenadante obtenido después de la reacción y (c) AgNEs.	70
Figura 4.22	Monitoreo del cambio de pH durante la reacción de síntesis de AgNEs (a), velocidad de generación de iones H ⁺ (b).	71
Figura 4.23	Espectro de UV-Vis de AgNPs posterior a lavadas exhaustivas.	72
Figura 4.24	Mecanismo de reacción de la síntesis de AgNPs usando extracto de hoja de <i>S. praealtum</i> y su estabilización química.	73
Figura 4.25	Espectros de UV-Vis de los AgNEs y las soluciones obtenidas antes y después del lavado.	74
Figura 4.26	Espectro UV-Vis del extracto acuoso de <i>S. praealtum</i> que muestra las absorciones típicas de los anillos de flavonoides (a) y esquema de esqueleto de flavonol y bandas de absorción de acuerdo a su estructura.	74
Figura 4.27	Actividad quelante del ion Fe (II) del extracto <i>S. praealtum</i> (a), control de quelante comercial EDTA.	76

Figura 4.28	Mecanismo propuesto para la formación de los AgNEs usando extracto de hoja de <i>S. praealtum</i> .	77
Figura 4.29	Espectros UV-Vis con sus respectivos gráficos Tauc (insertados en la parte superior derecha) que corresponden a nanomateriales de Ag obtenidos a diferentes concentraciones de AgNO ₃ , 5 mM (a), 10 mM (b) y 15 mM (c).	78
Figura 4.30	Espectros UV-Vis de degradación de MB en ausencia o presencia de NaBH ₄ (columna izquierda y derecha, respectivamente) utilizando AgNPs (a, d) y AgNEs a 10 mM (b, e) y 15 mM (c, f).	80
Figura 4.31	Mecanismo propuesto de degradación del colorante azul de metileno utilizando AgNPs y AgNEs con y sin NaBH ₄ .	81
Figura 4.32	Mecanismo propuesto de degradación del colorante azul de metileno utilizando AgNPs y AgNEs con y sin NaBH ₄ .	83
Figura 4.33	Curvas cinéticas de degradación de MB en función de la cantidad de AgNPs (a); gráfico de barras que muestra la línea de tendencia de degradación (inserto superior izquierdo) (b).	84
Figura 4.34	Espectros UV-Vis de ciclos de reutilización de AgNPs (a), y gráfico de barras del % de degradación en cada proceso (b).	84
Figura 4.35	Micrografías MEB que muestran AgNPs e histograma de tamaño (a) y una AgNEs esférica (b).	85
Figura 4.36	Ensayos antibacterianos entre AgNEs y AgNPs en bacterias <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> a diferentes concentraciones de nanomateriales.	86
Figura 4.37	Gráfico de barras del diámetro de inhibición bacteriana de AgNPs en contra de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	87
Figura 4.38	Modelo de Gompertz para crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .	89
Figura 4.39	Efecto de inhibición del crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> W303-1 expuesto a muestras de AgNO ₃ , extracto, AgNEs y AgNPs. Los valores se presentan como la media ± DE.	90
Figura 4.40	Efecto de inhibición del crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> W303-1 expuesto a diferentes concentraciones de AgNPs.	90
Figura 4.41	Citotoxicidad celular de <i>S. cerevisiae</i> expuestas a extracto <i>S. praealtum</i> , AgNPs y AgNO ₃ mediante el ensayo de viabilidad celular por azul de tripano y representación de células vivas y muertas.	91
Figura 4.42	Viabilidad celular de <i>S. cerevisiae</i> expuesta a diferentes concentraciones de AgNO ₃ mediante azul de tripano.	91
Figura 4.43	Producción relativa de ROS en células de levadura <i>S. cerevisiae</i> bajo exposición a diferentes concentraciones de AgNPs (0, 50, 150 y 250 µg/mL) durante 24 h.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Principales metabolitos encontrados en el extracto de hoja de <i>S. praealtum</i> .	19
Tabla 2.2	Resultados de la actividad antibacteriana de nanoestructuras de Ag frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	33
Tabla 4.1	Análisis proximal de las hojas secas de la planta <i>S. praealtum</i> .	50
Tabla 4.2	Análisis fitoquímicos del extracto de <i>S. praealtum</i> .	51
Tabla 4.3	Resultados de la determinación de fenoles totales en μ moles equivalentes de ácido gálico/mg de extracto y flavonoides totales expresados en Equivalentes de μ moles de quercetina/mg extracto.	76
Tabla 4.4	Resumen cinético del proceso de degradación obtenido en función del tiempo con o sin NaBH_4 como catalizador.	80
Tabla 4.5	Parámetros cinéticos de crecimiento la levadura <i>S. cerevisiae</i> .	88

RESUMEN

La nanotecnología se ha encargado de lograr avances importantes en la síntesis y aplicaciones de nanopartículas con propiedades sobresalientes en óptica, electrónica, catálisis, biomédicas. Sin embargo, la incursión del ensamblaje de estos nanomateriales ha llamado la atención por las características potencialmente diferentes a las nanopartículas por sí solas. En este trabajo se muestra que mediante la utilización del extracto acuoso de la planta *Sedum praealtum* fue posible sintetizar nanopartículas de Ag (AgNPs) y autoensambles (AgNEs) de diferentes morfologías y tamaños a través de la variación de parámetros como la concentración de extracto, sal precursora (AgNO_3), temperatura y agitación magnética. La caracterización se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (MET), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopías UV-Vis, de infrarrojo FTIR y resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H RMN). Además, se evaluó de forma comparativa de las AgNPs respecto a las AgNEs las propiedades catalíticas en la degradación de azul de metileno en presencia y ausencia de NaBH_4 ; actividad antibacterial contra *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y, citotóxica sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* W303-1. Los resultados obtenidos indicaron la formación de AgNPs esférica con tamaño promedio de 17 nm, y AgNEs micrométricas de morfología esférica y de tipo flor de diferentes tamaños y rugosidad. El análisis espectroscópico indicó que los glucósidos y flavonoides glicosilados son los principales participantes en la formación de los AgNEs. Asimismo, tanto los AgNEs como las AgNPs mostraron actividad catalítica para la degradación de colorante orgánico independiente de la morfología y uso de NaBH_4 a los 24 h de reacción. Mientras que, en la actividad biológica contra bacterias y levaduras, los AgNEs no presentaron toxicidad aparente, sólo las AgNPs presentan baja toxicidad generado por estrés oxidativo. La baja bioactividad se atribuye a la diferencia de tamaño y al recubrimiento por parte de las biomoléculas de *S. praealtum*. Por lo tanto, el extracto acuoso de *S. praealtum* permite con éxito obtener en un sólo paso AgNEs y AgNPs biogénicas seguras para aplicaciones que implica contacto con mamíferos y organismos superiores.

Palabras clave: Síntesis verde, caracterización, crecimiento cristalino, antibacterial, catálisis.

ABSTRACT

Nanotechnology has been responsible for achieving important advances in the synthesis and applications of nanoparticles with outstanding properties in optics, electronics, catalysis, and biomedicine. However, the foray into assembling these nanomaterials has drawn attention to potentially different characteristics from nanoparticles alone. This work shows that by using the aqueous extract of the *Sedum praealtum* plant it was possible to synthesize Ag nanoparticles (AgNPs) and self-assemblies (AgNEs) of different morphologies and sizes through the variation of parameters such as extract concentration, salt precursor (AgNO_3), temperature and magnetic stirring. The characterization was carried out using scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM), X-ray diffraction (XRD) and UV-Vis, FTIR infrared, and hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy. In addition, the catalytic properties in the degradation of methylene blue in the presence and absence of NaBH_4 were evaluated comparatively concerning AgNEs; antibacterial activity against *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) and cytotoxic against the yeast *Saccharomyces cerevisiae* W303-1. The results obtained indicated the formation of spherical AgNPs with an average size of 17 nm and micrometric AgNEs with spherical and flower-like morphology of different sizes and roughness. The spectroscopic analysis indicated that glycosylated glycosides and flavonoids are the main participants in the formation of AgNEs. Likewise, both the AgNEs and the AgNPs showed catalytic activity for the degradation of the organic dye independent of the morphology and use of NaBH_4 after 24 h of reaction. While, in the biological activity against bacteria and yeasts, the AgNEs did not show apparent toxicity, only the AgNPs show low toxicity generated by oxidative stress. The low bioactivity is attributed to the difference in size and to the coating by the biomolecules of *S. praealtum*. Therefore, the aqueous extract of *S. praealtum* allows the successful obtaining in a single step of safe biogenic AgNEs and AgNPs for applications that involve contact with mammals and higher organisms.



INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

En los últimos años se ha conseguido avances significativos en el proceso de síntesis de nanopartículas [1]. No obstante, se ha logrado obtener la formación de nanoestructuras autoensambladas con estructuras ingeniosas e interesantes que contienen propiedades colectivas ajustables a diferencia del material a granel y de las solas nanopartículas individuales, lo que las hace destacar en una amplia gama de campos de aplicación [2]. La estrategia de abajo Botton up han sido fundamental para la fabricación de estas estructuras, debido a que se forman por el balance de muchas de las fuerzas participantes, en el proceso se cree pueden ser parte de fuerzas de atracción y repulsión como: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fenómenos hidrófobos, apilamiento π - π , coordinación metal-ligando, fuerzas de Van der Waals, que se logran controlar ajustando parámetros, como temperatura, disolvente y proceso de nucleación [3, 4].

Por su parte, las nanoestructuras de metálicas están integradas por el ensamble organizado autónomo y espontaneo de bloques de construcción que forman estructuras 0D, 1D, o 2D. Dicho autoensamblado puede suceder por crecimiento fractal o por ensamblaje jerárquico a través de unidades más pequeñas. Así, sus propiedades dependen de la morfología y tamaño de dichas estructuras ensambladas, ya que surgen de la combinación de las propiedades de los componentes individuales y sus interacciones mutas [3, 5].

Diversidad de metodologías han surgido para sintetizar estas nanoestructuras de la que incluyen el uso de surfactantes [6, 7], uso y mezclas de diferentes solventes [8-10], inducción de campos magnéticos [11], aplicando ultrasonido [12, 13] y biológicos a partir de plantillas [14, 15]. Sin embargo, un gran número de las técnicas anteriores se hace uso de agentes químicos considerados tóxicos. Para ello, una alternativa es el uso de extractos de planta en la síntesis de nanopartículas de metales nobles al ser un método económico, fácil y seguro [16, 17], ya que son fuentes de biomoléculas que actúan como agentes reductoras y estabilizantes [18, 19]. Tales como, azúcares, proteínas entre otras bioactivas [20]. Dependiendo de la naturaleza química, algunos de estos compuestos son clave para la formación de nanoestructuras autoensambladas al tener comportamiento como agentes aglutinantes y directores que funcionan como tensoactivos que permitan el crecimiento anisotrópico de los nanomateriales. En consecuencia, para desarrollar una morfología autoensamblada mediante síntesis verde, es necesario la presencia de agentes reductores eficientes que provoquen una nucleación relativamente rápida, bajas cantidades de agentes estabilizantes y agentes directores o ligandos que den forma a la nanoestructura autoensamblada [5]. Aun así, son pocos los trabajos que han hecho uso de plantas para la síntesis de nanoensambles de Ag [9, 21-23].

Por otro lado, la planta *S. praealtum* tiene aplicaciones en el tratamiento antiinflamatorio, espermicida y analgésico en el tratamiento del dolor de muelas, amigdalitis, enfermedades oculares, erupciones cutáneas y regeneración de tejidos [24-26]. Además, se ha comprobado que familia de plantas *S. praealtum* contiene compuestos con actividad antioxidante, sustancias hepatoprotectoras y anticancerígenas [27]. Estudios fitoquímicos en *S. praealtum* demuestran la presencia moléculas de ácidos carboxílicos, flavonoides, alcoholes, cumarinas, azúcares reductores, alcaloides, taninos, flavonoides y glucósidos. Se cree que los antioxidantes polifenólicos kaempferol y la quercetina reconocidos en la planta *S. praealtum*, se pueden usar para reducir los iones de plata a plata metálica [27-29].

Por otro lado, se han reportado las propiedades catalíticas, [30-33]. Antibacterial [34-36] y citotóxica [36-38] de AgNPs. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, es importante conocer el comportamiento de los nanoensambles de Ag (AgNEs) en cuanto a estas propiedades. Por lo tanto, en este trabajo se llevó a cabo el estudio de la síntesis y caracterización de AgNEs y AgNPs utilizando extracto acuoso de *S. praealtum* como agente reductor, estabilizantes y de dirección. Además, se reporta de forma comparativa entre AgNEs y AgNPs, los resultados de la evaluación de propiedades catalíticas en la degradación de azul de metileno (MB); antibacterial contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y citotóxicas utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de célula eucariota, mediante ensayos de crecimiento, viabilidad y generación de especies reactivadas de oxígeno (EROs).

1.2 Objetivo general

Realizar la síntesis verde de nanoensambles de plata (AgNEs) por medio del extracto de *S. praealtum*, su caracterización física, química, morfológica, estructural, así como evaluar de forma comparativa el mecanismo de citotoxicidad en levadura como modelo eucariota, entre las AgNPs y AgNEs.

1.3 Objetivos particulares

1. Efectuar la síntesis de AgNEs por medio de extracto de *S. praealtum*.
2. Estudiar el mecanismo de crecimiento y formación de AgNEs.
3. Realizar la caracterización física, química, morfológica y estructural de los nanomateriales obtenidos por medio de diversas técnicas como lo son: espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis), microscopía electrónica de barrido (MEB), Microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (^1H RMN) y espectroscopía de absorción atómica.

4. Evaluar la capacidad antibacterial y catalítica de forma comparativa de las AgNPs y AgNEs
5. Estudiar los mecanismos de daño y citotoxicidad de los nanomateriales en levadura como modelo eucariota.

1.4 Justificación

La nanotecnología se ha encargado de manera satisfactoria en los últimos años de descubrir nuevos materiales, logrando avances importantes en la síntesis y aplicaciones de nanopartículas con propiedades sobresalientes en óptica, electrónica, catálisis, biomédicas. Sin embargo, la incursión del ensamblaje de estos nanomateriales ha llamado la atención por las características potencialmente diferentes a las nanopartículas por si solas. Pero solo se han logrado obtener bajo condiciones específicas. De ahí parte la atención a conseguir métodos de síntesis controlada y reproducible que puedan partir de enfoques que permitan manipular las morfologías y la composición química para dar paso al autoensamblaje de nanoestructuras [39]. Para ello, existen una variedad de métodos físicos y químicos de síntesis, que por un lado, en los físicos se traduce a sistemas complejos y de alto coste económico y energético y por el otro lado, los métodos químicos, que aunque ofrece mejores oportunidades de diseño y homogeneidad química, presentan como desventaja el uso de agentes tóxicos como reductores, estabilizantes y agentes de recubrimiento, lo que restringe su uso en gran medida, en aplicaciones biomédicas y clínicas.

Para superar los problemas anteriores, la síntesis verde se ha convertido en una nueva alternativa eco amigable, no tóxico, fácil y económico para la producción de estas nanoestructuras, usando agentes reductores, estabilizantes y ligantes de origen natural. Los metales nobles han llamado mucha atención por los amplios campos de aplicación. Lo que conlleva a una extensa exposición a los seres humanos por el uso de productos con estos nanomateriales, por ejemplo: uso y presencia de estos nanomateriales en geles, dispositivos médicos, cremas, procesamiento de alimentos, etc., Además, muchos de ellos se han diseñado para aplicaciones en el campo biomédico, utilizándolos en gran medida como antibacteriales, insecticidas, antifúngicos, transportadores de fármacos e indicadores biológicos, lo que exige diseñar y buscar los efectos mínimos de toxicidad para su segura utilización [40]. Aunque las AgNPs son utilizadas de forma desenfrenada en muchos de los aspectos antes mencionados, se tienen como inconveniente aun su toxicidad. Que aunque, se establecen una serie de posibles mecanismos de acción citotóxica, aún se debate la comprensión más certera sobre la toxicidad de estos nanomateriales [41]. Por ello, en el presente trabajo, se pretende realizar la biosíntesis usando el extracto de *S. praealtum*, debido a su alto contenido de agentes reductores, estabilizantes, ligantes y biomoléculas modificadores de forma que favorecen la formación de arreglos que propician el ensamblaje de nanoestructuras en forma de AgNEs, mismos que se evaluarán de forma

comparativa con AgNPs, su citotoxicidad para dilucidar el posible mecanismos de mayor influencia de la misma.

1.5 Hipótesis

Los biocompuestos extraídos del extracto de la planta *S. praealtum* servirán como agentes reductores de iones de Ag y, sus derivados oxidados como agentes estabilizadores y ligantes. Esto debido a la velocidad de reducción lenta que estos ofrecen y la interacción Ag-ligante, que permitirá un crecimiento del tipo ensamble de unidades nanométricas de Ag. Así mismo, los AgNEs presentarán menor toxicidad en contacto con la levadura *S. cerevisiae*, en comparación con las nanopartículas de plata individuales (AgNPs), debido al área superficial expuesta que les impedirá tener un contacto mayor con las células. Obtener un material con estas características podría ser útil en el transporte de fármacos dentro del cuerpo humano.

CAPÍTULO

2

**REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

El capítulo a continuación desarrolla lo referente al contexto teórico del problema de investigación, con el objetivo de conocer los conceptos básicos necesarios en el entendimiento del proyecto y sea base para la discusión de los resultados.

2.1 Nanociencia y nanotecnología

En materiales llamados a granel, se puede predecir sus propiedades y comportamiento mediante la mecánica clásica o la termodinámica. Sin embargo, existen materiales no convencionales con tamaño menor a 100 nm, en los cuales sus propiedades pueden ser únicamente explicadas haciendo uso de la mecánica cuántica y temas de física y química del estado sólido [42]. Así, surge una nueva disciplina llamada nanociencia, encargada del estudio de los fenómenos y manipulación de la materia a escala manométrica (1 a 100 nm) tratándose de la billonésimas parte de un metro. A diferencia del tamaño de los átomos (mucho menores a 1 nm) y de la escala de materia a bulk o macro, sobresale las propiedades particulares y sobresalientes dependientes del tamaño. [43] y a la nanotecnología a la comprensión, manipulación, diseño, control y aplicación de materiales a escala manométrica. Los fenómenos únicos dependientes del tamaño permiten propiedades particulares para novedosas aplicaciones [44, 45]. En la nanotecnología convergen campos de conocimiento como física, química, ciencia de los materiales, ingeniería, biología, medicina, etc., combinando con ello, infinitas oportunidades y retos en desarrollo tecnológico [46].

2.2 Nanomateriales

La materia constituida que se caracteriza por poseer alguna de sus dimensiones en el rango de 1 a 100 nm, es conocida y definida ampliamente como nanomaterial. Esta nueva clase de materiales sobresale por sus propiedades únicas que ofrece vastas aplicaciones prácticas [47]. Estas nanoestructuras son un puente entre átomos-moléculas y sistemas de materiales a granel. A medida que se reduce el tamaño y se acerca a la escala manométrica, su área superficial expuesta aumenta, favoreciendo en mayor medida las interacciones interatómicas e intermoleculares. Con ello, se provoca diversas atracciones, repulsiones e interacciones superficiales que ocasionan efectos electrónicos y confinamiento cuántico que repercuten en el comportamiento y las propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y químicas de los nanomateriales [48, 49]. Se consideran nanoestructuras individuales aquellas como nanocristales, nanoalambres, puntos cuánticos, nanotubos, etc. Mientras que las matrices, ensambles y superredes de nanoestructuras individuales son nanoestructuras formados por agregados [50, 51].

En nanotecnología existen dos enfoques principales de obtención de nanomateriales: por reducción de tamaño o de arriba hacia abajo (Top-Down) y por aumento de tamaño o de abajo hacia arriba (Bottom up) [52]. Mientras Top-Down (descendente), se basa en el diseño y obtención de estructuras a nanoescala a partir de materiales de mayor tamaño, en los que se somete a su fragmentación con el hecho de disminuir su tamaño hasta una escala nanométrica. En el caso contrario, Bottom up (ascendente) se ajusta a la construcción de formas más grandes a partir de la manipulación y ensamblaje de átomos o moléculas por medio de reducción química [53].

2.3 Clasificación de nanomateriales

Los nanomateriales son principalmente clasificados en base a 4 factores característicos de estos. Generalmente, los nanomateriales han sido clasificados según su dimensionalidad, morfología, estado de aglomeración y uniformidad y por su composición [54].

2.3.1 Dimensionalidad

La clasificación más atinada para los nanomateriales y de mayor importancia por encontrarse expresada en la definición de un nanomaterial, es en base a las dimensiones que lo conforman. Dicha clasificación incluye cuatro categorías: 0D, 1D, 2D y 3D. Esta nomenclatura ayuda a establecer las dimensiones de la nanoestructura que superan la nanoescala [55-57].

Los nanomateriales 0D se caracterizan por que todas sus dimensiones se encuentran dentro de la escala nanométrica (puntos cuánticos); en los 1D dos de sus dimensiones aun pertenecen a la nanoescala (nanotubos, nanoalambres); mientras que los 2D sólo una dimensión es nanométrica (nanolaminas) y finalmente, los 3D son ensamblajes de otros nanomateriales que pueden o no estar dentro de las dimensiones nano [58, 59].

2.4 Nanopartículas y autoensambles

2.4.1 Nanopartículas

Las NPs son una exclusiva y amplia gama de materiales que incluye material en forma de partículas individuales que se encuentran en dimensiones nanométricas (1 a 100 nm) [60] que se caracterizan por sus propiedades poco comunes, que no solo dependen de la estructura y de la composición, sino que además, son afectadas principalmente por el tamaño de escala nano y con ello otros parámetros como: la forma, área superficial, confinamiento cuántico (espacio en que se encuentra un ente, por ejemplo el electrón, su

longitud de onda es comparable a una onda de electrones incidente, conocida como onda de *de Broglie*), composición, cristalinidad y estructuras de las partículas [61].

Las NPs no se considera un cúmulo de moléculas o átomos simples en si mismas, si no por el contrario, pueden estar compuestas de tres capas:

- La capa superficial, que puede o no estar funcionalizada por alguna variedad de compuesto, iones, surfactantes o polímeros.
- La capa de cubierta, que en el sentido químico difiere del núcleo en todos los aspectos.
- El núcleo, que se considera la parte central y esencial de la NPs.

Las NPs, al igual que los nanomateriales en general se pueden clasificar, dependiendo de su forma y tamaño. Pero algunas clases bien conocidas están dadas de manera importante, en cuanto a sus características físicas y químicas:

- NPs a base de carbono: los fulerenos y los nanotubos de carbono (CNT) son los dos miembros principales que conforman estas NPs basado en una estructura puramente de carbono organizados en forma pentagonal y hexagonal con hibridación sp^2 .
- NP cerámicas: sólidos inorgánicos no metálicos que encuentran en forma: amorfa, policristalina, densas, porosas o huecas. Son aplicadas en catálisis, fotocatalisis, etc.
- NPs semiconductoras: materiales que por poseer propiedades entre metales y no metales ostentan de intervalos amplios de bandgap (banda prohibida), y son muy utilizadas en dispositivos electrónicos.
- NPs poliméricas (PNP): son nanoesferas o capsulas cuya matriz es generalmente sólida en su totalidad, absorbiéndose otras moléculas en parte exterior de la superficie esférica. Por lo que estas PNP se funcionalizan de manera bastante fácil.
- NPs en base a lípidos: éstas contienen restos de lípidos, son utilizadas en amplias aplicaciones biomédicas como portadores y suministro de fármacos. Son esféricas al igual que las poliméricas, poseen núcleos sólidos formado de lípidos y una matriz de moléculas liófilicas solubles, son estabilizadas por surfactantes o emulsionantes.
- NPs metálicas: son puramente formadas de precursores metálicos y presentan el fenómeno de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) con

propiedades optoelectrónicas únicas, donde los metales nobles y alcalinos como Cu, Ag, Au, etc., contienen una extensa banda de absorción en el espectro solar electromagnético. La síntesis de NPs metálicas de vanguardia, se controla por facetas, tamaño y forma de las NPs [60].

2.4.2 Autoensambles de Ag

Aparte de los nanomateriales de los que poseen por lo menos una de sus dimensiones en el tamaño nano, se debe hacer una clara distinción respecto a los materiales nanoestructurados, que son constituyentes de agregados de nanomateriales en forma de nanocristales y nanofibras [62].

No obstante, hay una serie de materiales particulares que sobresalen de los dos anteriores en el aspecto de ser construidos utilizando componentes orgánicos e inorgánicos que permiten coordinar la nucleación, crecimiento y la organización para producir objetos íntegros y de orden superior al micrómetro. Constituyendo así, los nanomateriales que se ensamblan bajo condiciones de equilibrio y no equilibrio en un proceso de ensamblaje y autoensamblaje, por unidades nanométricas como bloques de construcción básicos tales como: metales y nanopartículas de ellos (Au, Ag), sales de iones metálicos (CaCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), puntos cuánticos, nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4), óxidos (TiO_2) así como sólidos vítreos (SiO_2) que se integran química y físicamente en nanoestructuras discretas [63, 64].

Los procesos de construcción de autoensambles se dividen en tres enfoques de manera sistemática: encarcelamiento a nanoescala, envoltura supramolecular y plantillas de nanoestructuras:

- Encarcelamiento a nanoescala: comprende componentes inorgánicos que son atrapados por medio de una preorganización de arquitectura orgánica. Logrando la formación de nanoestructuras por la adición inorgánica bajo condiciones apropiadas (concentración, velocidades de reacción lenta, estequiometría, etc.) del tipo núcleo-coraza, por ejemplo utilizando proteína supramoleculares como la cápside viral, en el que los reactivos inorgánicos impregnan la cubierta y se difunden (si bien puede ser pasiva, se puede inducir por modificación de parámetros como el pH) a través de canales moleculares dentro de la arquitectura autoensamblada de la cápside, produciéndose la nucleación específica dentro de la cavidad orgánica, que sirven para uso en: hidrogenación catalítica y almacenamiento magnético. De igual forma, se puede llevar a cabo el proceso inverso, en el que a partir de una nanopartícula como preforma, se ensamblan proteínas sobre la superficie, produciendo una nanoestructura funcionalizada.

Asimismo, también sucede bajo condiciones especiales que conlleva a confinamientos dentro de mesofases orgánicas liotrópicas. En este, las nanoestructuras adoptan interiores mesoestructurados inusuales y diferentes a las nuclea-coraza. Por ejemplo nanopartículas esféricas tipos cebollas, en las que se dispone en mesoestructura laminar con la ayuda de algún tensoactivo. Dando también nanopartículas elipcooidales en forma hexagonal debido a la rápida dilución de las mezclas inorgánica-orgánica induciendo la transformación de formas durante la nucleación.

- **Envoltura supramolecular:** dentro de este enfoque los conjuntos macromoleculares con construcción tridimensionales (polisacáridos, proteínas, enzimas y ADN) se envuelven de forma continua del componente inorgánico pero sin patrones de superficie, dando nanoestructuras con morfologías cilíndricas, helicoidales, etc., por ejemplo: nanocinta a base de porfirina recubierta con sílice y fibrillas de colágeno. Se cree que idealmente el componente orgánico y su funcionalidad se mantendrían después de la asimilación del componente inorgánico, soportando incluso, estímulos externos adversos permaneciendo intactas estructuralmente y manteniendo su funcionalidad.
- **Nanoestructuras de plantillas:** dentro de éste enfoque se utiliza una amplia gama de arquitecturas orgánicas autoensambladas que funcionan como plantillas, que por medio del control de: velocidades de reacciones lentas, niveles de sobresaturación bajas y relaciones estequiométricas de los reactantes, se facilita las interacciones de manera específica la deposición inorgánica a nanoescala sobre la superficie orgánica accesible de la plantilla. Esto logra una marcada selectividad de sitio para la preorganización de las unidades nanométricas inorgánicas individuales, lo que se traduce en uniones, en la mayoría de los casos, de cationes metálicos en la superficie orgánica que da paso a la disposición, adición de iones o moléculas, seguida de la cristalización, mejorando la exposición secuencial de la plantilla.

Una amplia gama de moléculas orgánicas sintéticas son utilizadas como: lípidos quirales, tensoactivos a base de péptidos, copolímeros de bloque, etc., que promueven nanoestructuras anisotrópicas en forma de filamentos, tubos, helicoidales, etc., originando el ensamblaje de nanomateriales híbridos integrados en plantilla. En la mayoría de los casos, las moléculas o iones se autoensamblan en medio acuoso en proceso entálpico y entrópico, adoptando formas anisotrópicas debido a las formas complejas, tamaño molecular y las interacciones intermoleculares específicas.

2.5 Métodos de síntesis de nanomateriales

Con anterioridad se había hablado de los métodos de síntesis Top down y Bottom up, de los cuales, este último, se basa en formar nanomateriales desde niveles atómicos. Apartir de átomos o moléculas como bloques que se ensamblan y se dirigen a la construcción de nanomateriales con características (tamaño, morfología y composición) bien definidas. Los métodos Bottom up de síntesis se clasifican de acuerdo a la fase [44] (Figura 2.1). En fase sólida son CVD y descomposición térmica o física (PVD); en fase líquida se divide en métodos líquido/líquido; que incluye reducción química, reducción indirecta, reducción biológica, spray pyrolysis, solvotermal y spray drying y, sedimentarios, en los que se engloban la técnicas sol-gel, co-precipitación, precipitación alcalina e hidrólisis [59].

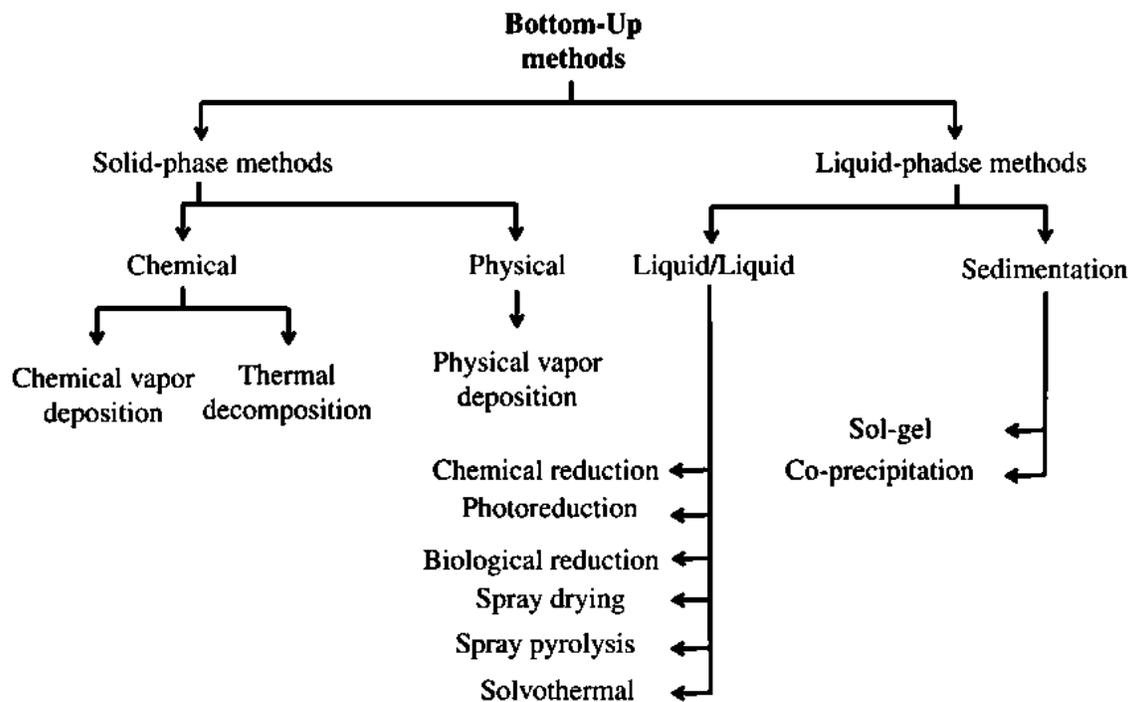


Figura 2.1. Métodos Bottom up de síntesis de nanomateriales que pertenecen de acuerdo a Srivastaba y col. [59].

2.5.1 Síntesis por reducción química verde

Para que se lleve a cabo la síntesis por reducción química en fase acuosa, se emplean tres elementos generales: (I) el precursor del metal, (II) el agente o agentes reductores y (III) agentes estabilizantes, e implica dos etapas de formación de AgNPs: nucleación y crecimiento. La nucleación se puede controlar por ajuste de parámetros de reacción como son el caso de la temperatura, pH, precursores, agentes de reacción y agitación [65]. En esta se usa agentes reductores fuertes como citrato de sodio, el ascorbato, borohidruro de sodio

(NaBH_4), hidrógeno elemental y polialcoholes (comunmente llamado método del poliol), para reducir los iones metálicos en solución. Además, es necesario el uso de agente estabilizantes como: polivinilpirrolidona (PVP) y otros polímeros, ligantes y surfactantes sintéticos, que en general son considerados tóxicos, considerándose una desventaja al aumentar la contaminación en el proceso de síntesis por generar residuos dañinos, incrementar los costos de producción y lo más importante la citotoxicidad en células, limitando su uso en aplicaciones médicas [64, 66, 67].

La biosíntesis por otro lado, es igualmente un método coloidal basado en utilizar principios de la química verde y se enfocan en tener tres aspectos elementales; el solvente, el agente reductor y agente estabilizante. Regularmente, como solvente es utilizando el agua, pero inclusive se ha utilizado etanol y metanol, y como característica principal es que posee agentes reductores y estabilizantes simultáneamente actuando, incluso algunos agentes reductores pueden actuar tanto como reductores y estabilizantes. Por lo tanto, ya no es necesario agregar agentes estabilizantes adicionales. Los agentes reductores y estabilizantes que se utilizan provienen a través del uso de microorganismos y plantas. Sin embargo, la síntesis con el uso de extractos de plantas se considera más práctica, versátil, rápida y barata [59]. Así, los agentes reductores y estabilizantes son reemplazados por moléculas o compuestos producidos por elementos vivos (bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas o plantas) como metabolitos reductores y estabilizantes, como son el caso de: terpenoides, taninos, alcaloides, esteroides, saponinas, polifenoles, ácidos fenólicos y proteínas, que a través de grupos funcionales como carboxilo, amina, hidroxilo, etc., juegan un papel importante como potenciales reductores de los iones metálicos. Un ejemplo de ello se ilustra en la Figura 2.1, en el que un ácido tánico se desprende de 2 electrones y 2 protones de sus grupos hidroxilo, se oxida actuando como agente reductor para llevar a cabo la reducción de los iones de plata, de igual manera sucede con el geraniol y los flavonoides. Como comparación al método químico, la síntesis verde tiene la ventaja de ser rápido, ecoamigable, no requiere altas presiones, temperaturas y su mecanismo para la formación de AgNPs consta de una sola etapa, ya que el extracto contiene los agentes reductores y estabilizantes en un solo medio, que involucra los mecanismos de nucleación y crecimiento [67, 68].

2.6 Mecanismo de nucleación y crecimiento

En la síntesis química verde se sintetizan nanopartículas metálicas, donde además de la reducción de los iones metálicos, se lleva a cabo procesos de nucleación y crecimiento. Así, el proceso de síntesis se puede llevar a cabo bajo enfoque termodinámico o equilibrio cinético. Para el caso del enfoque de equilibrio termodinámico, el proceso de síntesis consiste en una serie de etapas consecutivas: generación de una condición de supersaturación del sistema; nucleación y crecimiento. No obstante, en el enfoque cinético,

que se presenta principalmente en métodos como microemulsión, pirolisis, deposición basada en plantilla, se logra limitando la cantidad de precursores disponibles [69].

De manera general el proceso de formación de las nanopartículas puede ser vista por medio de tres etapas posteriores a la reducción química:

- 1) Nucleación: proceso en el que se da la formación veloz de pequeñas agregaciones o clusters de una nueva fase sólida termodinámicamente estables llamados núcleos por medio de especies poco solubles o alta sobresaturación. Formándose en el seno de la fase que constituye el medio líquido o gaseoso (nucleación homogénea), en contacto con la interface de algún sustrato de otro material sólido (nucleación heterogénea) o por agregación de partículas (nucleación secundaria).
- 2) Crecimiento: Agregación de átomos, moléculas o partículas pequeñas para lograr partículas más grandes.
- 3) Terminación: Estabilización o repulsión de las nanopartículas por medio de surfactantes.

2.6.1 Nucleación

La nucleación es la formación de pequeños agregados de átomos o moléculas llamados núcleos cuando la concentración de un soluto disuelto en un solvente rebasa la solubilidad de equilibrio (supersaturación); la temperatura se encuentra por debajo del punto de transformación de fase o se tiene baja viscosidad en el sistema. Además, bajo otras condiciones se puede lograr la condición de supersaturación, por ejemplo: por medio de la disminución de la temperatura de una mezcla en equilibrio o por reacciones químicas *in situ* mediante la conversión de productos químicos que transforman productos químicos altamente solubles en productos menos solubles. Pudiendo ser sintetizadas por nucleación homogénea en medio líquido, sólido o gaseoso, o bajo nucleación heterogénea al contacto con una interface en una fase sustrato, aunque también se da la nucleación secundaria a partir del contacto con mismos cristales de soluto como se puede observar la clasificación de nucleación en la Figura 2.2 [69-71].

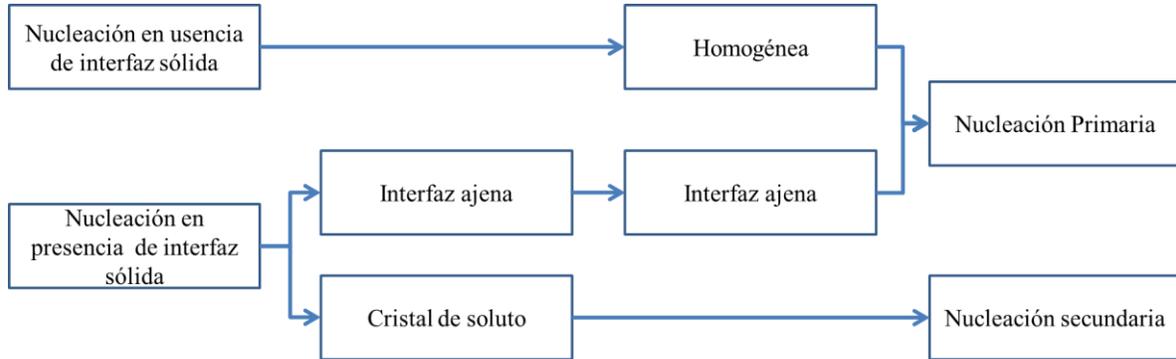


Figura 2.2. Clasificación del fenómeno de nucleación.

a) Nucleación homogénea

Dada debido a la supesaturación del sistema por los reactantes involucrados en la reacción, tales como los precursores, agentes reductores, estetizantes y aditivos. También, la disminución de temperatura de una mezcla de reacción que presenta saturación, puede conducir a una supesaturación. Por lo tanto, cuando se excede el equilibrio de solubilidad se genera una transformación a una nueva fase sólida. Para entender este fenómeno de formación de una nueva fase, se parte de que hay la transformación de una fase vieja a una nueva fase sólida solamente cuando se cumple que el cambio de energía libre de Gibbs $\Delta G < 0$ [69]. Es así que tal cambio de energía es debido a la suma de energía libre de formación de un nuevo volumen (volumen de transición líquido-sólido) y la energía debido a la nueva superficie creada en la transición de fase. Lo que permite la creación de pequeños clusters sobre el seno del líquido con radio r . Donde, un valor de r por debajo del valor crítico r^* , los núcleos no son estables y se re disuelven en el medio. No obstante, una vez alcanzado el valor de radio crítico, el núcleo continúa su crecimiento (véase Figura 2.3) [70, 72].

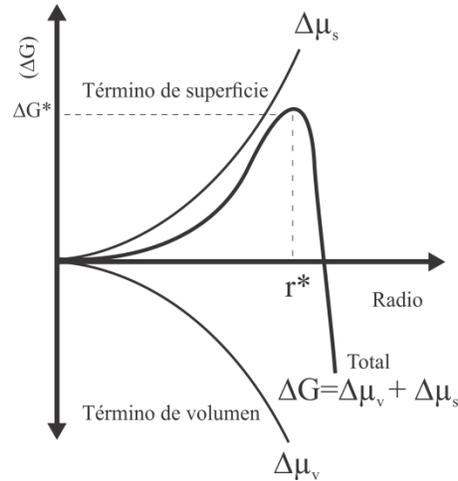


Figura 2.3. Representación de las $\Delta\mu_v$, $\Delta\mu_s$ y ΔG energías libres volumétricas, de superficies y totales en función del radio del núcleo [72].

b) Nucleación heterogénea

La nucleación heterogénea es conducida por la presencia de superficies extrañas en el sistemas, consideradas como impurezas (varias superficies), conducen a un proceso de nucleación heterogénea caracterizado por ocurrir en sobresaturaciones bajas [71].

c) Nucleación secundaria

En la nucleación secundaria es favorecida por la presencia de una semilla cristalina formada del soluto de la misma solución, que actúa como catalizador para la formación de núcleos en presencia de partículas de la misma fase [71, 73].

2.6.2 Crecimiento

En la síntesis de nanopartículas la distribución de tamaño uniforme depende directamente de dos aspectos: si los núcleos se forman en un tiempo muy corto, se asegura que los núcleos sean del mismo tamaño considerando que se forman bajo las mismas condiciones y además, del proceso subsecuente de crecimiento. Este proceso de crecimiento posterior de los núcleos implica múltiples pasos:

- 1) Generación de especies de crecimiento (monómeros).
- 2) Difusión de los monómeros a partir del volumen del sistema a la superficie de crecimiento.
- 3) Adsorción de monómeros sobre la superficie de crecimiento.

- 4) Crecimiento superficial por la incorporación irreversible de monómeros sobre la superficie sólida.

Los pasos anteriores están implícitos dentro de dos procesos de los cuales pueden suceder durante el crecimiento de la nanopartículas. Por una parte, los pasos del 1 a 3 se consideran un fenómeno por difusión, que incluye la generación, la difusión y la absorción de monómeros sobre la superficie del núcleo. Mientras que, la incorporación de monómeros por adsorción sobre la superficie sólida, se denomina crecimiento en la superficie.

a) **Crecimiento controlado por difusión**

Después de que en la síntesis de nanopartículas se haya llevado a cabo la nucleación, y haya disminuido la concentración por debajo de la mínima de nucleación, la formación de nuevos núcleos se detiene, dando paso al crecimiento de los ya formados, promoviendo la formación de NPs por el crecimiento mediado por la difusión de monómeros desde el volumen del líquido hacia la superficie de la partícula.

El crecimiento controlado promueve la formación de nanopartículas de tamaño uniforme, debido precisamente a que la diferencia de tamaño del radio en cada uno de las partículas disminuye con el paso del tiempo [72].

b) **Crecimiento controlado por proceso de superficie**

Cuando se habla de la difusión de monómeros donde la velocidad de crecimiento será controlada por un proceso superficial, se considera una velocidad suficientemente más rápida, en donde la concentración de la masa es la misma que en el volumen. Este tipo de crecimiento cuenta con dos mecanismos de crecimiento: mononuclear y polinuclear.

El crecimiento mononuclear se realiza capa por capa, incorporándose las especies de crecimiento solo una capa a la vez, es decir, continua con la capa posterior solo si la primera capa ha sido completada. Existe un tiempo lo necesariamente suficiente para que las especies se difundan sobre la superficie.

Para el crecimiento mononuclear, el crecimiento ocurre capa por capa; la especie de crecimiento se incorpora en una capa y se procede a otra capa después que el crecimiento de la capa anterior se ha completado. Hay un tiempo suficiente para que las especies de crecimiento se difundan hacia la superficie. Donde la velocidad de crecimiento será proporcional al área superficial, lo que provoca una marcada diferencia de radios con el paso de tiempo; así este mecanismo no favorece el crecimiento de tamaño uniforme.

Por otro lado el crecimiento polinuclear, se lleva a cabo debido a que la concentración superficial es elevada, son muy rápidos los procesos superficiales que la formación de una segunda capa se realiza sin haber terminado la capa previa. Por lo que en este caso, la velocidad de crecimiento de las partículas es independiente del tamaño de partícula o del tiempo en sí, manteniéndose la velocidad de crecimiento constante. Al contrario al anterior la diferencia absoluta del radio permanece inalterada e irá siendo inversamente proporcional al radio de las partículas y al tiempo de crecimiento. Lo que significa que al ser más grande las partículas la diferencia entre sus radios se hará más pequeña, lo que favorece la formación de partículas de tamaño uniforme.

Adicionalmente, existe otro mecanismo de crecimiento llamado crecimiento secundario basado en el crecimiento de partículas debido a la agregación de unas partículas con otras. El crecimiento debido a este proceso es más rápido que por la adición de especies moleculares o atómicas, y ocurre cuando las partículas más grandes y estables se combinan con otras de menor tamaño y que se consideran inestables por si solas [72, 74, 75].

2.7 Planta

Se ha comprobado ampliamente que por medio de los extractos las plantas, se sintetizan nanopartículas de plata [36, 76-78], cobre [79, 80], oro [81-83] y aleaciones Ag-Au [84, 85], etc., que es atribuido a los compuestos fitoquímicos reductores que contienen de manera específica cada planta [86]. Estos compuestos pertenecen en gran medida a los metabolitos secundarios, llamados así al ser sintetizados por rutas biosintéticas, no esenciales para las principales funciones de la planta. Sin embargo, estos compuestos vegetales ayudan a la sobrevivencia de la misma al tener funciones importantes como: soporte estructural, brindar colores llamativos, fungir como antioxidante como respuesta al estrés producido por condiciones ambientales externas del medio ambiente [87, 88].

2.7.1 Características de la planta *Sedum praealtum*

La planta que se pretende utilizar en el presente trabajo es nombrada *Sedum praealtum* (tradicionalmente llamada siempre viva) que se encuentra en México y Guatemala, crece en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, sobre suelos pedregosos y húmedos, está relacionada con la vegetación perturbada de matorral xerófilo, laderas de cerros y bosques, con clima templado entre los 2400 y los 2700 msnm (metros sobre el nivel del mar) [25, 89]. demostraron la presencia de compuestos como ácidos carboxílicos, flavonoides, alcoholes, cumarinas, azúcares reductores, alcaloides, taninos, compuestos cianogénicos y glucósidos como (kaempferol y quercetina), como los principales encontrados en mayor cantidad y que atribuyen actividades antiinflamatorias y antioxidantes [29, 90]. En torno a estos últimos, se encontraron 4 tipos de flavonoides glicosilados que prevalecen en el

extracto de *S. praealtum* (Tabla 2.1), además evaluaron, su poder espermicida y establecen que esta propiedad se debe a que actúan como aglutinantes del espermatozoide debido a ser inhibidores enzimáticos o agentes tensoactivos o alquilantes, que inhiben la movilidad y metabolismo de espermatozoides [91]. Los mexicanos tratan con esta planta el dolor ocular e inflamación (como antiinflamatorio) y vía vaginal como agente anticonceptivos [24, 92].

Tabla 2.1. Principales metabolitos encontrados en el extracto de hoja de *S. praealtum* [90].

Flavonoides glicosilados
kaempferol 3-O-_-rhamnopyranosyl-(1→2)-glucopyranoside-7-O-glucopyranoside
Kaempferol 3-O-_-rhamnopyranosyl-(1→2)-_-glucopyranoside-7-O-_-rhamnopyranoside
kaempferol 3-O-_-rhamnopyranoside-7-O-_-rhamnopyranoside(kaempferitrin)
kaempferol 3-O-_-glucopyranoside-7-O-_-rhamnopyranoside

2.8 Levadura

Las levaduras son microorganismos eucariotas de forma ovalada, esférica o cilíndrica, aunque algunas pueden formar filamentos (como *Candida albicans*) [93]. En cuanto al tamaño, varía de 1 y 5 μm de anchura y de longitud entre 5 a 30 μm [94]. Estos microorganismos son mesófilos, en la mayoría de los casos, crecen entre los 24 y 48 °C [95]. Están constituidas a grandes rasgos por una pared celular (estructura rígida de 100 a 200 nm de espesor constituida por cuatro componentes principales: glicoproteínas con un grado alto de glucosilación (manoproteínas), quitina y dos tipos β-glucano [96]), un espacio periplásmico, membrana plasmática y citosol. La envoltura celular constituye (15 % del total del volumen de la célula) el principal actor en el control de las propiedades osmóticas y permeabilidad celular [97].

Por su parte, la levadura *S. cerevisiae* es una importante herramienta para la utilización de modelos biológicos eucariotas, debido a que conservan algunos procesos básicos: ciclo celular, metabolismo, algunas funciones de orgánulos, procesamiento de proteínas y respuesta al estrés [98].

2.9 Antecedentes

2.9.1 Síntesis de AgNEs

Actualmente, la síntesis química constituye en la industria así como en la investigación el método preferido en manipulación y control de materiales a nivel atómico y molecular, técnica más comúnmente clasificada dentro de la nanotecnología en la categoría de abajo-arriba (botom-up), es por ello que en la literatura se encuentran algunos trabajos de investigación que hacen de este método uno de los más usados para nanomateriales de plata. A continuación se presentan algunos de ellos.

Por ejemplo Bai y col. [99] realizaron la síntesis de microestructuras esféricas de Ag que se encuentran compuestas por unidades nanométricas con cierta relación de aspecto (nanorodillos) en donde su diámetro era 50 nm, mientras que su longitud alcanzaba los 300 nm. Además, también demostró la formación de esferas a partir de otras subunidades nanométricas, por ejemplo nanoplatos y nanoesferas (ver Figura 2.4), Se caracterizaron por técnicas tales como: DRX, microscopía electrónica de barrido y transmisión.

El método de síntesis lo realizaron a través del uso como agente reductor el ácido ascórbico y como estabilizante el PVP (polivinilpirrolidona). A través de este proponen un mecanismo de formación y de crecimiento de estas nanoestructuras que implica tres etapas de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 2.5: formación de semillas, formación de subunidades primarias (el proceso de crecimiento de las semillas) y agregación de subunidades primarias.

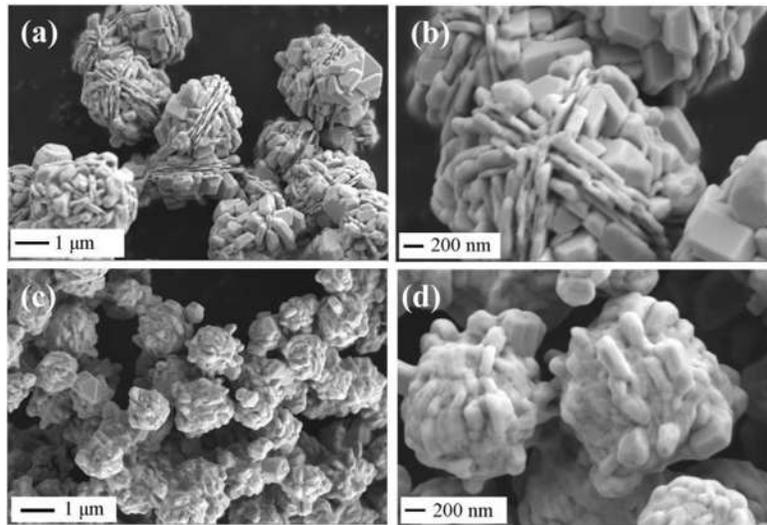


Figura 2.4. Micrografías de microscopía de barrido mostrando que están formadas por subunidades manométricas [99].

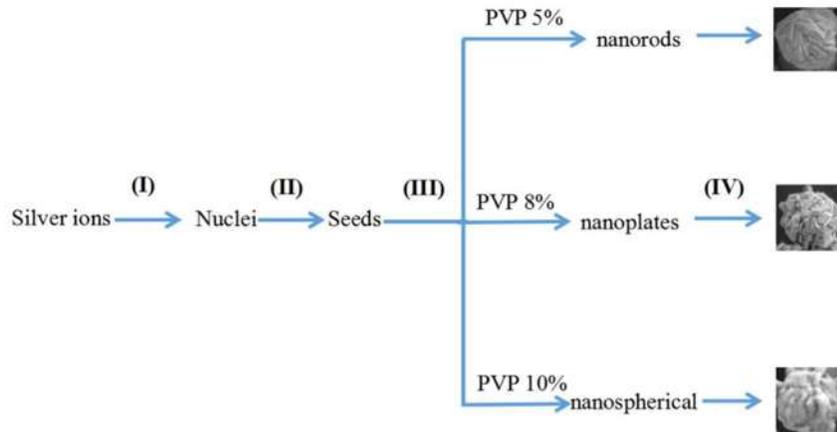


Figura 2.5. Diagrama esquemático para el proceso de formación de plata jerárquica con diferentes microestructuras [99].

También encontraron que el valor de pH inicial afecta las reacciones a través de los siguientes tres aspectos: 1) control de la tasa de liberación de iones de plata para disminuir la tasa de reducción de átomos de plata, 2) control de la tasa de reducción de átomos de plata para disminuir el crecimiento tasa de semillas, 3) control de las reacciones en condiciones alcalinas para inducir la adsorción no específica de PVP.

Algo similar realizó Z Liu y col. [100], al aplicar el método de reducción química, igualmente con el uso de ácido ascórbico, solamente que en esta ocasión se utilizó goma

arábiga como dispersante, sintetizaron estructuras de plata esféricas y monodispersas de tamaño promedio de 1 a 2 μm y de alta densidad.

Ellos variaron la concentración de los reactivos y el pH de la solución. Lo que dio como resultado una variación de tamaño y diferentes distribuciones de tamaño y también se encontró que la morfología de las partículas de plata se podía transformar de una forma esférica a poliedral y la densidad también aumenta al prolongar el tiempo de mezcla de los reactivos (véase Figura 2.6).

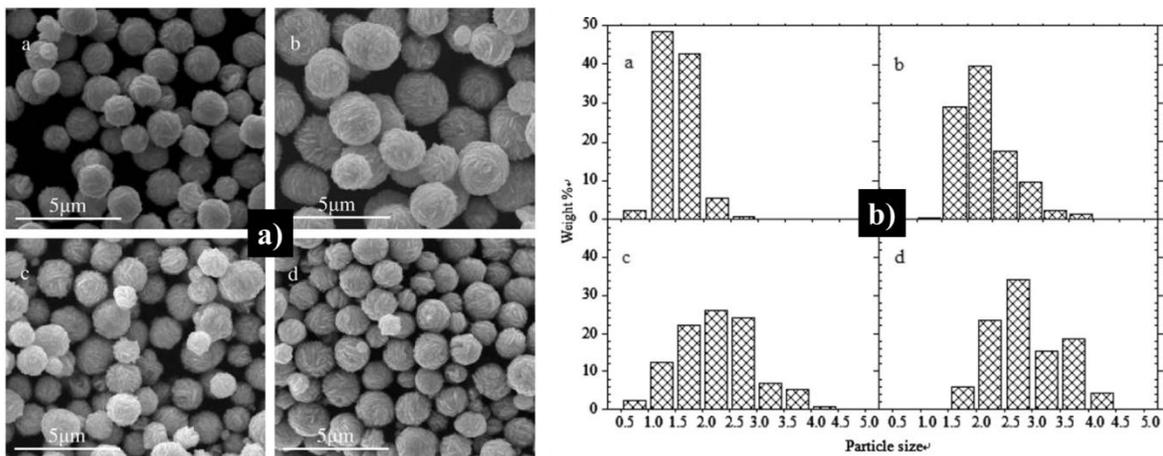


Figura 2.6. Imágenes de SEM de diferentes muestras (a), y el efecto de la variación de la sal de $[\text{AgNO}_3] = 1.45 \text{ mol/L}$, (b) $[\text{AgNO}_3] = 1.55 \text{ mol/L}$, (c) $[\text{AgNO}_3] = 1.65 \text{ mol/L}$, (d) $[\text{AgNO}_3] = 1.75 \text{ mol/L}$ (b) [100].

Se ha observado que algunos parámetros físicos como la agitación y químicos como: pH, la concentración de reactivos y uso de agentes estabilizantes como PVP y goma arábica, influyen de manera importante en la optimización de la síntesis de estructuras esféricas de plata formadas o no con componente nanométricos. Pero un aspecto importante, son la influencia de diferentes compuestos como modificadores de forma. Así como el trabajo realizado por Kang y col. [1], donde demostraron que algunos aminoácidos de diferente naturaleza química, sirven como agentes de dirección para la síntesis de estas microesferas ensambladas por nanoláminas. Llegando a morfologías bien definidas y con superficie limpia.

El método al que recurrieron para la síntesis química fue a través del uso de ácido ascórbico como agente reductor y AgNO_3 como sal precursora. Para ello, primero mezclaron la solución de sal precursora con una pequeña cantidad de algún aminoácido y posteriormente agregaron el agente reductor, llevándose a cabo una reacción rápida. En este método los aminoácidos desempeñan un papel importante en la estructura de las microesferas, en la que los aminoácidos, dependiendo de su naturaleza química y complejidad de las moléculas son agentes de dirección eficientes que ayudan a ensamblar las AgNPs en estructuras complejas. Es así que, demostraron que aminoácidos con estructura molecular simple como glicina y alanina de 2–3 átomos de carbono conlleva a microesferas de Ag más compactas. Mientras que, tanto la glutamina y la asparagina de estructura molecular más compleja y mayor número de átomos de carbono, arrojan microesferas más compactas y grandes pero definidas por estar ensambladas con nanoláminas más delgadas y definidas (Figura 2.7). Con esto creen que los aminoácidos, por su naturaleza química y características estructurales de la molécula, puede cambiar la forma de ensamblaje las NP cuando se absorben en los núcleos de Ag.

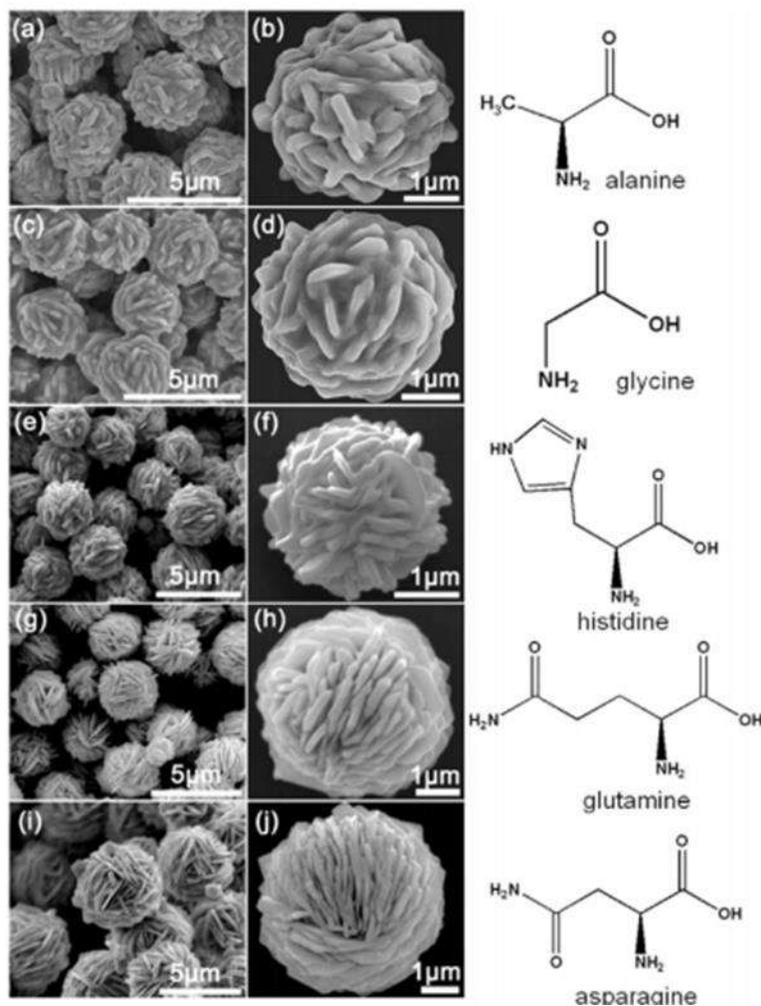


Figura 2.7. Imágenes SEM de estructuras Ag preparadas por la asistencia de cada aminoácido diferente [1].

Se ha demostrado también que estas nanoestructuras de tipo flor pueden ser obtenidas por moléculas simples como la dextrosa. Así, lo demostró Eid y col. [101] al obtener partículas de Ag de tipo flor hueca con bordes ramificados y superficies rugosas y multicapa entre 0.2 y 1.6 μm, con el la utilización de dextrosa como agente reductor y estabilizante, evaluando el efecto en concentración de AgNO₃, NaOH, tricitrato de sodio. Observaron que en función del aumentos de estos componentes anteriores, las estructuras eran de mayor tamaño y definidas a compactas como se ven en la Figura 2.8. También evaluaron la temperatura de reacción 25°C y 70°C, de lo cual no tuvo un efecto significativo sobre el tamaño o la forma de las partículas.

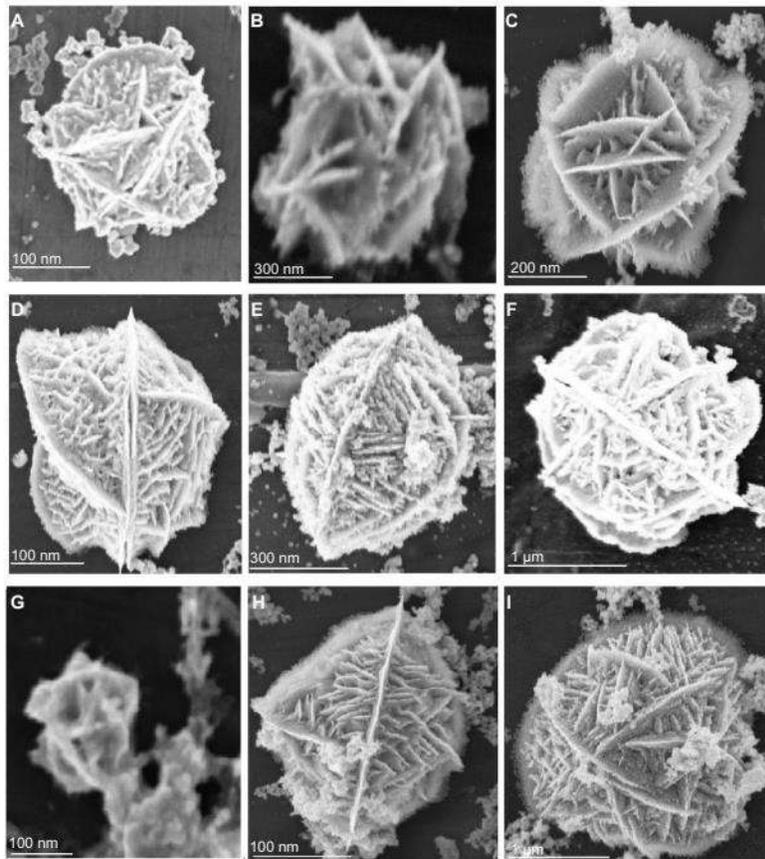


Figura 2.8. Micrografías electrónicas de barrido de nanoestructuras de plata de tipo flor. Variando las concentraciones de AgNO_3 2–8 μM (A–C), dextrosa 3–9 mM (D–F); NaOH 0,1–0,5 mM (G–I) [101].

Molina y col.[102] usando extracto de *Kalanchoe Daigremontiana* sintetizaron AgNPs y, evaluaron el efecto de la temperatura de reacción a 80 °C, sin que produjeran la formación de AgNPs, atribuido a la degradación de los compuestos fitoquímicos de la planta a dicha magnitud de temperatura. Así, lograron sintetizar AgNPs a temperaturas por debajo de 80 °C. Sin embargo, al someterlas a lavados utilizando tolueno y dimetilsulfóxido (DMSO) como solventes descubrieron la formación de partículas microscópicas de plata de tipo flor como las vistas en la Figura 2.9. Estas estructuras de superficie rugosa, se encuentran formadas por unidades nanométricas (AgNPs) ensamblas formando laminas nanométricas. Dicha formación de ensambles, fue atribuida al recubrimiento natural del extracto que fue altamente susceptible en su superficie y potencial electrocinética a los solvente, causando su aglomeración.

De la misma forma que en el trabajo anterior, donde se utilizó la síntesis verde mediante extracto, así lo hizo Jaffar y col. [103] utilizando solución de Carrageenan como agente reductor y estabilizante. Logrando obtener partículas con morfología tipo flor de Ag mediante la utilización de etanol como solvente de lavado. El etanol modificó las propiedades de los estabilizadores induciendo agregación (Figura 2.10).

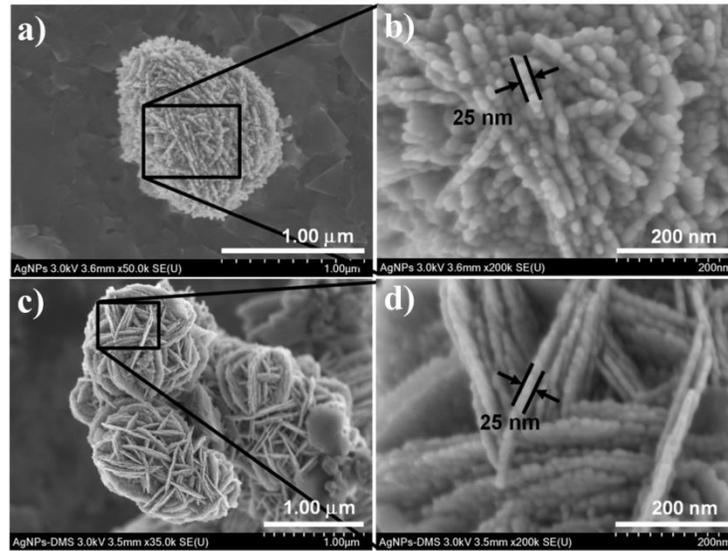


Figura 2.9. Micrografías de nanoflores de Ag obtenidas con medios de lavado con tolueno (a-b) y DMSO (a-d) [9].

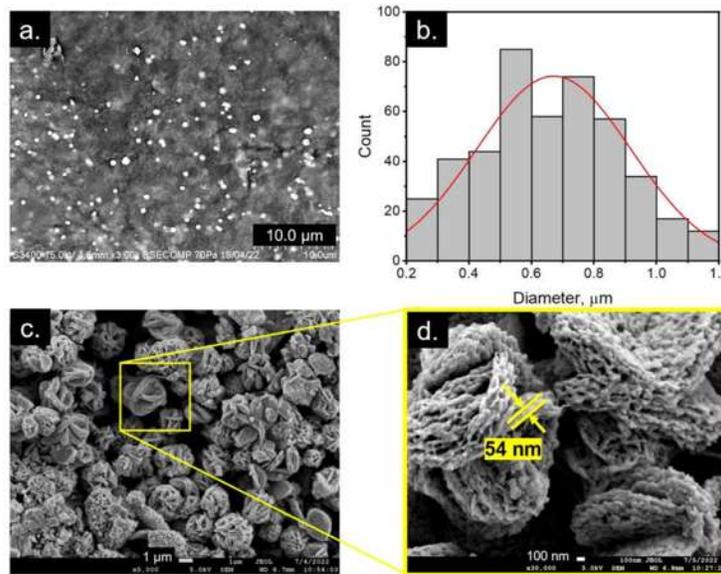


Figura 2.10. Análisis morfológico de AgNPs (a), histograma (b) y partículas de tipo flor obtenidas después de lavado con etanol (c-d) [103].

Por otra parte, bajo ciertas condiciones de reacción se puede lograr la síntesis de nanoensambles de Ag utilizando solamente extracto acuoso de plantas como agente reductor y estabilizante. Así lo demostró Chávez y col. [23], utilizando extracto de la planta de *Hamelia patens* a temperatura ambiente con relación precursor (AgNO_3)-extracto de 10:1 y 12:1. Logrando partículas de plata autoensambladas simplemente variando las concentraciones de las especies participantes en la reducción, atribuyendo su capacidad para ensamblar a los compuestos fitoquímicos de la planta.

Por su parte, González-García y col. [21] a través del fruto de la planta *Arctostaphylos pungens Kunth*, y modificando la concentración de precursor (AgNO_3) sintetizó partículas esféricas con morfología de flor y estructuras fractales a 6 mM y 10 mM (AgNO_3), respectivamente. Dichos resultados fueron atribuidos a que el fruto de la planta además de contener agentes reductores, cuenta con la presencia de agentes de dirección que forman estructuras anisotrópicas en forma de flores y dendríticas de Ag.

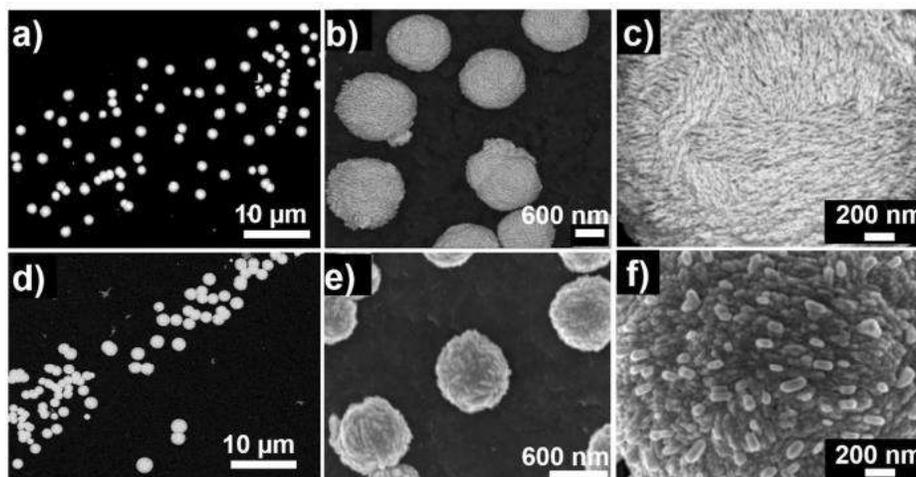


Figura 2.11. Partículas esféricas de Ag, obtenidas a diferentes aumentos para relaciones de volumétrica sal precursora-extracto 10:1 (a-c) y 12:1 (d-f) col. [23].

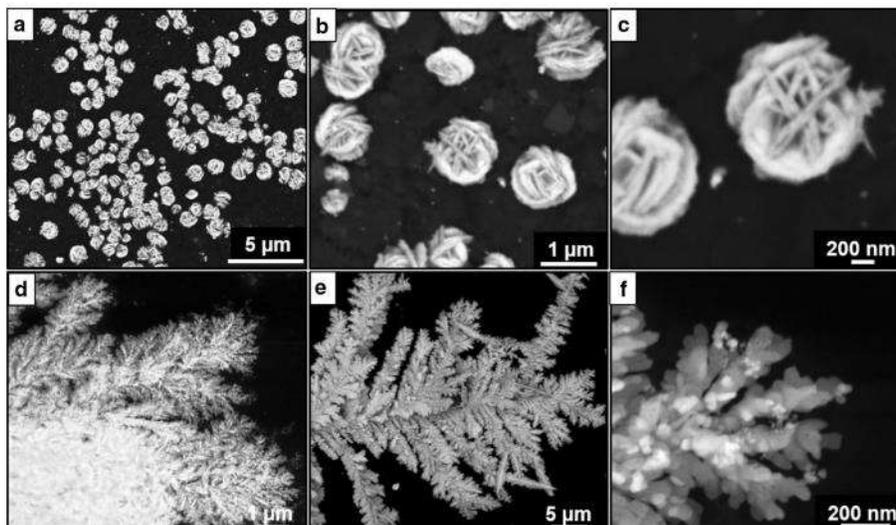


Figura 2.12. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas con diferentes ampliaciones de nanoflores de Ag (a-c) y dendritas de Ag (d-f) [21].

2.9.2 Actividad catalítica en colorantes de AgNEs y AgNPs

Desde hace mucho tiempo industrias como la textil, farmacéutica, alimentaria, plástica, cosmética, tintas, fotográfica y papeleras han utilizado colorantes y desechados a efluentes de agua, contaminando recursos hídricos con colorantes orgánicos e inorgánicos. Su impacto radica al origen estructural de la molécula y origen del tinte, ya que existen colorante ácidos, básicos, dispersos, azoicos, diazoicos, reactivos, complejos metálicos y con base de antraquinona. Muchos al tener origen en la bencidina y naftalina, se convierten en carcinógenos en sistemas biológicos de animales y humanos. Por lo que, el tratamiento de desechos de colorantes es muy importante. Por lo que ha implementado varias estrategias físicas (adsorción, radiación), químicas (oxidación electroquímica) y biológicas (enzimática, aeróbica y anaeróbica) para el tratamiento de estos contaminantes [104]. Un objetivo de la degradación de la molécula de colorante, es reducirla a un componente no tóxico, situación difícil debido a su estructura química que le proporciona alta estabilidad [105]. En las últimas décadas, el uso de nanopartículas como catalizadores en la degradación de tintes orgánicos se ha convertido en una alternativa confiable debido a los beneficios como ser rápida, práctica y económica [106]. Se han utilizado nanopartículas de metales nobles como AgNPs, AuNPs [107], así como nanopartículas de Pt, Pd, ZnO, CuO, Fe₂O₃, TiO₂ [108].

La actividad catalítica en la degradación de colorante, además de NPs, también ha sido evaluada en nanoestructuras ensambladas de morfología de flor. Así, Molina y col. [9] utilizando las nanoestructuras y AgNPs combinadas con NaBH₄. Los resultados sobre el colorante de azul de metileno (MB) mostraron degradación del casi 100 % con un tiempo de degradación de 1.5 a 1 min en la mejor muestra que fueron las estructuras de tipo flor obtenida en la síntesis al ser lavada con tolueno (véase Figura 2.13). Lo que demostraron que las nanoestructuras ensambladas demuestran mejoras en la actividad catalíticas respecto a las AgNPs semiesféricas por si solas. Supusieron, que la causa principal de esta eficiencia es la alta área de superficie rugosa de las estructuras mejora la tasa de transferencia de electrones de superficie.

Por su parte, también Chávez y col. [23] evaluaron la actividad catalizadora de nanoestructuras ensambladas de Ag sin agente reductor extra (NaBH₄), en azul de metileno (MB), naranja de metilo (MO) y rodamina B (RhB). En la Figura 4.14 se muestra los espectros UV-Vis de dicha degradación para los tres colorantes, en donde la mejor degradación la obtuvieron en las nanoestructuras de relación 10:1, ya que éstas presentaba una superficie de mayor rugosidad y porosas con una mejor tasa de degradación y eficiencia del 97.5 % (RhB), 92.5 % (MO) y 98 % (MB) después de 90, 70 y 80 min de reacción, respectivamente.

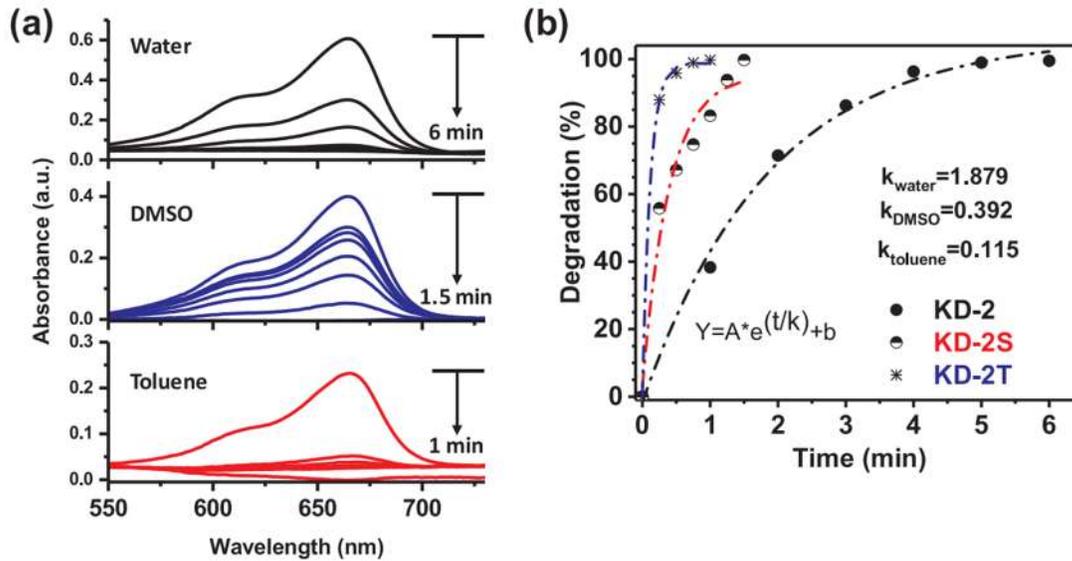


Figura 2.13. (a) Espectros UV-Vis de la degradación fotocatalítica del azul de metileno en presencia de nanoflores de Ag con diferentes disolventes: agua (nanopartículas), DMSO y tolueno y (b) su cinética de degradación [9].

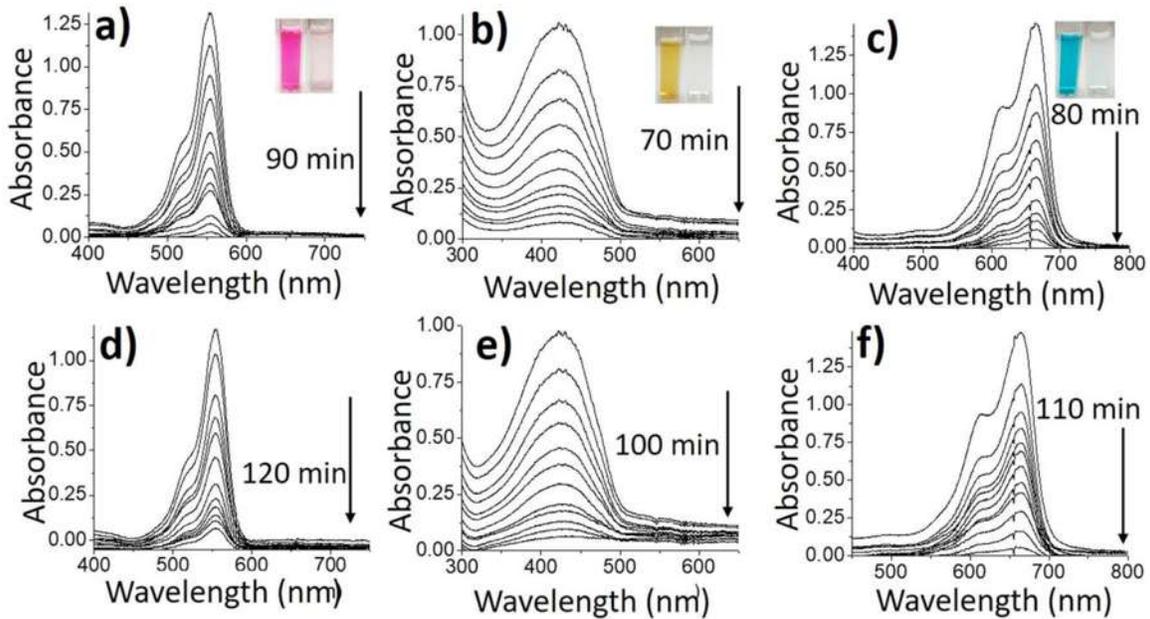


Figura 2.14. Espectros UV-visible de degradación del tinte de las nanoestructuras obtenidas bajo dos proporciones volumétricas, la primera (10:1); (a) RhB, (b) MO y (c) MB. el segundo (12:1); (d) RhB, (d) MO y (f) MB.

Es importante también analizar la actividad catalítica de las NPs por si solas, para ello utilizando residuos de coliflor kadam y col. [109] sintetizaron AgNPs de tamaño promedio de 35 nm y forma esférica que fueron utilizadas para evaluar la degradación catalítica en MB utilizando 5 mg de AgNPs en 50 mL de solución de MB (5 mg/L) (Figura 2.15a). La

eficiencia lograda fue de 97.57 % en un tiempo de 150 min. Además, evaluaron la capacidad de reusabilidad de las AgNPs mediante el uso de estas en varios ciclos de degradación. Resultando que hasta son altamente reutilizables hasta el 4to ciclo. Ya que se sigue alcanzando el total de eficiencia y, solo va aumentando el tiempo para alcanzarla en cada ciclo. Por lo que, dichas AgNPs, presentan eficaz capacidad catalítica en la degradación del colorante MB.

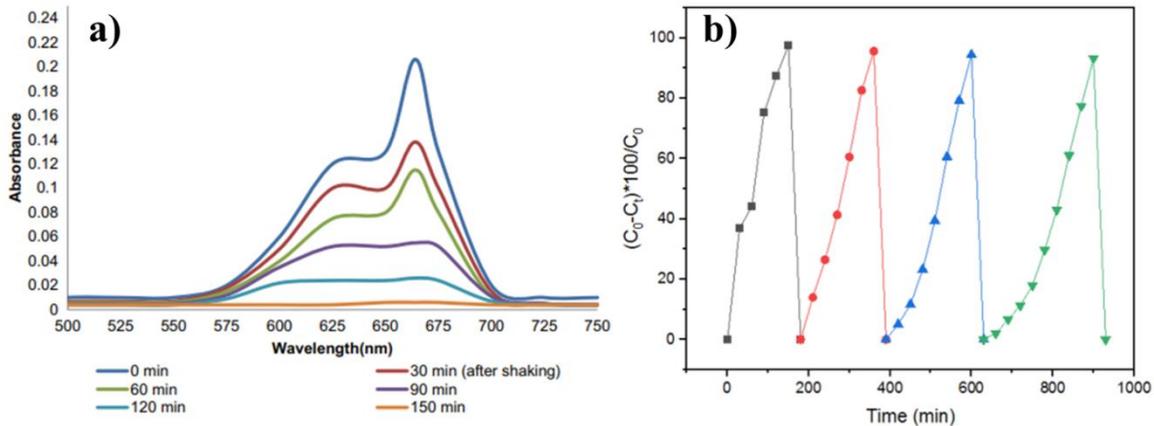


Figura 2.15. Espectros UV-visible de degradación sobre azul de metileno usando AgNPs (a), y gráfico que muestra la reusabilidad de las AgNPs hasta el 4to ciclo [109].

En la literatura existe una gran variedad de trabajos de síntesis verde de AgNPs utilizando extractos de plantas donde evalúan la actividad catalítica. En el trabajo anterior, las AgNPs se evaluaron por sí solas. Sin embargo, esa capacidad la han podido potencializar a través del uso de agentes reductores extras como el NaBH_4 . Chikkanayakanahalli y col. [110] es un ejemplo de ello, al sintetizar AgNPs utilizando las saponinas extraídas del extracto de semillas oleaginosas de *Simarouba glauca*, que posteriormente utilizaron junto con NaBH_4 para la reducción de diferentes colorantes: azul de metileno (MB), naranja de metilo (MO), rojo congo (CR) y 2-cloro 4-nitrofenol (NP). Los resultados sobre MB mostrados en la Figura 2.16, revelan una degradación eficiente en un tiempo de 80 min y una $k=0.0054 \text{ min}^{-1}$. También valoraron la reutilización de las AgNPs por varios ciclos de degradación (Figura 2.17). En cada ciclo recuperaron las AgNPs por centrifugación y, conforme se utilizaba en cada uno de los ciclos la eficiencia disminuía ligeramente, debido a las pérdidas de material catalizador en el proceso de recuperación de cada ciclo ya que no existió modificación en los patrones de DRX ni en el espectro FTIR después del ciclo, lo que confirma la estabilidad de las AgNPs.

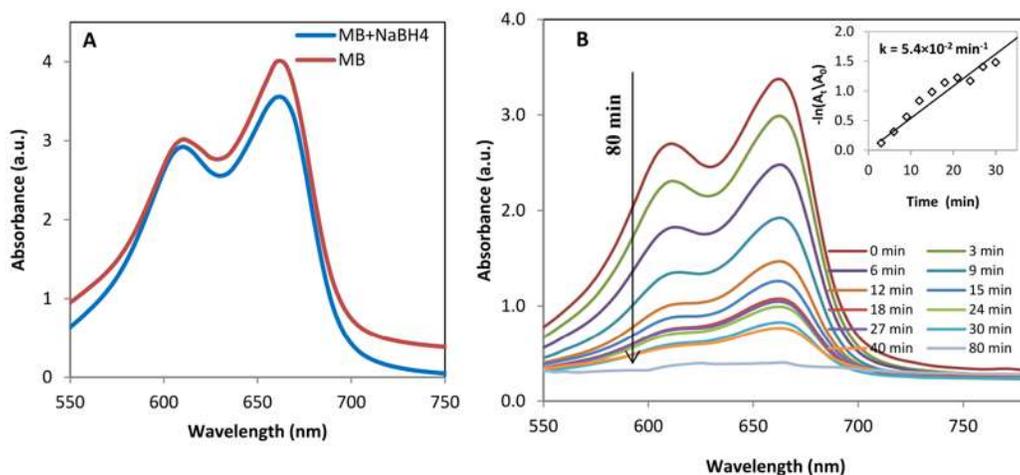


Figura 2.16. Espectros UV-Vis de reducción de azul de metileno en presencia de sólo NaBH₄ y (B), espectros UV-Vis de reducción de azul de metileno en presencia de AgNPs con NaBH₄ [110].

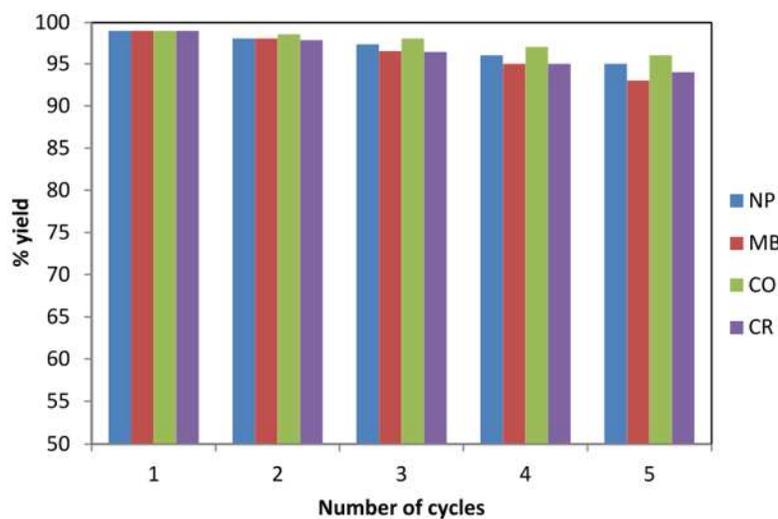


Figura 2.17. Rendimiento de reutilización de AgNPs después de la reducción de colorantes [106].

2.9.3 Actividad antibacterial de AgNEs y AgNPs

En la historia médica se ha visto a través de los años el surgimiento de nuevas infecciones, aunado a la creciente resistencia por parte de agentes bacterianos, por lo cual es motivo suficiente para buscar nuevos agentes antibacterianos, ecológicos, eficientes, irresistibles y seguros [111]. El agente antibacteriano ampliamente utilizado desde la antigüedad ha sido la plata y, debido al creciente surgimiento de la nanotecnología, la investigación de la capacidad antibacteriana de nanomateriales de Ag con propiedades únicas dependientes de su tamaño es un camino evidente para encontrar nueva generación de antibióticos [112-114]. Además, en los últimos tiempos ha llamado la atención el uso de AgNPs biogénicas obtenidas por extractos de planta bajo un enfoque de seguridad biológica. Por lo que, el uso de NPs biogénicas parece una alternativa altamente confiable para la acción antibacterianas [107].

Muchos trabajos han estimado la actividad antibacterial de los nanomateriales de Ag, enfocado principalmente en AgNPs. Sin embargo, la aplicación de nanoestructuras autoensambladas es de interés comparativo para ver las ventajas y desventajas respecto a las AgNPs. Así, González-García y col. [21] a través de nanoestructuras sintetizadas mediante extracto de *tostaphylos pungens Kunth* de morfologías de nanoflores y dendríticas en concentración de 20, 50, 100 y 150 mg/L evaluaron la acción antibacteriana contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus* mediante el método de difusión de disco (Figura 2.18 y tabla 2.2). Sus resultados mostraron zonas de inhibición para ambas morfologías en las dos cepas, indicando efecto actividad antimicrobiana. Sin embargo, las dendríticas fue ligeramente mayor y la cepa *E. coli* más sensible. La concentración mínima inhibitoria (MIC) después de 24 h de una concentración de 5 mg/mL al no presentar turbidez en *E. coli* y has 20 mg/mL en *S. aureus*. Sugieren que el mecanismo de dicha actividad se basa en la adherencia a la membrana bacteriana que impide la permeabilidad de nutrientes a espacios intracelulares y además, la difusión de especies iones de Ag al interior causando daño significativo en interacción con el ADN y proteínas.

K. Chávez y col. [115] a través del extracto de *Hamelia patens* obtuvieron nanoestructuras de Ag tipo flor que permitieron ensayar por zons de inhibición y MIC en *E. coli* y *S. aureus* la actividad antimicrobial a concentraciones de 20, 50, 10, 120 y 150 ppm mostrados en la Figura 2.19. También, al igual que otros trabajos mostraron actividad antibacterial con mejor inhibición en *E. coli* al ser Gram negativas los iones metálicos influyen de mayor manera. Para las nanoflores de Ag se encontró un MIC de 20 ppm para *S. aureus* y 15 ppm en *E. coli*, por lo que presentar una mayor sensibilidad que el anterior trabajo.

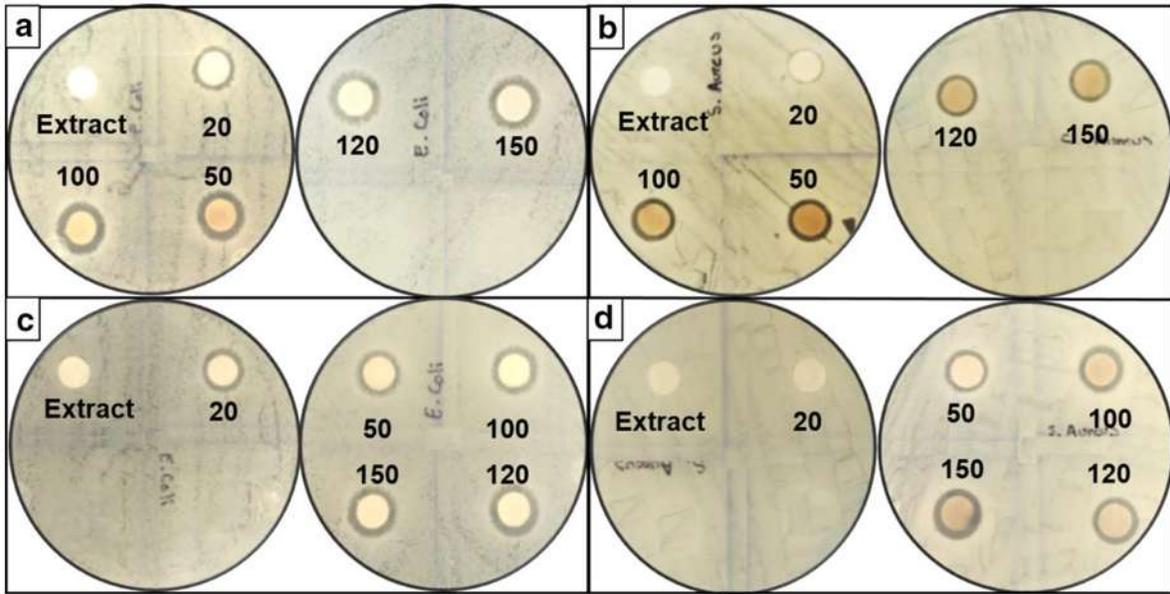


Figura 2.18. Ensayos antibacterial de Ag nanoflores contra *E. coli* (a). *S. aureus* (b). Y dendritas contra *E. coli* (c) y *S. aureus* (d).

Tabla 2.2. Resultados de la actividad antibacteriana de nanoestructuras de Ag frente a *E. coli* y *S. aureus*.

Ag nanoflowers	Zone of inhibition (mm)		Ag dendrites	Zone of inhibition (mm)	
Concentration	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Concentration	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Fruit extract	0	0	Fruit extract	0	0
20 mg/l	8.5	0	20 mg/l	8.3	7.7
50 mg/l	9.5	9	50 mg/l	9.8	10
100 mg/l	10	9	100 mg/l	10.3	10
120 mg/l	10	9	120 mg/l	10.6	10.2
150 mg/l	11	9.5	150 mg/l	11	10.7

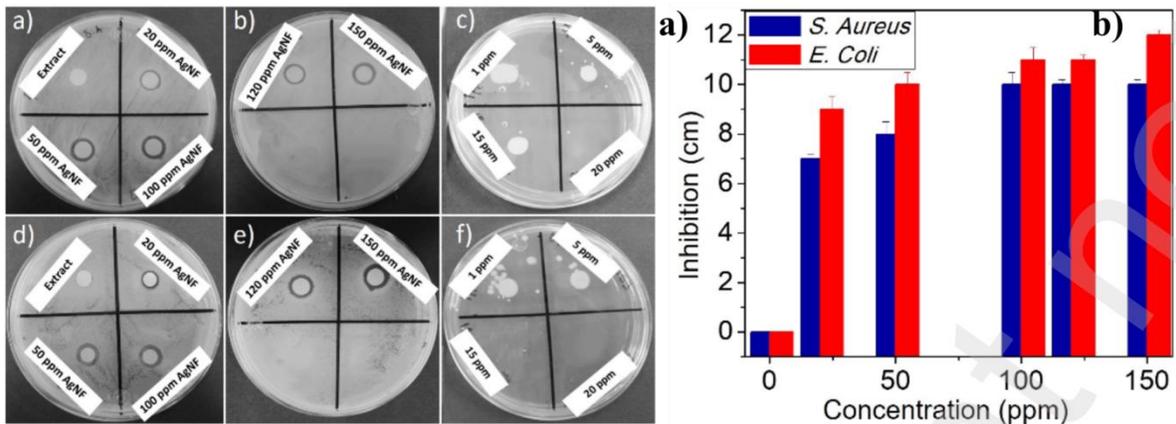


Figura 2.19. Antibiograma de las nanoflores de Ag (a) contra (a-b) *S. aureus*, (c) MIC, (d-e) y *E. Coli*, (f) MIC y gráfico de las zonas de inhibición en función de la concentración.

La Figura 2.20 muestra los resultados obtenidos de la actividad antibacterial en *E. coli* y *S. aureus* utilizando AgNPs ensambladas en forma de flor sintetizados a través del extracto de *carrageenan* [103]. En donde la actividad dependió de la concentración y también, con efecto más evidente en *E. coli* que para *S. aureus*.

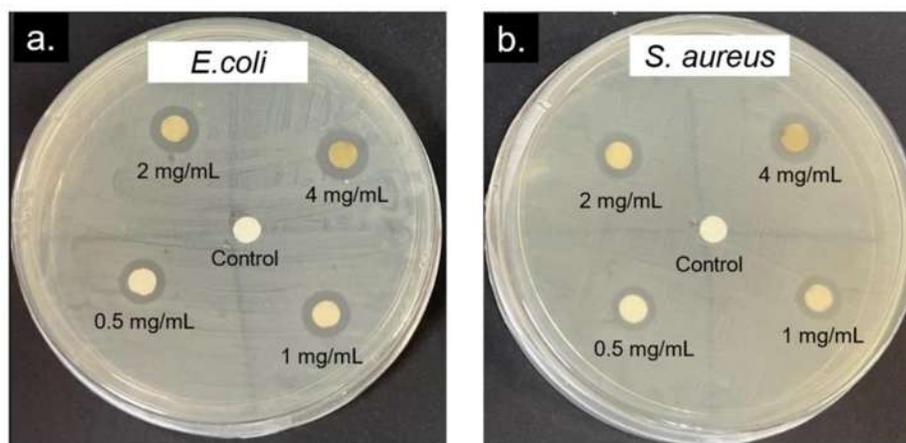


Figura 2.20. Placas representativas del ensayo de difusión en disco de AgNPs en forma de nanoestructuras con una concentración de 0.5–4 mg/mL contra (a) *E. coli* y (b) *S. aureus*.

2.9.4 Actividad citotóxica de AgNEs y AgNPs

Las AgNPs biogénicas se cree que sean las más convenientes para el uso en biomedicina [116], principalmente cuando ya ha sido demostrada el potencial antibacterial de las AgNPs. Por eso, para ser consideradas en el uso de humanos, es de importancia considerar su efecto toxicológico. Aunque, se ha demostrado la citotoxicidad en algunas células específicas, por ejemplo algunas de tipo cancerígenas, aún no tiene con certeza el impacto toxicológico en células eucariota [117].

Kasemets y col. [118] evaluaron la citotoxicidad de AgNPs comerciales con tamaño de 10 y 80 nm y recubiertas con citrato y polietilenimina ramificada respecto a control positivo iónico constituido la solución de AgNO_3 en *S. cerevisiae* (Figura 2. 21). Los resultados del ensayo de citotoxicidad mediante análisis de crecimiento y análisis micrográficos, revelaron la toxicidad dependiente del tamaño de la NP y la carga superficial. En donde las AgNPs de 10 nm presentaron mayor toxicidad. Mientras que, las AgNPs recubiertas con polietilenimina que tiene carga positiva, también mostraron mayor toxicidad debido a la atracción con la pared celular de la levadura con carga negativa. Aunque, en todos los casos se demostró el ingreso de la AgNPs dentro de las células, los estudios de disolución de las AgNPs podrían indicar que ese el principal motivo de la citotoxicidad de las AgNPs.

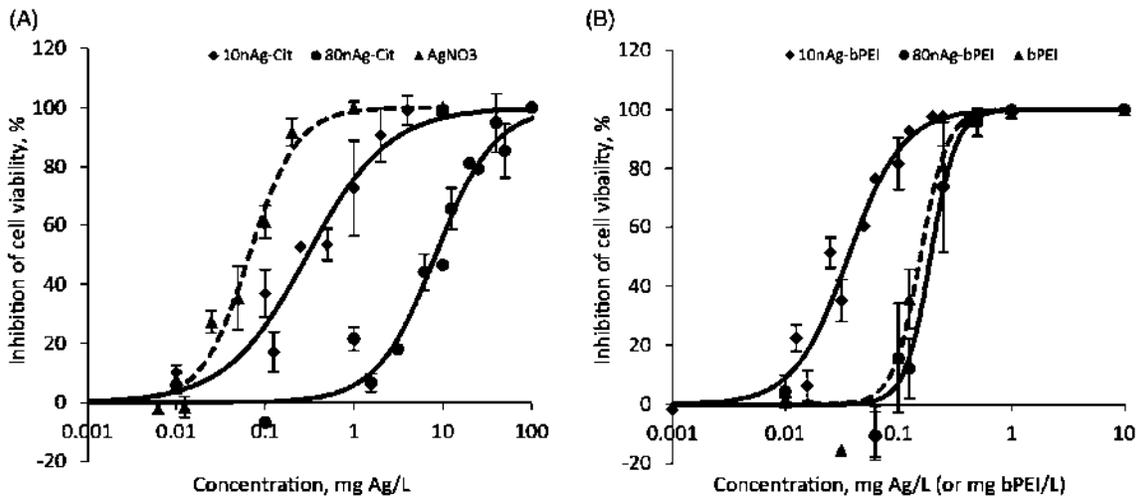


Figura 2.21. Curvas de viabilidad celular dosis-respuesta de *S. cerevisiae* BY4741 expuesta a AgNPs de 10 y 80 nm recubiertas con citrato y AgNO_3 (A) y AgNPs de 10 y 80 nm recubiertos con polietilenimina (B) [118].

Rasmussen y col. [119] desarrollaron un método que es muy útil para la evaluación de citotoxicidad de los nanomateriales en células eucariotas. Para ello, estudiaron la interacción cuantitativa de AgNPs de diferentes tamaños (10, 20 y 40 nm) y su dosificación sobre la levadura *S. cerevisiae* mediante espectrometría de masas de plasma (ICP-MS). Los resultados mostraron que las células de levaduras captan rápidamente las AgNPs y que las proporciones de masa de Ag /célula que se introducían a la células frente a las adsorbidas sobre la superficie eran similares en diferentes tamaño de AgNPs.

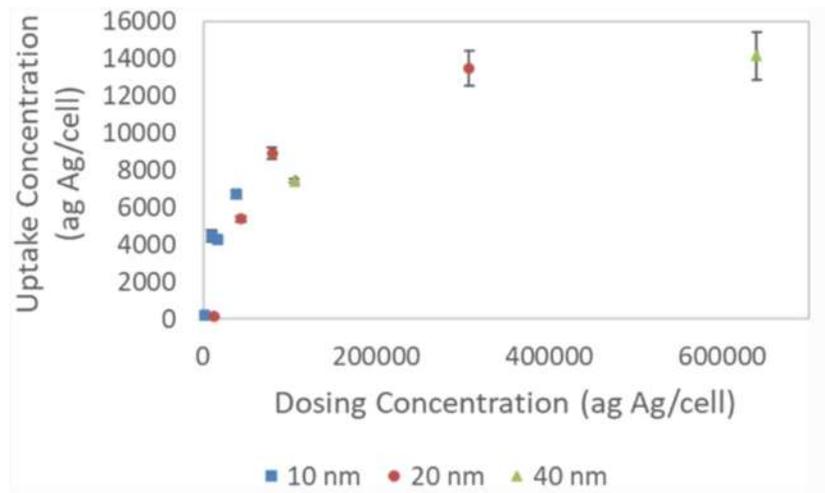


Figura 2.22. Concentración de absorción de AgNPs contra concentración de dosificación Ag Ag/célula en la evaluación de diferentes tamaños de AgNPs.

En cuanto a AgNPs biogénicas de tamaño promedio de 18 nm con morfología esférica y triangular, que fueron obtenidas por extracto de *Lavandula angustifolia*, Villalpando y col

[38] evaluaron la citotoxicidad de estas AgNPs sobre *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* mediante ensayo de crecimiento y ensayo colorimétrico (MTT) (Figura 2.23). En cuanto a los resultados de viabilidad, en este trabajo las AgNPs no presentaron una disminución de crecimiento ni viabilidad significativa en ambas levaduras. Aunque si se verificó que el género *K. marxianus* presenta una mayor resistencia en comparación a *S. cerevisiae*.

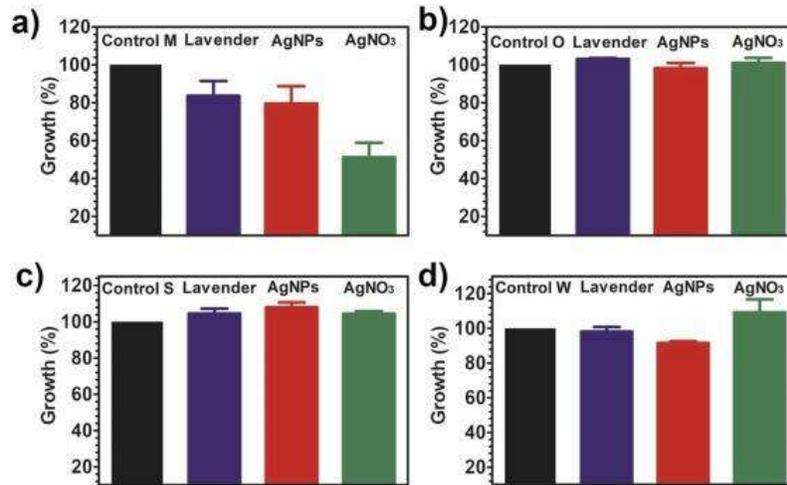


Figura 2.23. Gráficos de barras que muestran los ensayos de crecimientos para las cepas de *S. cerevisiae* (a-b) y *K. marxianus*(c-d) expuestas a AgNPs sintetizadas por extracto de *Lavandula angustifolia*.



CAPÍTULO

3

METODOLOGÍA

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este capítulo describe el proceso experimental llevado a cabo para la obtención de AgNEs y AgNPs mediante síntesis por reducción química verde utilizando como agente reductor y estabilizante el extracto acuoso de la planta de *S. praealtum*, las técnicas por las cuales fueron caracterizadas así como su evaluación de propiedades (antibacterial, citotóxica y fotocatalítica). En la Figura 3.1 muestra el diagrama metodológico general llevado a cabo en este trabajo.

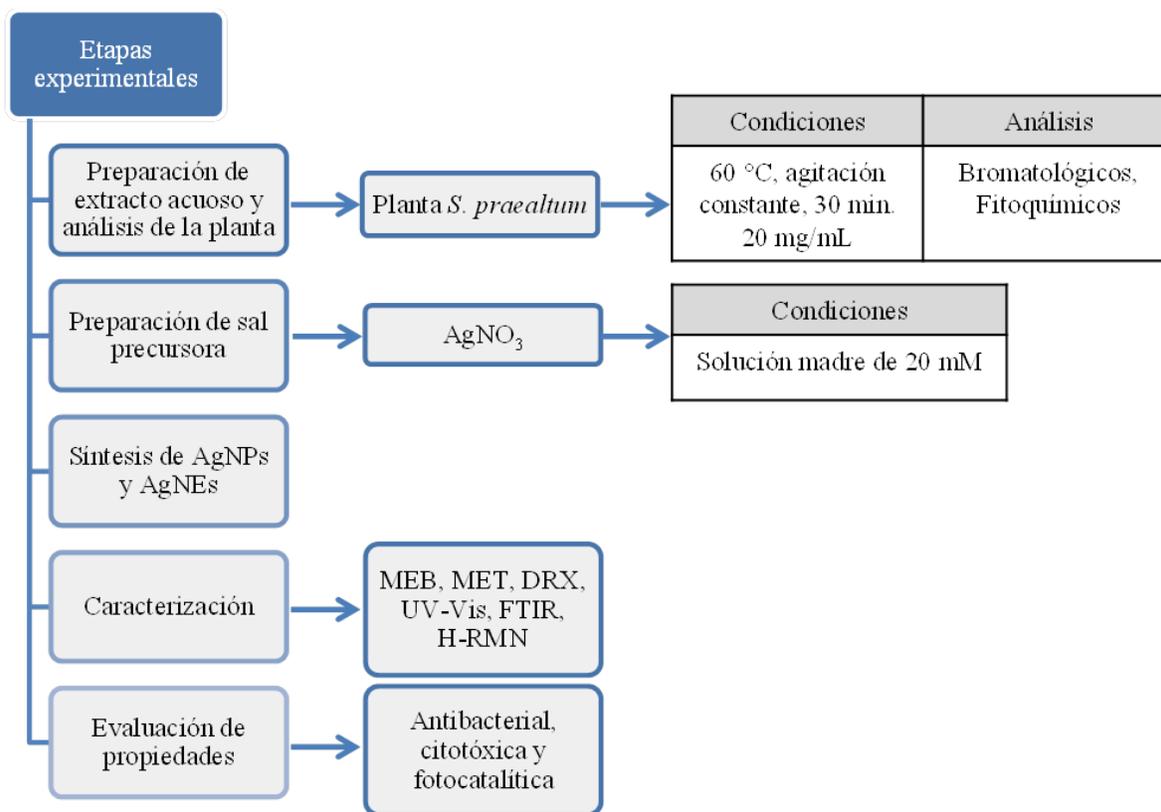


Figura 3.1. Procedimiento general a seguir en el proyecto de investigación.

3.1 Preparación de extracto acuoso y análisis de *S. praealtum*

3.1.1 Adquisición de la planta

Se recurrió a la adquisición de la planta *S. praealtum* de forma seca en un mercado local en la ciudad de Morelia, Michoacán. Una vez adquirida la planta, solo fueron seleccionadas las hojas y se sometieron a un proceso de molienda por maceración mediante un mortero hasta conseguir un polvo fino de tamaño uniforme. La reducción de tamaño de las partículas del

polvo de la hoja de la planta ayudó a una más efectiva lixiviación de los compuestos fitoquímicos de la planta.

3.1.2 Preparación de extracto acuoso de *S. praealtum*

Se preparó extracto acuoso de la planta *S. praealtum* a una concentración de 2 % p/v como solución madre. Para ello, 2 g de polvos de planta anteriormente obtenidos se agregaron en 100 mL de agua desionizada a una temperatura de 60 °C bajo agitación magnética durante 30 min usando un termoagitador marca Termo Scientific. Transcurrido el tiempo se filtró a través de un papel filtro marca Whatman No. 4, con un tamaño de poro promedio entre 20 a 25 μm . El extracto acuoso resultante se dejó enfriar y se almacenó bajo refrigeración en recipiente herméticamente cerrado para su posterior uso.

Se determinó la concentración del extracto de *S. praealtum* en mg/mL mediante la técnica de sólidos disueltos totales por triplicado. Una vez preparado el extracto, se prosiguió a filtrar el material orgánico no disuelto durante la preparación, utilizando un papel filtro de 1.5 μm de tamaño de poro a temperatura ambiente. Posteriormente, los filtros con el material orgánico retenido se colaron en una estufa para secarlos completamente y, una vez secos se prosiguió a pesarlos. El valor de peso obtenido se restó al sólido total utilizado al inicio de la preparación del extracto (2g/100 mL) y se determinó que aproximadamente se consigue una concentración de 20 mg/mL en el extracto.

3.1.3 Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu

El contenido total fenólico del extracto de la planta *S. praealtum* se llevó a cabo por el ensayo colorimétrico usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método está basado en la transferencia de electrones en medio alcalino de moléculas fenólicas hacia complejos fosfolíbdico/fosfotúngstico, pasando de un morado a un azul indicativo de la reacción de óxido-reducción [120]. De acuerdo a lo metodología detallada en [121], se agregaron 100 μL de la muestra de extracto de *S. praealtum* por triplicado en tubos de ensaye, consecutivamente se agregó 400 μL de agua destilada y 300 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu a 2 M y se agitó toda la mezcla en un vortex 10''-15''. Cuando se hallaron homogeneizadas las muestras se le adicionó 1200 μL de Na_2CO_3 (carbonato de sodio) a 0.7 M y se procedió a incubar por 2 h en ausencia de luz bajo temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se evaluó la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro antes mencionado. Los resultados obtenidos se fijaron mediante una curva de calibración realizada a partir de ácido gálico 0.1 mg/mL.

3.1.4 Cuantificación de flavonoides totales

El análisis cuantitativo de flavonoides totales en *S. praealtum* se determinó por reacción con $AlCl_3$, cuantificando mediante la medición de absorbancia de acuerdo con [122]. En el cual la muestra de extracto acuoso diluido con etanol se mezcló con la solución de $AlCl_3$ al 2 % también en etanol. Se dejó reaccionar 1 h y, se midió la absorbancia de la muestra a 420 nm. Las cantidades de flavonoides en el extracto se establecieron de acuerdo a la curva de absorbancia estándar de quercetina y se calcularon dicha cantidad como equivalentes de quercetina (mg/g de extracto).

3.1.5 Análisis proximal y fitoquímico de *S. praealtum*

Con el fin de conocer las características bromatológicas y fitoquímicas en la planta *S. praealtum* y sean base para el entendimiento del proceso de síntesis y crecimiento en la formación de AgNEs. Los ensayos a continuación permitieron realizar un análisis cuantitativo de los principios inmediatos (hidratos de carbono, las proteínas y grasas) y cualitativo de cierto grupo de compuestos presentes en el extracto. La consideración de estos últimos estudios es que su interpretación en su mayoría se reduce a un resultado positivo o negativo, funcionando sólo como indicadores de la presencia de compuestos fitoquímicos en la planta *S. praealtum*.

3.1.5.1 Análisis proximal

Con el fin de conocer más ampliamente la composición de la planta *S. praealtum*, el análisis proximal permitió conocer la presencia de cenizas, humedad, proteínas totales, carbohidratos totales y lípidos totales. La metodología coincidió con la realizada por Razack y col. [123] Silva y col. [19] y Susanto y col. [20].

3.1.5.2 Detección de compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos.

La prueba permitió la determinación de compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos a través de la adición de 0.1 g de planta en 2 mL de agua desionizada y posteriormente, a la mezcla previa se añadió gota a gota una solución de $KMnO_4$ al 2%. Se continuó añadiendo hasta observar el desvanecimiento del color púrpura propio de la solución de $KMnO_4$. La decoloración completa indicaría respuesta positiva.

3.1.5.3 Detección de saponinas

Este método consistió en colocar 1 mL del extracto de la planta en un tubo de ensaye que se le añadió agua caliente, se prosiguió a agitar la solución vigorosamente hasta la formación de espuma. La formación de espuma estable indica que el ensayo fue positivo a saponinas [124].

3.1.5.4 Detección de flavonoides

Para este ensayo llamado prueba de Shinoda se detectan los núcleos benzopirona (flavonoides). Para ello, se emplearon 1 mg del extracto de la planta y 0.5 mL de HCl al 10 % y de inmediato se añadió limadura de Mg, llevándose a cabo la formación de una reacción exotérmica que denota una tonalidad rojiza (pálido oscuro), en este caso la prueba es positiva.

3.1.5.5 Detección de taninos

La presencia de taninos se determinó por este ensayo, el cual consistió en poner en contacto unas gotas de FeCl₃ al 5 % en algunos cuantos miligramos de la muestra del extracto de la planta, donde una tonalidad azul-verdoso indica la presencia de taninos en la muestra a [124, 125].

3.1.5.6 Detección de alcaloides

En éste ensayo se llevó a cabo la preparación de dos disoluciones de manera separada; en primera instancia se disolvieron 1.36 g de HgCl₂ en 60 mL de agua desionizada y seguidamente una en la que se disolverá 5 g de KI en 60 mL. De manera inmediata, ya disueltas de forma separada se procedió a mezclarlas en un matraz aforando a 1000 mL (reactivo de Mayer). De esta solución anterior se agregó cuatro gotas a la muestra del extracto de la planta previamente acidificada con HCl diluido, dando pie a un precipitado. Al adicionarle el reactivo de Mayer a la muestra, si el precipitado es disuelto se considera la presencia de alcaloides en el extracto [124, 126].

3.1.5.7 Detección de compuestos aromáticos

Para esta prueba se preparó una solución con 30 mg de la planta en 1 mL de hexano. Se añadieron dos gotas del reactivo que se preparó al momento, el cual consiste en una gota de formalina (formaldehído al 40 %) en 1 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se agitó ligeramente. Se observó el color del reactivo, cuando pasa de una coloración rosa, naranja,

azul, verde, púrpura y que, con mayor tiempo cambia a un café o negro es positiva a compuestos aromáticos.

3.1.5.8 Detección de monosacáridos por Reactivo de Barfoed.

En el ensayo se preparó el reactivo disolviendo 16.6 g de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ en 245 mL de agua destilada y 2.4 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, se tomaron 2 mL de este y se añadieron 15 mg de extracto de la planta en un tubo de ensaye y se calentó a través de un baño maría por un tiempo de 3 min. Si hay formación de un precipitado amarillo-naranja en los primeros 6 minutos indicará un resultado positivo monosacáridos; si por el contrario aparece después de los 6 minutos es positivo para disacáridos [15].

3.1.5.9 Detección de azúcares reductores

Para esta, se preparó una solución a partir de 0.2 g de la planta, 5 mL de agua desionizada y 5 mL de solución de Benedict. Cuando se produce un precipitado amarillo o amarillo verdoso; se calienta la mezcla hasta su ebullición para posteriormente examinar algún precipitado presente y un color rojo indica la presencia de azúcares reductores [127].

3.1.6 Actividad quelante de extracto de *S. praealtum* mediante iones ferrosos

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad quelante de iones ferrosos en el extracto acuoso *S. praealtum* a través de la formación del complejo Fe(II)-ferrozina. Para ello, se preparó una mezcla (1.5 mL) con 500 μL de extracto acuoso de *S. praealtum* (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg) o como control positivo 500 μL de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0-25 μg), 100 μL de FeCl_2 a 0.6 mM y 900 μL de etanol. La reacción se agita para homogeneizar, para posteriormente dejar reaccionar 5 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, a la mezcla se le agregó 100 μL de Ferrozina (5 mM) dejándola 10 min y para que se formara el complejo Fe(II)-ferrozina. En seguida, se midió la absorbancia respecto a un blanco de etanol a $\lambda=562$ nm. El porcentaje de efecto quelante se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula y se representó en un gráfico efecto vs concentración.

$$\text{Actividad quelante}\% = \left(1 - \frac{\text{Muestra}_{\lambda=562 \text{ nm}}}{\text{Control}_{\lambda=562 \text{ nm}}}\right) * 100 \quad (3.1)$$

3.2 Preparación de sal precursora

La sal precursora se preparó en una solución acuosa de madre de 1 L a una concentración de 20 mM de AgNO_3 ($\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich) utilizando agua desionizada. Finalmente, se almacenó en un frasco ámbar para su uso posterior.

3.3 Síntesis de AgNPs y AgNEs

Para la obtención de los nanomateriales AgNPs y AgNEs, regularmente los ensayos de síntesis se llevaron a cabo en una relación volumétrica 1:1 extracto-sal y, sólo en algunos ensayos se modificó dicha relación con el objetivo de lograr alguna condición experimental de concentración de sal o extracto. Dichas condiciones experimentales se describen a continuación de acuerdo a las variables evaluadas. Cada uno de estos parámetros fueron variadas en función del comportamiento y resultados que se observaron en la síntesis dirigida hacia la optimización de materiales con características homogéneas (tamaño, morfología, estructura, porosidad, etc. de los materiales). Además, debido a que se trata de sistemas nanométricos, estos son inestables y dificulta un modelo experimental preciso. Por lo tanto, para ver de manera más clara posible el efecto de cada una de las variables estudiadas, estas fueron variadas uno a la vez, manteniendo el resto de parámetros constantes.

3.3.1 Síntesis de AgNPs

Las AgNPs se prepararon utilizando el extracto acuoso de *S. praealtum* como agente reductor-estabilizante. En un primer método se obtuvo AgNPs adicionando 5 mL de la solución de AgNO₃ (10 mM) a 5 mL del extracto vegetal a temperatura ambiente (2 % p/v) (20 mg/mL), consiguiendo una concentración final de la mezcla de reacción de 5 mM y 0.5 % p/v (5 mg/mL) de sal-extracto. Dejando reaccionar la mezcla por 1 h, el cambio de color de amarillo a marrón oscuro se obtuvo después de 30 min de reacción indicando la formación de AgNPs.

En una segunda metodología que fue optimizada, se adicionó solución de AgNO₃ (10 mM) en extracto acuoso vegetal (1 % p/v 10 mg/mL) a una temperatura de 60 °C. Se mantuvo bajo agitación constante por 1 h, consiguiendo AgNPs con mejores y homogéneas características (tamaño y morfología). Finalmente, en ambas metodologías las AgNPs formadas se lavaron por centrifugación 3 veces dispersando en agua desionizada para su posterior uso y caracterización.

3.3.2 Síntesis de AgNEs

3.3.2.1 Concentración del extracto

Por otro lado, los AgNEs se obtuvieron de una manera análoga a las AgNPs. Así, partiendo de un extracto acuoso de concentración de 2 % p/v (20 mg/mL), se hicieron las correspondientes diluciones para obtener concentraciones tales como: 10, 5, 2.25 y 1.25 y 0.625 mg/mL y en cada ensayo se agregó la solución de AgNO₃ (20 mM). Las mezclas de

reacción se homogeneizaron manualmente y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente. Finalmente, el sistema se dejó envejecer 24 h, y los productos se lavaron con agua desionizada a 10.000 rpm, repitiendo el procedimiento 3 veces.

3.3.2.2 Concentración de sal precursora (AgNO_3)

De la misma manera que la concentración de la planta, se partió de una disolución madre de 20 mM de AgNO_3 y a partir de esta se realizaron correspondientes diluciones a 10, 8, 6, 5, 4 y 3 mM. Se mantuvo constante la concentración de planta a 10 mg/mL y temperatura para poder observar la influencia de la concentración de iones metálicos en el sistema de reacción de síntesis de AgNEs. Una vez envejecido el sistema por 24 h los productos de reacción se lavaron con agua desionizada a 10.000 rpm, repitiendo el procedimiento 3 veces.

3.3.2.3 Temperatura y agitación

Con el objetivo de observar el efecto de la temperatura y la agitación sobre la síntesis de AgNEs, se sintetizaron AgNEs mezclando solución acuosa de AgNO_3 (20 mM) a extracto de planta (5 mg/mL) con temperatura previamente ajustada a valores de temperatura: temperatura ambiente ($T \sim 22^\circ\text{C}$), 60 y 80 $^\circ\text{C}$. Una vez agregada la sal, se homogeneizó la mezcla de reacción y se dejó reaccionar bajo reposo por 1 h bajo dicha temperatura. Finalmente, se dejó envejecer el sistema por 24 h para su correspondiente caracterización.

3.4 Caracterización

3.4.1 Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-Vis)

Los espectros ultravioleta-visible (UV-Vis) se midieron utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 25 y una celda de cuarzo a temperatura ambiente. Mediante esta técnica se lograba conocer de forma rápida la formación de AgNPs y AgNEs, al observar las bandas características de absorción debidas a la resonancia del plasmón de superficie de la plata metálica y con ello proporcionar información de la distribución de tamaño y las formas de las partículas [128].

3.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (MET)

La morfología y distribución de las partículas se determinaron utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL modelo JSM-7600F que incluía un análisis de espectrómetro de dispersión de energía (EDS). Finalmente, también se registraron

micrografías de microscopio electrónico de transmisión (TEM) en un instrumento Phillips Tecnai F20.

3.4.3 Difracción de Rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron en un equipo Bruker D8 Advance DAVINCI (ojo de lince) utilizando radiación Cu K α ($\lambda_{K\alpha}=0.1542$ nm). Mediante esta técnica de polvos se realizaron los análisis estructurales de las partículas de plata. También permitió la estimación del tamaño promedio del cristalito de las nanoestructuras mediante la ecuación de Debye Scherrer's. Dicho dato es comparado con los hallazgos en las microscopías electrónicas.

3.4.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización de las nanoestructuras por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se obtuvo en un espectrómetro infrarrojo Bruker Tensor 27 con un rango de 4000–400 cm^{-1} y una resolución de 1 cm^{-1} . Las muestras fueron analizadas por el método de disco de bromuro de potasio (KBr). Los espectros infrarrojos permitieron identificar grupos funcionales de moléculas orgánicas presentes en el extracto de *S. praealtum* y que intervienen en el proceso de síntesis y estabilización de las nanoestructuras de plata.

3.4.5 Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN) se midieron a 400 MHz en un espectrómetro Varian Mercury 400 a partir de soluciones de tetrametilsilano en DMSO- d_6 como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico se expresan en partes por millón. Al ser una herramienta valiosa para los estudios de metabolitos naturales, se logró identificar de manera más clara grupos fitoquímicos presentes en el extracto *S. praealtum* y principales posibles participantes en la síntesis y estabilización de nanoestructuras metálicas.

3.5 Evaluación de propiedades de las nanoestructuras de plata

3.5.1 Antibacterial

La plata es conocida desde hace mucho tiempo por poseer excelente capacidad antibacterial y, actualmente existe una gran cantidad de investigaciones que evalúan esta propiedad en nanomateriales de plata [21, 111, 129]. La propiedad antibacterial de AgNEs y AgNPs se evaluó mediante el método Kirby Bauer de susceptibilidad por difusión en discos en bacterias de tipo Gram-positivo y Gram-negativo, *S. aureus* (ATCC 25922) y *E. coli*

(ATCC 25922), respectivamente. El cual consiste en impregnar discos de papel con una concentración conocida de agente antimicrobiano y se colocan sobre una superficie de agar que previamente se ha inoculado con el microorganismo en cuestión. El efecto se observa por formación y tamaño de una zona de inhibición de crecimiento bacteriano provocada por la difusión del antimicrobiano, desde el disco hacia el medio de acuerdo con la concentración utilizada. El tamaño de la zona de inhibición se relaciona con la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para ello, se prepararon y esterilizaron el medio de cultivo Muller-Hinton y material biológico respectivo. El medio se vertió a las correspondientes cajas de Petri. La densidad óptica o turbidez de cada cultivo bacteriano se ajustó al estándar de Mc Farland 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y se sembró en cada una de las cajas por duplicado. Posteriormente, en circunstancias estériles se impregnaron discos de papel filtro de 5 mm con concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g/mL}$, tanto de AgNEs como de AgNPs y se expusieron en los cultivos bacterianos. Finalmente, se incubaron a 35 °C por 24 h y se midieron las zonas producidas de inhibición.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó mediante el ensayo de microdilución en caldo. En el cual, se tomó 1 mL de un tubo de ensaye con inóculo estandarizado bajo la escala de Mc Farland y se agregó a cada uno de los tubos que contenían 1 mL de caldo de cultivo con las concentraciones evaluadas de AgNPs y AgNEs a 200, 250, 300, 350 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Los tubos conteniendo 2 mL se incubaron por 24 h a 37 °C. Después de este tiempo, se tomaron 100 μL de las muestras con nula turbidez y se depositaron sobre una caja Petri estéril con agar y se incubaron a las mismas condiciones. La ausencia de crecimiento bacteriano en alguna concentración, correspondería al valor de la MIC.

3.5.2 Propiedad catalítica en la degradación de colorantes

Se investigó la degradación catalítica de MB a una concentración de 0,003 mM por AgNPs y AgNEs realizada bajo luz visible. Además, se estudió el efecto de la actividad catalítica de los nanomateriales de plata añadiendo NaBH_4 como agente reductor auxiliar. Por lo tanto, se mezclaron 0.5 mg de AgNPs y 0.5 mg de AgNEs con 2,5 ml de colorante MB con y sin NaBH_4 (5 mM). Mediante espectroscopía UV-Vis (espectrofotómetro Lambda 25 Perkin Elmer) se monitoreó la tasa de degradación. En el caso de las AgNPs, los experimentos de degradación se realizaron en función de la cantidad, utilizando 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 mg. Además, se llevaron a cabo experimentos de reciclaje de catalizadores en 5 ciclos con una cantidad constante de 1.5 mg de AgNPs.

3.5.3 Actividad biológica y citotoxicidad

3.5.3.1 Determinación de curvas de crecimiento celular de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la construcción de la curva de crecimiento se preparó el medio de cultivo YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, dextrosa al 2%). Los medios y el material a utilizar, se esterilizaron mediante autoclave a 121 °C y 15 psi por 20 min. Se prepararon los cultivos iniciadores en dos tubos con 9 mL de medio YPD, los cuales se inocularon con un asa bacteriológica, incubando bajo agitación orbital a 180 rpm y 30 °C para su crecimiento por 24 h. Pasado este periodo de tiempo, se agregó 5 mL de los cultivos iniciadores a 4 matraces con medio YPD y se prosiguió a leer la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 18 UV-Vis cada 2 h por 12 h y una lectura final a las 24 h. Finalmente, para la determinación de la curva y los parámetros de crecimiento se utilizó el modelo matemático para el crecimiento de Gompertz mediante el software Graphpad prims 8.01.

3.5.3.2 Inhibición de crecimiento en levadura

Como modelo de estudio para células eucariotas, la cepa de levadura *S. cerevisiae* W303-1 se cultivó en un medio acuoso que contenía AgNPs y AgNEs. En tubos que contenían 10 mL de medio YPD (levadura peptona dextrosa), se añadió 1 mL de glucosa al 20% masa/volumen, mezclado con 200 µL de preinóculo de cepa de levadura. La concentración de las AgNPs y AgNEs varió con la concentración más alta que se pudo lograr obtener (200 µg/mL). Una vez evaluada estas pruebas preliminares, se prosiguió a seleccionar y evaluar de manera detallada la mejor muestra (AgNPs) de la siguiente manera: 20, 40, 60, 80, 100 y 200 µg/mL. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las mezclas se incubaron durante 24 h a 30 °C con agitación mecánica [120 revoluciones por minuto (rpm)]. El porcentaje de disminución del crecimiento de microorganismos se determinó por turbidimetría, midiendo su densidad óptica en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 18 UV-Vis a 625 nm. El control consistió únicamente en el medio y la levadura.

3.5.3.3 Ensayo de viabilidad celular mediante azul de Tripano

Conocida el efecto de inhibición de crecimiento de levaduras por parte de los nanomateriales, se prosiguió a realizar el ensayo de viabilidad celular utilizando azul de Tripano que permite identificar células vivas y muertas. Esto con el fin de conocer si los nanomateriales presentan efecto citotóxico sobre la levadura *S. cerevisiae*. Para ello, se preparó una solución stock de azul de Tripano 1:1, añadiendo 1 mL de colorante al 0.4 % en 1 mL de búfer PBS (solución salina tamponada con fosfato a pH 7.4). La suspensión de

células de levadura después de la exposición a AgNPs durante 24 h, se obtuvo por centrifugación a 100*g por 5 min y suspensión en PBS. Posteriormente, se tomó 100 µL de la solución stock del colorante y se agregaron en 100 µL de la suspensión de células de levadura. La mezcla del colorante y las células se dejó reposar durante 3 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, una gota de la mezcla fue agregada a un hemocitómetro para ser observada en un microscopio óptico. Se registraron imágenes de cada muestra y se realizó el conteo de células viables (no teñidas) y células no viables o muertas (teñidas de azul). La viabilidad se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células viables} = \frac{\text{Número total de células viables}}{\text{Número total de células}} * 100 \quad (3.2)$$

3.5.3.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Las levaduras en medio YPD fueron expuestas a AgNPs a diferentes concentraciones (0, 50, 150 y 250 µg/mL) durante 24 h. La concentración de levadura se ajustó a 1x10⁵ células/mL. Después del contacto de las levaduras con las AgNPs, se lavaron dos veces (5100 RPM, 4 °C durante 5 min) en PBS frío. Posteriormente, se incubaron en la oscuridad durante 30 min a 37 °C utilizando 2 mL de medio de oximetría que contenía diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) 12,5 µM 2'-7'. Finalmente, se estimó la generación de ROS en un espectrofotómetro Shimadzu; modelo RF-5301pc, midiendo la intensidad de diclorofluoresceína (DCFH-DA) a longitudes de onda de excitación y emisión de 491 nm y 518 nm, respectivamente. Todas las muestras se realizaron por triplicado.



CAPÍTULO

4

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez definida la metodología llevada a cabo para esta investigación, en este apartado se presenta y analizan los resultados obtenidos al estudiar el proceso de síntesis de AgNPs y autoensamblaje de AgNEs. Describiendo el efecto de cada una de las variaciones empleadas en la síntesis de AgNEs respecto a sus características químicas, estructurales y morfológicas, así como el estudio de los mecanismos de formación propuestos en estas nanoestructuras. Todo lo anterior, mediante técnicas de caracterización química, estructural y morfológica. Además, se evaluaron propiedades de las nanoestructuras en aplicaciones tales como antibacteriales, fotocatalíticas y citotóxicas.

4.1 Análisis fitoquímicos del extracto y la planta *S. praealtum*

4.1.1 Análisis proximal

El análisis proximal de las hojas secas de *S. praealtum* se presenta en la tabla 4.1. Los datos expuestos de forma porcentual, muestran que las hojas de *S. praealtum* contienen un porcentaje más alto de carbohidratos (42.39 %), seguido de fibra cruda (19.63 %), cenizas (17.67 %), humedad (10.00 %) y grasa (6.47 %). Esto quiere decir que, casi el 50 % total de las hojas de la planta utilizada para el extracto la constituyen carbohidratos totales. Este grupo de compuesto tiene gran importancia estructural y funcional en la planta, así como para su aprovechamiento en dieta por su alto contenido energético y materia primera en la industria en la producción de diferentes productos como biocombustibles, bebidas alcohólicas, etc. [130, 131]. Además, en este grupo se incluyen los llamado azúcares reductores, a los que se atribuyen propiedades antioxidantes y son usados en algunas investigaciones como agentes reductores importantes [132, 133]. Por otro lado, otros autores han determinado el contenido proximal de diferentes extractos de plantas (*Eragrostis Teff Straw* [134], *Carduus edelbergii Rech.f* [130]) y hongo (*Pleurotus florida* [135]) que fueron utilizados para en la síntesis verde de nanomateriales. En estos últimos, el contenido más alto, regularmente se presenta de proteína y fibra cruda. Así, la composición de *S. praealtum* parece ofrecer ventajas fitoquímicas para ser aplicado en la síntesis verde de nanomateriales.

Tabla 4.1. Análisis proximal de las hojas secas de la planta *S. praealtum*.

Parte de la planta	Humedad (%)	Materia seca (%)	Grasa (%)	Cenizas y minerales (%)	Proteína cruda (%)	Fibra cruda (%)	Carbohidratos (%)
Hojas	10.00	90.00	6.47	17.67	3.84	19.63	42.39

4.1.2 Análisis fitoquímicos

La tabla 4.2 se muestran los resultados de las pruebas fitoquímicas cualitativas hechas al extracto de *S. praealtum* que buscaron la presencia de compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos, saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides, aromáticos, monosacáridos y azúcares reductores. Estos mismos resultados se presentan de manera visual en la Figura 4.1.

Las plantas de tipo medicinales contienen fitoconstituyentes de los cuales incluyen flavonoides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, saponinas, carbohidratos, aminoácidos, entre otros que son responsables de las características fisiológicas y terapéuticas de las plantas [130, 136]. Muchos de estos compuestos también son considerados los responsables de la síntesis verde [137]. Los resultados fitoquímicos demostraron que, de la forma seca de la planta *S. praealtum* y preparada como extracto acuoso, permite la extracción de compuestos aromáticos, algunos con enlaces etilénicos y acetilénicos, saponinas y azúcares reductores. Por lo que, existe la posibilidad de que algún grupo dentro de estos compuestos, sean los responsables de forma única o conjunta, de síntesis y ensamblaje de los AgNEs.

Tabla 4.2. Análisis fitoquímicos del extracto de *S. praealtum*.

Fitoquímico	Resultado
Compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos	Positivo
Saponinas	Positivo
Flavonoides	Negativo
Taninos	Negativo
Alcaloides	Negativo
Aromáticos	Positivo
Monosacáridos	Negativo
Azúcares reductores	Positivo

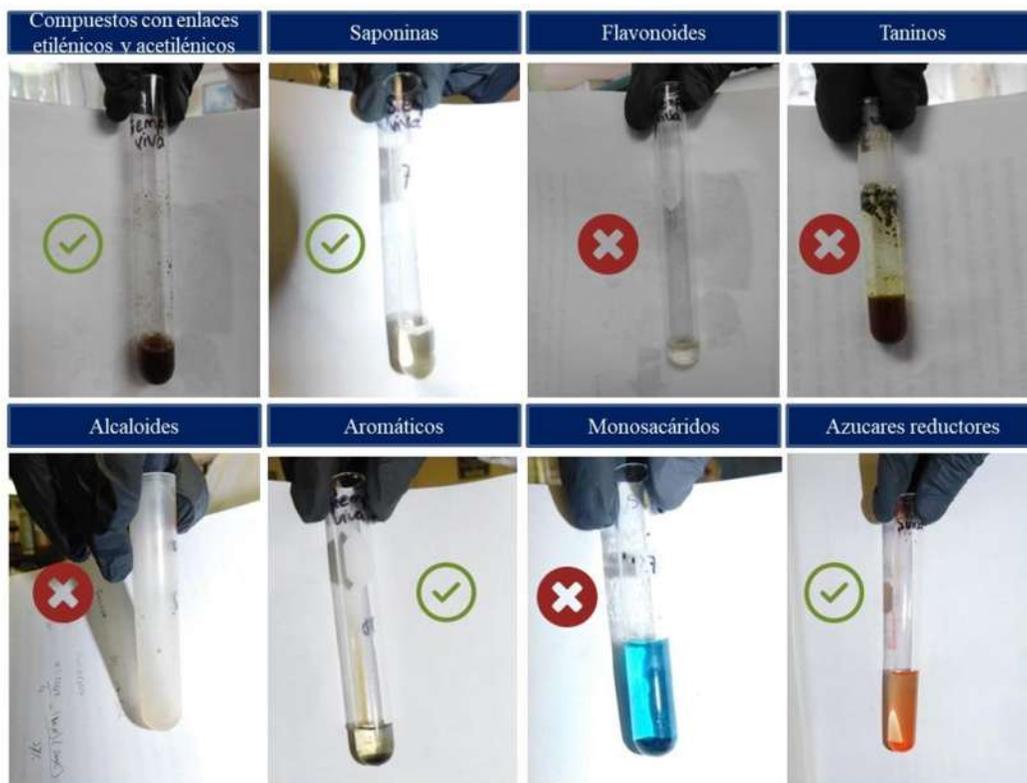


Figura 4.1. Pruebas cualitativa para la identificación de fitoconstituyentes de la planta y extracto de *S. praealtum*.

4.2 Síntesis de AgNEs mediante el extracto acuoso de *Sedum praealtum*

4.2.1 Evidencia en el cambio de color

La Figura 4.2(a-d) muestra, de izquierda a derecha, el extracto acuoso de *S. praealtum* que se compara con los respectivos cambios de color a través del tiempo de la reacción típica de síntesis de AgNEs bajo 3 diferentes condiciones de síntesis. En la reacción, el color amarillo claro evoluciona a un café oscuro muy cercano a negro conforme avanza la bioreducción de iones de plata. Dependiendo de las condiciones experimentales, la reacción evoluciona a diferentes velocidades y, el color oscuro-negro se llegó a alcanzar en algunos casos de manera rápida en 5 min o en algunos otros inclusive a los 30 min. Debido a que el cambio de color en la síntesis verde de nanopartículas metálicas, es un indicativo preliminar confiable que revela la formación de nanopartículas y ha sido reportado en una variedad de investigaciones [138, 139]. Dicho cambio demuestra la capacidad de la planta *S. praealtum* para la síntesis verde.

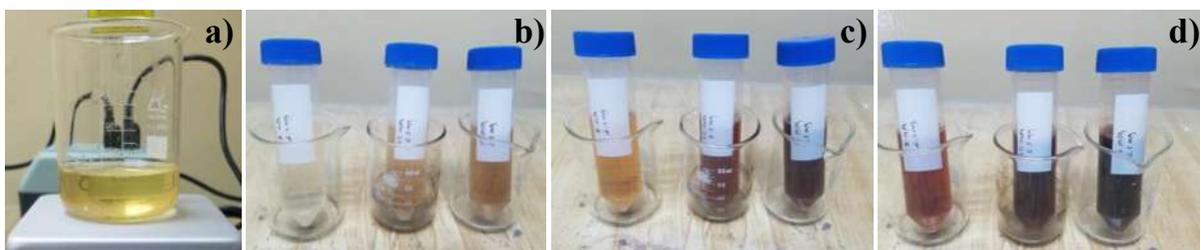


Figura 4.2. Extracto acuoso de *S. praealtum* (a) y cambio de coloración de acuerdo a la evolución reacciones de síntesis de AgNEs utilizando *S. praealtum* (b-d).

4.2.2 Efecto de la concentración del extracto *Sedum praealtum*

La Figura 4.3 muestra los espectros de absorción de los AgNEs obtenidos después de 24 h de reacción en función de la concentración de extracto de *S. praealtum* (0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL) utilizando una solución de sal precursora constante AgNO_3 (10 mM). En los espectros aparece el pico de absorción máximo a 435 nm, típico de la resonancia del plasmon superficial (RPS) de plata nanométrica [140]. El aspecto de la banda es ancho en todos los casos y, la intensidad de absorbancia aumenta en relación con el incremento de la concentración de extracto. Sin embargo, a la concentración de 10 mg/mL, se tiene una disminución de intensidad y la presencia de un segundo pico en 350 nm el cual, en base a la literatura, se sugiere se trate de una respuesta plasmónica de crecimiento de la plata nanométrica en relación a su aspecto longitudinal. Por lo tanto, una concentración alta de extracto parece dar paso a una mayor reducción de iones Ag y con ello, un crecimiento de la plata nanométrica, consolidando a los AgNEs en partículas que han tenido en algún grado un crecimiento unidimensional (1D) dentro de su estructura [14, 15]. Además, también no se descarta que la segunda señal a 350 nm se atribuye a compuestos con grupo carboxilato [141, 142]. Ya que el pico de carboxilato aparece debido a la deslocalización de electrones en la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos carbonilo. Lo que podría indicar la interacción de este grupo con la plata nanométrica al respecto de su estabilización.

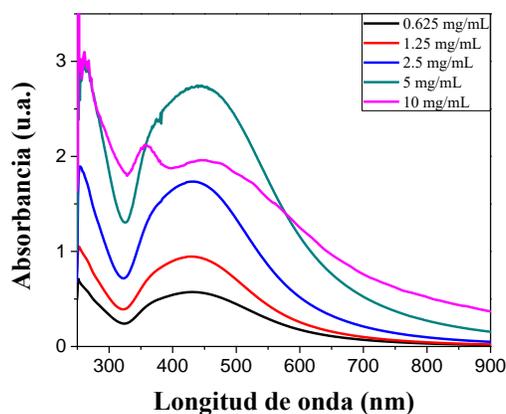


Figura 4.3. Espectros UV-Vis de las variación de la concentración del extracto *S. praealtum*.

Las micrografías de MEB de las AgNEs obtenidas en función de la concentración del extracto, se presentan en la Figura 4.4(a-e). En estas, se observa una distribución homogénea de esferas en cada condición. Mientras que, en las micrografías de mayor aumento, los AgNEs sobresalen como microestructuras esféricas jerárquicas con diferentes tamaños y rugosidad superficial. Así, parecen ser formadas por partículas ensambladas y orientadas de manera aleatoria, formando una especie de nanopétalos que difieren en sus características de acuerdo a la cantidad de extracto, obteniendo una morfología parecida a estambres. A medida que la concentración de planta aumenta, la separación entre cada pétalo se reduce produciendo AgNEs mayormente compactas. Además, el tamaño de la partícula oscila entre 2.5 μm (0.625 y 1.25 mg/mL), 6 μm (2.5 mg/mL), 3 μm (5 mg/mL) y 1.5 μm (10 mg/mL). La diferencia de morfología y tamaño en función del extracto es atribuido al crecimiento descontrolado como consecuencia de exceso de iones de Ag reducidos y cantidad de agentes estabilizantes-ligantes como lo señala el trabajo realizado por Karina y col. [23]. Que se adhieren posiblemente, de manera más lenta y rápida en altas concentraciones, respectivamente. Además, el análisis químico elemental EDS (Figura 4.5), confirmó que las estructuras se componen enteramente de Ag.

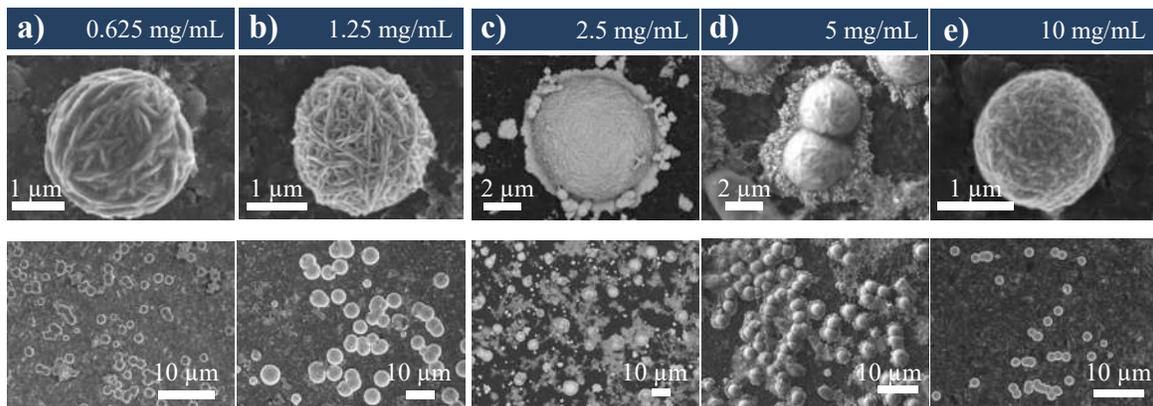


Figura 4.4. Micrografías (MEB) de AgNEs obtenidos a diferentes concentraciones de extracto acuoso de *S. praealtum*: a) 0.625, b) 1.25, c) 2.5, d) 5, e) 10 mg/mL.

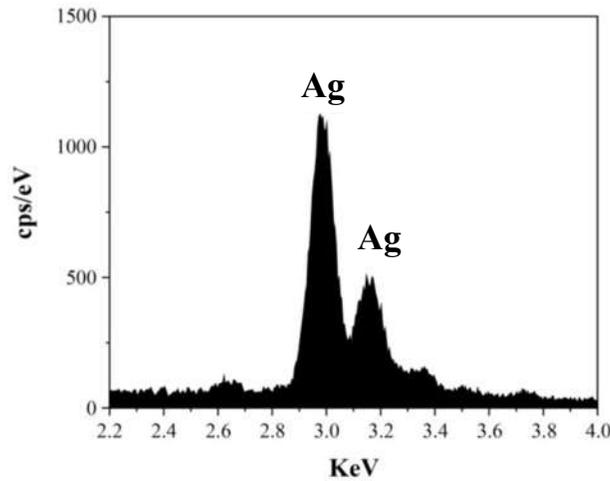


Figura 4.5. Análisis químico elemental EDS de los AgNEs.

Los productos se caracterizaron estructuralmente mediante DRX con el fin de determinar su naturaleza cristalina. La Figura 4.5 revela el patrón de difracción de la muestra de 10 mg/ μ L y 10 mM (AgNO_3), donde las reflexiones aparecen a 38° , 44° , 64° , 77° y 82° ángulos que se indexan a los planos de la plata (111), (200), (220), (311) y (222) respectivamente y que indican una estructura fcc típica de la plata cristalina [JCPDS 04-0783]. Los picos tienen una forma estrecha y aguda, lo que indican la existencia de un alto grado de cristalinidad. Sin embargo, algunos otros manifiestan la existencia de cristales nanométricos bajo la evidencia de picos angostos y bajos. Esto es debido en primera instancia, a la gran cantidad de iones reducidos que se adhieren a la superficie de las AgNEs y llegan a coalescer generando crecimiento más allá del tamaño nanométrico. Sin embargo, la presencia de extracto que contiene estabilizantes, impide el crecimiento en gran medida de las partículas de plata existiendo el ensamble de nanopartículas.

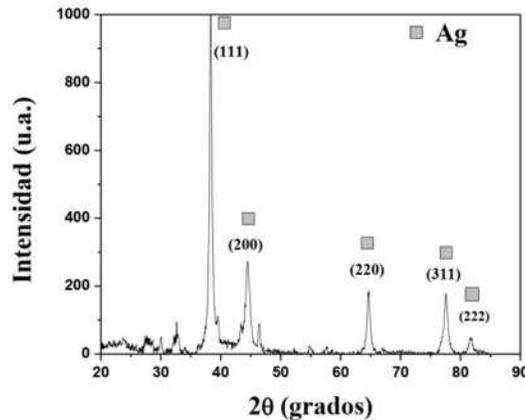


Figura 4.6. Patrón de difracción de DRX de la muestra a 10 mg/mL de extracto y 10 mM de AgNO_3 .

4.2.3 Efecto de la concentración de la sal precursora (AgNO_3)

El efecto de concentración de iones de plata Ag^+ sobre la formación de AgNEs fue evaluado a diferentes concentraciones: 5, 10 y 15 mM (AgNO_3) con una concentración constante de extracto de 2.5 mg/mL. En la Figura 4.7 se muestran los espectros de absorción UV-Vis de dicho ensayo, en los que se puede observar la presencia de la banda debido al SPR de la plata nanométrica. La intensidad de la banda SPR aumenta con el incremento de la concentración de sal, excepto para la concentración de 15 mM que disminuye incluso por debajo de los demás y su pico adopta una forma más ensanchada. Además, la posición de los picos máximos de absorción presentan un corrimiento hacia longitudes de onda mayores en función al aumento de concentración de sal desde 423, 432 y 440 nm para las muestras a 5, 10 y 15 mM, respectivamente. Esto es debido a que con el aumento de las concentraciones de AgNO_3 , la cantidad de iones Ag^+ disponible en el sistema es mayor, por lo tanto conduce a la formación de más cantidad de Ag nanométrica, lo que se traduce en un aumento de intensidad de los picos [143]. Además, también el aumento en cantidad de iones disponibles trae consigo mayor cantidad Ag reducida que puede adherirse a la superficie generando crecimiento de las partículas lo que da respuesta al desplazamiento de los picos y disminución del SPR en la muestra a 15 mM. Aunado a un exceso de Ag, puede suceder que la cantidad de agentes estabilizantes sea insuficiente, lo que daría como resultado un sobrecrecimiento por coalescencia de nanopartículas generando un tamaño de cristal por encima de la escala nanométrica.

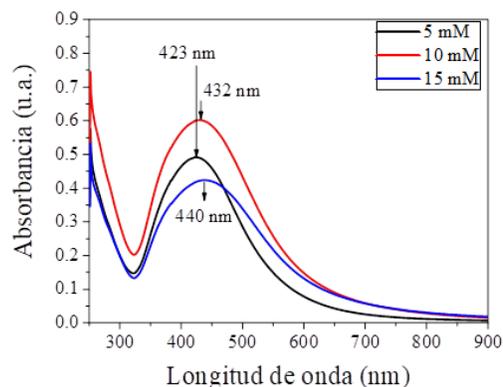


Figura 4.7. Espectros UV-Vis de la variación de concentración de AgNO_3 .

En la Figura 4.8 (a-c), se observan las micrografías de SEM de los productos obtenidos bajo la variación de la concentración de AgNO_3 bajo condiciones de temperatura ambiente y a la concentración constante del extracto *S. praealtum* (2.5 mg/mL). En el inciso (a) se muestran micrografías de AgNPs sintetizadas a 5 mM (AgNO_3), con morfología esférica y tamaño uniforme de aproximadamente 20 nm. En la imagen de baja resolución, se revelan cúmulos de AgNPs como si comenzaran a autoensamblarse. Mientras que en los incisos (b-

c) se puede observar partículas de Ag (AgNEs) sintetizadas en 10 mM y 15 mM de AgNO_3 , respectivamente. Estas partículas están dispersas y tienen una distribución de tamaño relativamente uniforme, donde muestran una morfología similar a una flor. Las micrografías SEM de alto aumento ilustran partículas individuales para la muestra a 10 mM, donde los AgNEs presentan un tamaño $\sim 1,5 \mu\text{m}$ presentan una topografía nanotexturizada caracterizada por franjas irregulares, abiertas y cruzadas en diferentes direcciones dispuestas en la superficie. Estas partículas son porosas y tienen nanoláminas de $\sim 30 \text{ nm}$ de espesor. Mientras tanto, en los AgNEs a 15 mM (AgNO_3) presentan partículas más grandes de hasta $\sim 2,5 \mu\text{m}$, mostrando espacios más estrechos entre láminas de $\sim 20 \text{ nm}$ de espesor, haciéndolas más esféricas y compactas. Las diferencias morfológicas y de tamaño entre estos dos tipos de partículas denotan la influencia de la concentración de sal en el proceso de nucleación y crecimiento.

Así, una nanoestructura grande y compacta crece con más iones de Ag^+ reducidos. En el estado nanométrico, la alta energía de la superficie provoca una mayor adsorción de átomos para formar partículas similares a flores. Además, el extracto de *S. praealtum* parece contener compuestos que participan como agentes de dirección para el crecimiento en el extracto induciendo la agregación y el desarrollo anisotrópico a través del autoensamblaje de las unidades (AgNPs). Es evidente que dado el alto número de sustancias orgánicas en el extracto acuoso, los átomos reducidos se difundieron lentamente hacia la superficie de crecimiento. La superficie de crecimiento adsorbe átomos, y el agente director de biomoléculas en la superficie permite su agregación en forma de nanoláminas que crecen progresivamente en diferentes direcciones para que, en su conjunto, la partícula sea esférica siguiendo los requerimientos mínimos de energía [144-146]. Típicamente, la formación de estas partículas nanoestructuradas se reporta en 2 pasos usando varios agentes reductores y estabilizadores como aminoácidos, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, ácido cítrico, entre otros [1, 147-149].

Es fundamental mencionar que las AgNPs se forman para la concentración de 5 mM de AgNO_3 , lo que indica que aún existe una cantidad suficiente de agentes estabilizantes que impiden el crecimiento de las partículas. Sin embargo, se produce un cambio drástico en la morfología de las partículas al aumentar la concentración de sal de plata para obtener partículas similares a flores, superando obviamente la capacidad estabilizante del agente en el extracto de la planta *S. praealtum*.

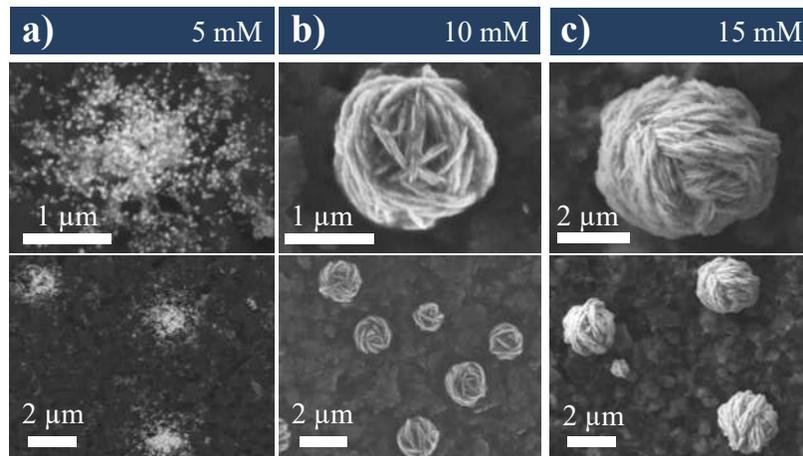


Figura 4.8. Micrografías (MEB) de AgNEs obtenidos a diferentes concentraciones de AgNO_3 : a) 5 mM, b) 10 mM y c) 15 mM.

La Figura 4.9 muestra los patrones de difracción DRX de los AgNPs obtenidos con AgNO_3 5 mM (línea negra) y los AgNEs formados con 10 mM y 15 mM (líneas roja y azul, respectivamente). En todos los patrones, las reflexiones de Bragg aparecen en los ángulos 38.28° , 44.13° , 64.66° , 77.52° y 81.45° indicando la estructura fcc típica de Ag según los planos (111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente (JCPDS 00-003-0931). De acuerdo con la ecuación de Debye-Scherrer, el tamaño promedio de los cristalitas para las AgNPs fue de 12 nm, mientras que para los AgNEs; fue de 15 nm y 16 nm, respectivamente. Por lo tanto, al aumentar la concentración de AgNO_3 , se produjo el crecimiento de AgNEs al incorporar la especie a su superficie debido a la ausencia de agentes estabilizadores [150]. Por otro lado, en cuanto a las intensidades de los picos DRX, son casi idénticos en las muestras, lo que implica que la síntesis del extracto de *S. praealtum* no refleja un crecimiento anisotrópico a lo largo de un plano particular. Sin embargo, los compuestos fitoquímicos de *S. praealtum* dirigen las partículas para que se autoensamblen en conjuntos de nanolaminas que posteriormente forman estructuras complejas similares a flores [147], lo que demuestra la eficacia de *S. praealtum* para reducir y auto-autoensamblar nanocristales de Ag.

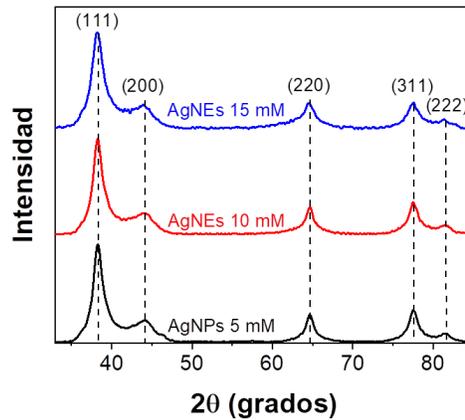


Figura 4.9. Patrones de difracción XRD de AgNPs y AgNEs.

4.2.4 Efecto de la temperatura y la agitación sobre la síntesis de AgNEs

Los AgNEs preparados con extracto de hoja de *S. praealtum* en condiciones de 10 mM (AgNO_3) y 2.5 mg/mL de extracto acuoso variando la temperatura de ~22, 60 y 80 °C se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis. En la Figura 4.10 se presentan los espectros a dichas temperaturas, donde se observa principalmente un pico de absorción máxima a 432 nm atribuido a la RPS de Ag nanométrica [151, 152]. También, aparece de nuevo una segunda señal a 360 nm que se atribuye a compuestos con grupo carboxilato que interacciona con las AgNPs [141, 142]. Por otra parte, la intensidad del pico de RPS aumenta respecto a la temperatura, revelando que la temperatura favorece la formación de una mayor cantidad de unidades nanométricas de Ag.

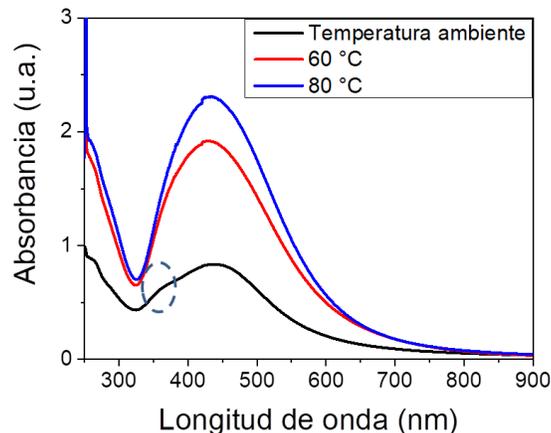


Figura 4.10. Espectros UV-Vis de AgNEs sintetizados usando extracto acuoso de *S. praealtum* bajo diferentes valores de temperatura: ambiente (22 °), 60 °C y 80 °C.

La Figura 4.11(a-i) muestra micrografías representativas MEB bajo diferentes aumentos de los productos obtenidos a temperatura ambiente (incisos a-c), 60 °C (incisos d-f) y 80 °C

(incisos g-i). Todas las muestras exhiben estructuras micrométricas que tienden, en función de la temperatura, a una morfología esférica más definida y alcanzar una distribución de tamaño uniforme de 2-2.5 μm (incisos a, d y g) y a constituirse a partir de ramificaciones que se van compactando hasta formar nanoláminas bien definidas y compactas de ~ 25 nm (inciso i). Por lo que, una temperatura a partir de 80 $^{\circ}\text{C}$ favorece el autoensamblaje de Ag al conseguir estructuras altamente esféricas, formadas por nanoláminas compactas y de tamaño uniforme. Dichas evidencias, demuestran que a temperaturas elevadas por encima de la temperatura ambiente se induce un incremento en las velocidades de reducción, nucleación y agregación de AgNPs dando como resultado un crecimiento isotrópico [146]. Estos resultados difieren a los obtenidos por Molina y col [9]. Que obtuvieron estructuras de plata de tipo nanoflores ensambladas de nanopartículas usando extracto acuoso de *Kalanchoe Daigremontiana*. Ellos observaron que solo a 30 $^{\circ}\text{C}$ se formaban las AgNPs como bloques de construcción, mientras que a 80 $^{\circ}\text{C}$ no se formaban, lo que atribuyeron a que a altas temperaturas se producía la degradación de los agentes fitoquímicos responsables de la reducción.

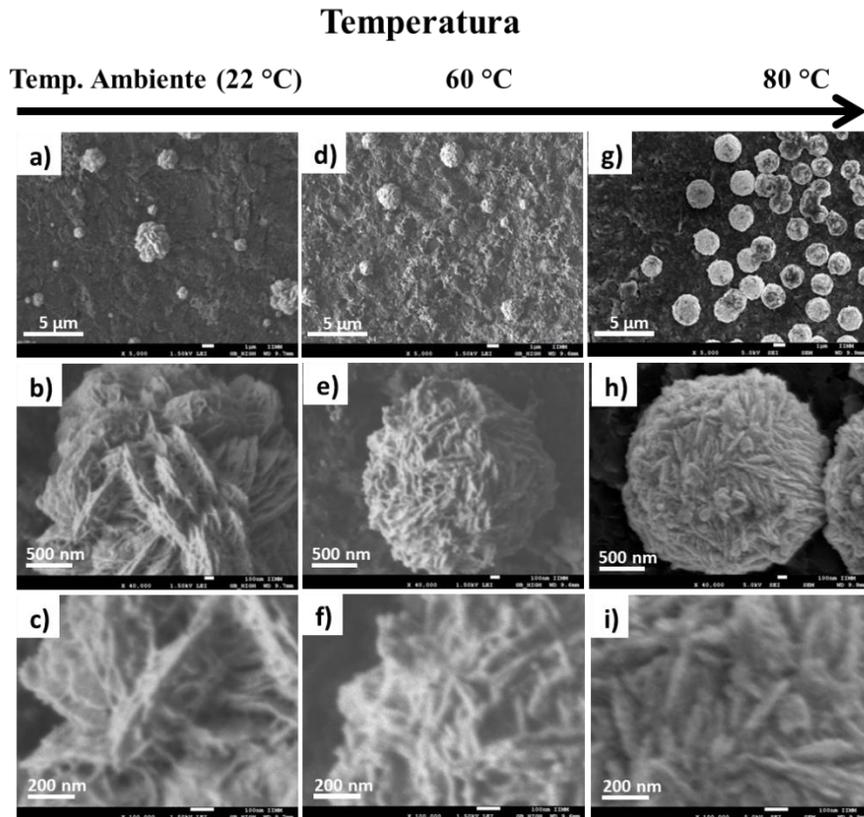


Figura 4.11. Micrografías SEM a diferentes aumentos de los AgNEs a temperatura ambiente (a-c), 60 $^{\circ}\text{C}$ (d-f) y 80 $^{\circ}\text{C}$ (g-i).

Un análisis micrográfico composicional de los AgNEs por la técnica LABE (Low Angle Backscatter Electron) en función de la temperatura es mostrado en la Figura 4.12 (a-f). En estas imágenes se revela que a bajas temperaturas están presentes una cantidad importante de nanopartículas libres sin ensamblar. No así para la muestra a 80 °C, donde la cantidad es relativamente pequeña en contraste a las muestras de menor temperatura. También, se observa cómo se desarrolla el acomodo de las AgNPs al autoensamblarse (incisos b, d y f), lo que confirma que la temperatura aumenta la velocidad de agregación de las AgNPs generando su crecimiento en por autoensamblable en nanolaminas compactas mejor definidas.

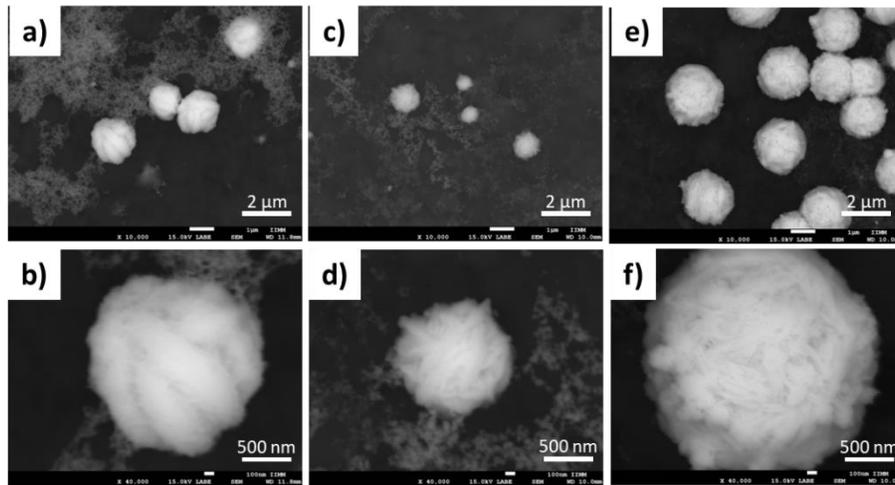


Figura 4.12. Micrografías MEB mediante la técnica LABE de AgNEs sintetizadas a temperatura ambiente (a-b), a 60 °C (c-d) y 80 °C (e-f).

La Figura 4.13 presenta el mapeo y el análisis químico puntual EDS, en el cual se aprecia la composición de los AgNEs obtenidos en función de la temperatura. En este, se aprecia que las AgNEs se encuentran constituidos de manera íntegra únicamente del elemento plata, lo que confirma la efectividad por parte del extracto acuoso de *S. praealtum* en obtener autoensambles de composición uniforme.

La Figura 4.14(a) presenta una comparación cinética de la formación de AgNEs sin temperatura y con temperatura, mediante espectroscopía UV-Vis por medio del aumento de absorbancia en $\lambda_{\text{máx}}$ (RPS de la plata a 432 nm). Se eligió relacionar la absorbancia y no la concentración debido a que el coeficiente de extinción molecular (ϵ) de la ley de Lambert-Beer en AgNEs depende de una distribución de tamaño estrecha y morfología definida y, estas características se tienen y fueron demostradas en las anteriores micrografías. En la cinética se presentan dos procesos definidos como la nucleación y crecimiento de las partículas, marcados por un cambio drástico de absorbancia en el tiempo [153]. Dicho cambio se lleva a cabo a los 15 min para la muestra a temperatura ambiente y a los 5 para 60 °C. Además, a partir de las pendientes, se tienen los siguientes valores de velocidad aparente para el proceso de nucleación: 0.0078 s^{-1} y 0.068 s^{-1} y de crecimiento: 0.0018 cm^{-1}

y 0.0063 cm^{-1} para la muestra a temperatura ambiente y a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Esto revela que el proceso de nucleación y crecimiento de los bloques de construcción relativamente pequeños (AgNPs) para la formación de AgNEs es beneficiada al aplicar temperatura. Lo cual es expresado en una tasa de velocidad de reacción y nucleación rápida que asiente tamaños de AgNPs pequeños y uniformes como los mostrados en la Figura 4.12(a-d). Como el proceso de síntesis llevado a cabo en este trabajo es por reducción química, en la que fitoquímicos se oxidan para reducir los iones Ag^+ , dando como resultado la liberación de iones H^+ y presencia de derivados ácidos [154-156]. Otra forma de conocer cómo la temperatura afecta la velocidad de la reacción de reducción es mediante el decremento de valores de pH. En la Figura 4.14b se presenta el registro de los valores de pH en función del tiempo y el ajuste lineal (recuadro superior) mostrando el valor las pendientes de 8×10^{-8} y $2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ con una $R^2=0.922$, para las reacciones de síntesis a dos temperaturas: temperatura ambiente y $60 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Se observa un primer y significativo cambio de pH a los 5 min en ambas muestras iniciada la reacción, que al relacionarla con la cinética del inciso b, este cambio corresponde a la reducción en la etapa de nucleación. Sin embargo, en la muestra a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, el cambio es mayor y se vuelve constante después de 45 min, no para la de temperatura ambiente, que sigue disminuyendo, demostrando que continúa la reducción de los iones Ag^+ . Por lo tanto, esto sería otra ruta que demuestra la relación que tiene la temperatura con el aumento de la tasa de reducción.

Por otra parte, cabe señalar el valor relativamente pequeño de la velocidad de reacción en ambas muestras, pero más aún a la de temperatura ambiente ($8 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$). De acuerdo a la literatura, las bajas tasa de reacción son atribuidas a la presencia de compuestos orgánicos quelantes de iones metálicos. Que permiten primero la complejación, produciéndose ahí la nucleación provocando una reacción lenta que impide a los núcleos o partículas pequeñas, crecer rápidamente por difusión y, para reducir su energía superficial pueden agregarse asistidos por agitación o en su caso, estos mismos compuestos participan como agentes directores y ligantes que ensamblan los nanocristales [1, 146, 147, 157] y permite crecer más tarde mediante la difusión atómica hacia la superficie, lo que favorece la formación de estructuras anisotrópicas [148]. En este caso, se cree la energía cinética introducida mediante temperatura ayuda también a un crecimiento por agregación aunado con los compuestos orgánicos de la planta que forman complejos y son agentes de dirección, comprobado en la muestra a temperatura ambiente. Esto justifica la morfología, la distribución de tamaño y más que nada la mayor rugosidad en los AgNEs sintetizadas a temperatura ambiente, en la que existiría una combinación de procesos de crecimiento por agregación de AgNPs y difusión atómica.

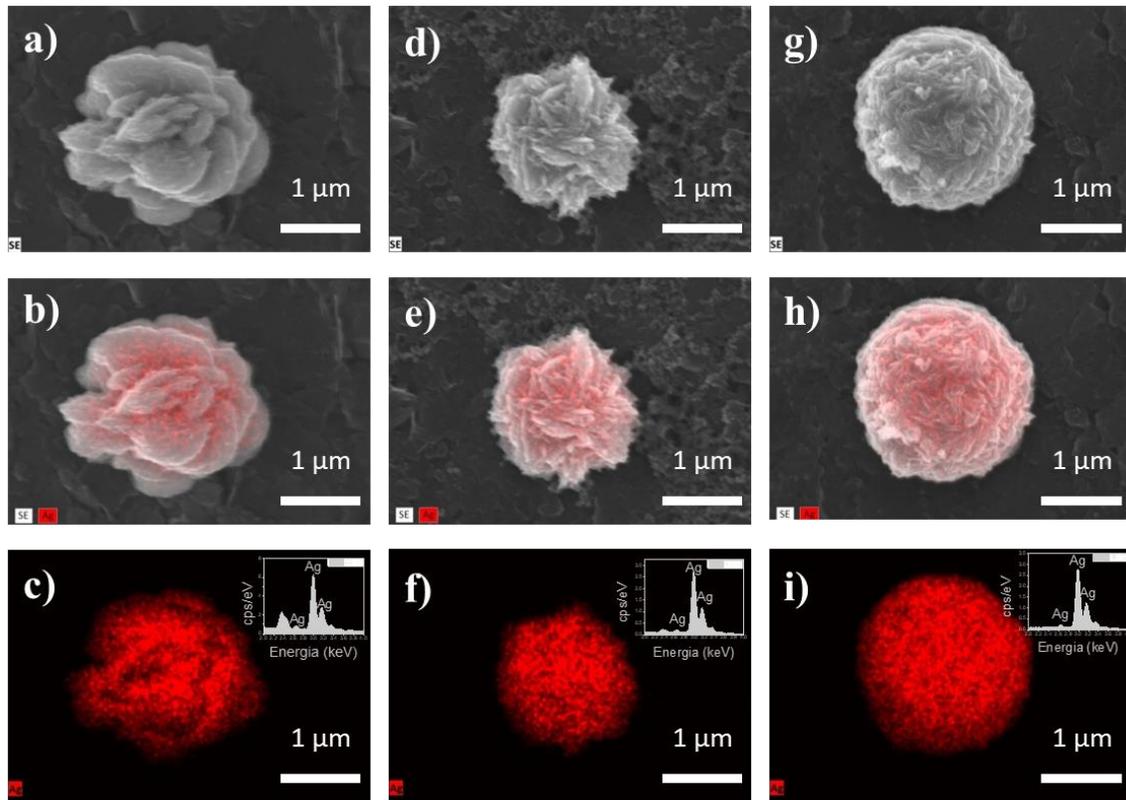


Figura 4.13. Imágenes de mapeo químico y EDS de AgNEs sintetizadas a temperatura ambiente (a-c), a 60 °C (d-f) y 80 °C (g-i).

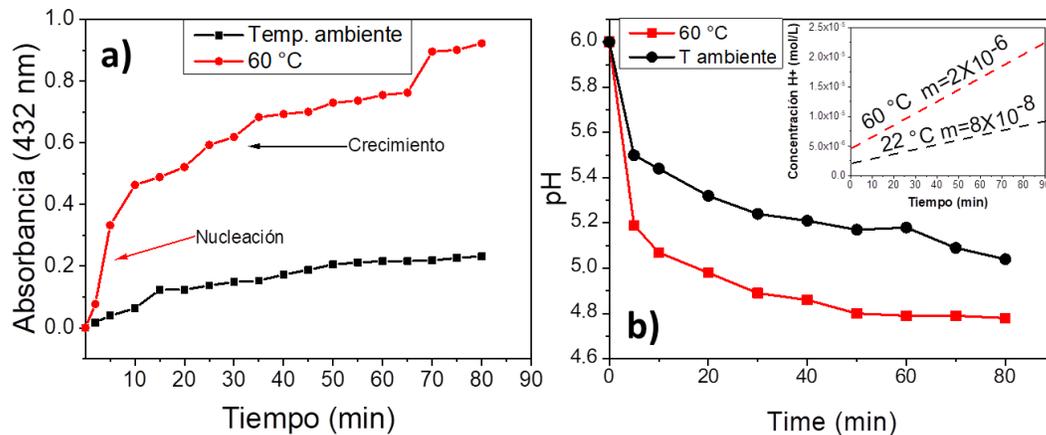


Figura 4.14. Curvas cinéticas de la producción de AgNPs construida a partir de la absorbancia del RPS de Ag (a), y cambio de pH (b).

Con el hecho de comprobar que se puede inducir un crecimiento por agregación de AgNPs y adhesión de iones de Ag reducidos sobre la superficie para obtener AgNEs con morfología altamente esférica y compacta, se llevó a cabo un ensayo, en el que la mezcla de

reacción se sometió a agitación magnética por 5 h. En la Figura 4.15 se revelan los espectros UV-Vis de dicho ensayo con el control (10 mM de sal y 2.5 mg/mL de extracto sin agitación) y la muestra con la misma relación sal-extracto pero expuesta a agitación. Se puede observar en la muestra control un pico $\lambda_{\text{máx}}$ de gran intensidad a 432 nm de RPS típico de plata nanométrica. Mientras que en la muestra agitada, dicho pico es bajo, ancho y su punto máximo tiene un ligero desplazamiento hacia los rojos del espectro, resultado de la deslocalización extendida de los electrones en el nanomaterial, lo que implica agregación de AgNPs con posible coalescencia de nanocristales [158]. Otro aspecto a resaltar, es la presencia de las dos pequeñas señales a 265 y 355 nm visualmente presentes en los dos espectros, pero resaltadas en la muestra con agitación. Este tipo de señales se asocian a compuestos orgánicos de *S. praealtum*, específicamente a los grupos carboxilatos formados por la oxidación de azúcares reductores y a la estructura del esqueleto de compuestos de polifenoles que han reaccionado con la plata y pueden también estar recubriendo los AgNEs [9].

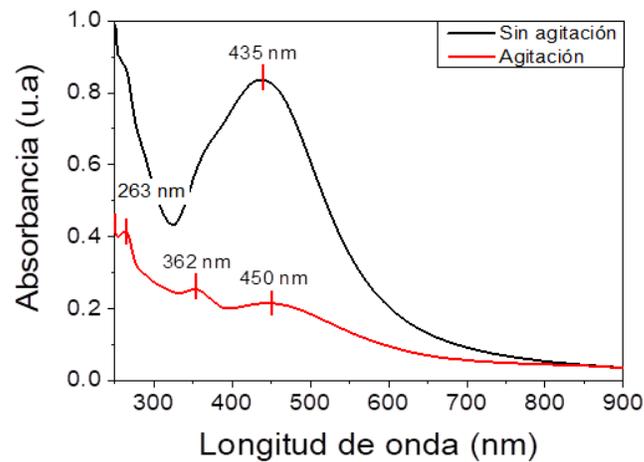


Figura 4.15. Espectros UV-Vis de AgNEs sintetizadas usando extracto acuoso de *S. praealtum* para ver el efecto de la agitación.

La Figura 4.16(a-e) revela las imágenes MEB de la muestra control (incisos a-c) y la muestra agitada (d-e) a varias ampliificaciones. En contexto a las tres ampliificaciones y en contraste al control, se puede indicar que el efecto de la agitación trajo consigo la formación de AgNEs altamente esféricos, de tamaño uniforme ($\sim 1.7 \mu\text{m}$), menor rugosidad y ensamblada por lo que parece laminillas nanométricas formadas por aglomeración de nanopartículas (inciso e). Por lo tanto, si dichas nanoláminas son agregados de AgNPs, el uso de la agitación magnética en la síntesis de AgNEs descarta un crecimiento por maduración de Ostwald, ya que dicha maduración implicaría monocristales maduros en lugar de policristales [159]. Por lo que, estos resultados señalan que la agitación magnética

dirige el autoensamblado de nanocristales de Ag hacia un mecanismo de crecimiento agregativo en menor tiempo.

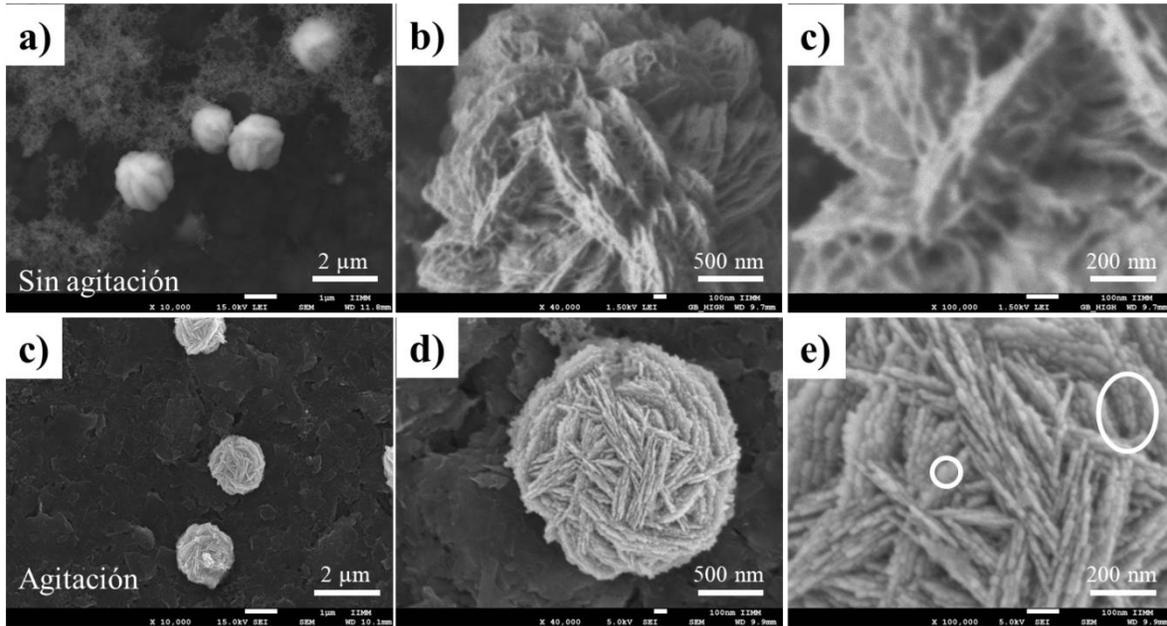


Figura 4.16. Micrografías MEB de AgNEs a diferentes ampliaciones, control sin agitación (a-c) y bajo agitación magnética (c-e).

4.3 Síntesis de AgNPs

Además de las nanoestructuras AgNEs, también fue de interés del presente trabajo realizar la síntesis de AgNPs por motivos de comparación de propiedades. La reacción de síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo condiciones de 10 mM (AgNO_3) y extracto acuoso de *S. praealtum* a 5 mg/mL, dejando reaccionar la mezcla por 30 min. La Figura 4.17a muestra el espectro UV-Vis que ilustra la banda SPR de las AgNPs situados a 434 nm. Este resultado prueba la formación de AgNPs utilizando el extracto acuoso de *S. Praealtum* [151, 152].

La técnica DRX determinó la estructura cristalina de los productos biosintetizados. La Figura 17b muestra el patrón de difracción, que ilustra reflexiones ubicadas en $38,30^\circ$, $44,49^\circ$, $64,70^\circ$ y $77,56^\circ$, que se indexaron a los planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311) de Ag fcc según tarjeta N° 00-065-2871. Los reflexiones distribuidos en los ángulos de 2θ no indexados fueron difíciles de identificar, lo que presumiblemente pertenece a los residuos de la fase orgánica debido a varios compuestos fitoquímicos presentes en la planta. Los picos más anchos indican tamaños de cristal pequeños. La ecuación de Debye-Scherrer y la medición FWHM determinaron que el tamaño del cristalito era de alrededor de 17 nm, lo que indica la presencia de cristales nanométricos de Ag [152, 160]. El espectro UV-Vis y

los datos DRX demuestran que la biorreducción de iones Ag proviene de biomoléculas antioxidantes en el extracto de *S. praealtum* y formación de AgNPs. Además, estos resultados coinciden bien con investigaciones anteriores [161].

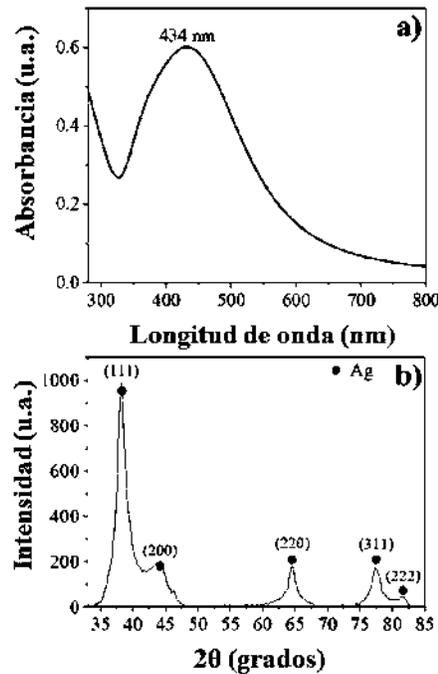


Figura 4.17. AgNPs sintetizadas utilizando extracto acuoso de *S. praealtum* un espectro UV-Vis y un patrón de difracción DRX.

El tamaño y la estructura de las AgNPs se analizaron mediante la técnica MET. La Figura 4.18(a-b) muestra micrografías MET de campo claro de AgNPs con morfología semiesférica. El histograma obtenido (recuadro) con aproximadamente 300 NPs ilustra una distribución de tamaño entre 5 y 50 nm, con la frecuencia más alta entre 5 y 25 nm y un tamaño promedio de 14 nm. Estos tamaños de partículas concuerdan con las mediciones previas de DRX (17 nm). También es de destacar que no hay aglomeración sino agregación entre las AgNPs, lo que demuestra cantidad suficiente en el número de biomoléculas estabilizadoras de *S. praealtum*. Por lo tanto, la morfología semiesférica de las AgNPs sugiere un proceso de crecimiento controlado por difusión [162, 163]. Es esencial tener en cuenta que las partículas semiesféricas se obtienen comúnmente utilizando métodos ecológicos [164, 165].

La Figura 4.18(c-d) muestra un par de micrografías TEM de alta resolución (HRTEM) de algunas AgNPs con morfología esférica y su transformada rápida de Fourier (recuadro). Se observa un espaciamiento d correspondiente a 0.24 nm, perteneciente a los planos de Ag

(fcc) [166]. Por lo tanto, el análisis TEM también confirma la formación, el tamaño, la cristalinidad y la morfología semiesférica de las AgNPs biosintetizadas.

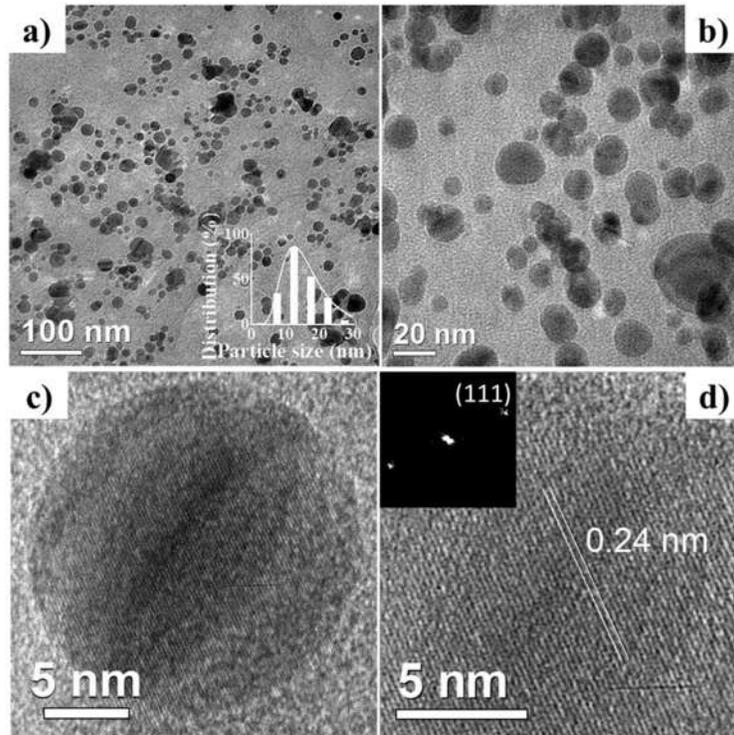


Figura 4.18. Micrografías MET de los AgNPs: (a-b) micrografías de campo claro, (c-d) micrografías HRTEM con su rápida transformada de Fourier.

Con el fin de optimizar las características de las AgNPs (morfología, distribución de tamaño, etc.), la síntesis se llevó a cabo a las temperaturas de 60 y 80 °C y se comparó con las obtenidas a temperatura ambiente. Las muestras, se mantuvieron a temperatura constante por una hora e inmediatamente transcurrida el tiempo de reacción se analizó por UV-Vis y MEB (Figura 4.19a-d), en donde se observó picos estrechos con incremento en su intensidad a medida que aumenta la temperatura y definidos a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 432 nm (inciso a), propios de nanocristales de Ag uniformes con tamaño promedio de aproximadamente 13-20 nm (incisos b-c), observándose ligeramente más pequeñas a altas temperatura. Además, se produce una mayor cantidad de AgNPs con el aumento de temperatura. Lo que indica que la temperatura ayuda a una mayor producción de AgNPs debido a una velocidad de reacción rápida provocada por la energía cinética de las moléculas que permite que los iones de plata se reduzcan a una tasa mayor, evitando al mismo tiempo, un crecimiento mayor y no uniforme de partícula [154].

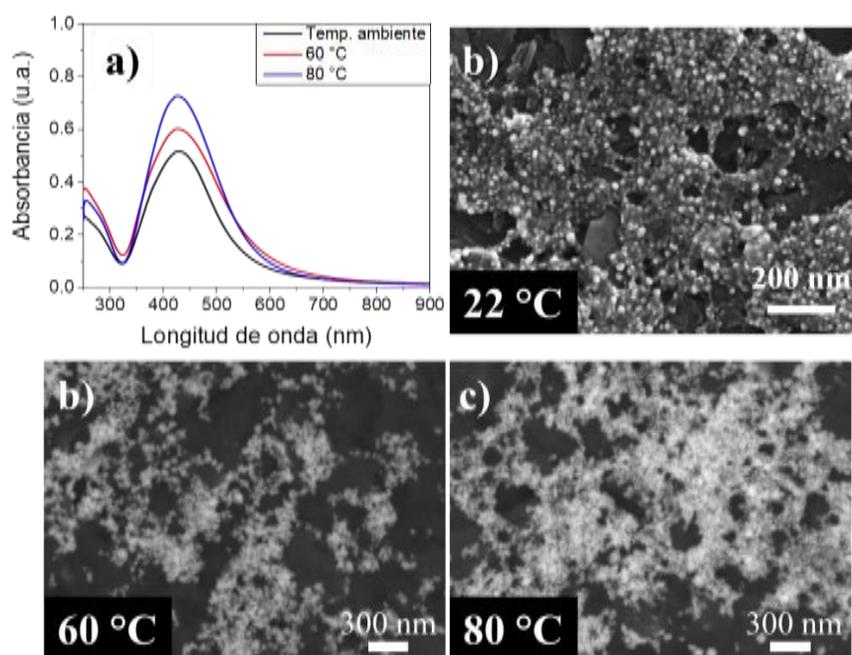


Figura 4.19. Espectro UV-Vis de las muestras después de una hora de reacción a diferentes temperaturas y lavado exhaustivo (a), e imágenes MEB de AgNPs a 22 °C (b), 60 °C (c) y 80 °C(d).

4.4 Análisis de reducción y crecimiento y mecanismo de formación de AgNEs

Una herramienta valiosa para los estudios de metabolitos naturales es la espectroscopía de ^1H RMN [167]. El espectro de RMN de ^1H del extracto de *S. praealtum* se muestra en la Figura 4.20a, que ilustra señales características en los rangos de compuestos aromáticos (δ 7.00–6.00), compuestos de vinilo (δ 5.80–5.00), carbohidratos (δ 5.00–2.50), y protones alifáticos (δ 2.50–1.00) [160]. Los azúcares aparecen como los principales componentes del extracto [168]. También se analizó el sobrenadante de *S. praealtum* una vez realizada la reacción de bioreducción de Ag. Para ello, después de la centrifugación de los nanomateriales, el sobrenadante se analizó mediante ^1H RMN (Figura 4.20b), revelando un espectro similar al del extracto, con ligeras variaciones. Se observó un cambio químico en el rango de δ 4.2–3.2, relacionado con los protones H-2-H-6 de los esqueletos de azúcar (Figura 4.20c-d), lo que sugiere variaciones químicas de los esqueletos de glucósidos. Estos hallazgos sugieren que moléculas de azúcar se convierten en derivados del ácido glicólico [169-171], lo que coincide con la disminución del pH de 6 a 4 determinada durante el proceso de reacción. Por tanto, esta técnica señala que los compuestos glucosídicos puntúan a ser los principales responsables de la reducción de los iones Ag.

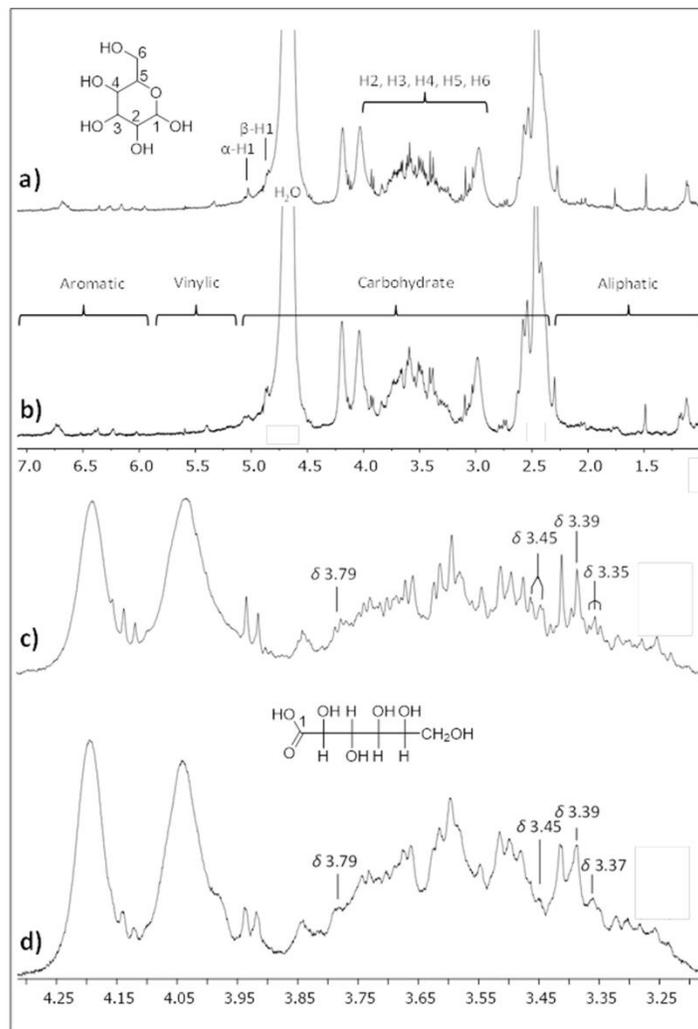


Figura 4.20. Espectros de ^1H RMN del extracto acuoso de *S. praealtum*. (a) Antes y (b) después de la reacción, y su respectiva expansión en la región de carbohidratos (c-d).

La medición de FTIR se realizó para determinar grupos funcionales de metabolitos de *S. praealtum* y sus modificaciones químicas después de la reducción, estabilización y formación de AgNEs (Figura 4.21a-c). Los espectros FTIR del extracto de la planta (Figura 4.21a) revelaron una banda de alta intensidad a 3300 cm^{-1} asignada a las vibraciones de estiramiento (OH) de compuestos glicosídicos, el componente mayoritario en el extracto, según el análisis de RMN. Otras bandas típicas de azúcar a 1380 , 1078 y 1050 cm^{-1} de las vibraciones de los restos de alcohol primario resaltadas [172, 173]. Además, se observaron vibraciones (C-H) a 2918 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} y 1329 cm^{-1} de restos alifáticos. Finalmente, una vibración (COO) a 1654 cm^{-1} apareció como una pequeña banda, lo que sugiere una concentración débil de metabolitos con este resto.

Por otro lado, el espectro IR del sobrenadante mostró variaciones de banda significativas (Figura 4.21b). Así, se observó la aparición de una banda 1605 cm^{-1} , mientras que la intensidad de la banda a 1050 cm^{-1} disminuyó. Sin embargo, en el espectro correspondiente a las AgNEs, se observó un aumento en la transmitancia a 1605 cm^{-1} (vas COO-) junto con la banda de vibración revelada a 1442 cm^{-1} (va COO-) del grupo carboxilato, deduciéndose la oxidación de azúcares en el carbono 1 del grupo aldehído [174, 175]. A su vez, la banda a 1050 cm^{-1} perteneciente al grupo OH primario de azúcares (aldehídos) disminuye en intensidad, sugiriendo su participación en la bioreducción de Ag^+ . Además, los cambios en los números de onda de $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ y $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ sugieren que los azúcares oxidados participan en la estabilización de las nanoestructuras de Ag, de manera similar a otros informes [176, 177], lo que indica una interacción constante del carboxilato de Ag [178-180]. Según los datos de FTIR y el análisis de ^1H RMN, los compuestos glucosídicos en mayor cantidad en *S. praealtum* son los responsables de la reducción y estabilización de las AgNPs.

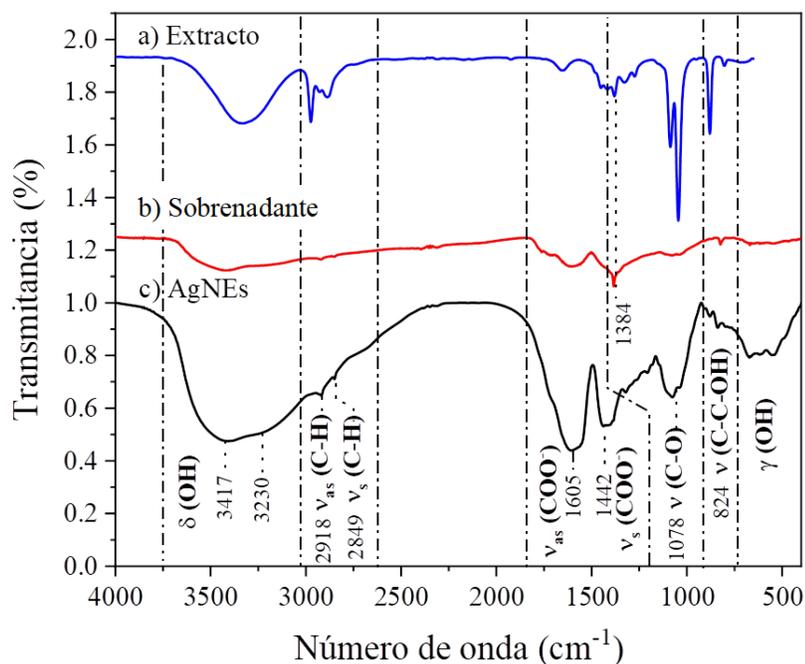


Figura 4.21. Espectros de FTIR obtenidos de (a) extracto de *S. praealtum*, (b) sobrenadante obtenido después de la reacción y (c) AgNEs.

De acuerdo a los resultados anteriores de espectroscopía, los azúcares se perfilan como los principales fitoquímicos del extracto de *S. praealtum* que participan en la reducción y estabilización, por lo que se esperaría un descenso en el valor de pH del sistema de síntesis después de la reacción debido a la presencia de derivados de ácidos glicónicos o aldónicos producidos por la oxidación de moléculas de azúcares [155, 181]. En la Figura 4.22a se presenta el registro de los valores de pH en función del tiempo de reacción de síntesis de

AgNEs. Conociendo, que el valor inicial del extracto acuoso preparado y al tiempo cero de la reacción es aproximadamente de 5.46, después de 40 min llega a un pH mínimo sin cambio aparente significativo de 4.69, de determina un $\Delta\text{pH}=0.76$. Por lo que se confirma la formación de especies ácidas derivadas de la oxidación de azúcares por parte de los iones metálico [147].

Cuando los iones de plata han sido reducidos por los azúcares, se desprende iones hidrógeno (H^+) como subproducto. Por lo que, la velocidad de generación de H^+ se puede considerar similar a la velocidad de reducción de átomos de Ag. Se logró hacer una estimación calcular mediante el descenso de pH la velocidad de la reacción de óxido reducción (Figura 4.22b) en base a la ecuación 1, suponiendo que alguno de los azúcares participantes en el extracto fuera la molécula de glucosa. En dicha Figura, se aprecia la curva del cambio de la concentración de H^+ (curva negra), donde después de 40 min la concentración de H^+ comienza a disminuir hacia un comportamiento asintótico, indicando el término de la reacción. Mientras en rojo punteada, se muestra el ajuste lineal con un valor de pendiente de 0.4×10^{-6} y una $R=0.9692$. Estos resultados indican una velocidad de reacción bastante inferior a lo reportado en la literatura, donde indican que una velocidad lenta de reacción favorece el autoensamblado de estructuras jerárquicas de Ag. Logrando disminuir dicha a través de uso de glicina como sustancia estabilizadora de iones de plata al formar complejos químicos [148].

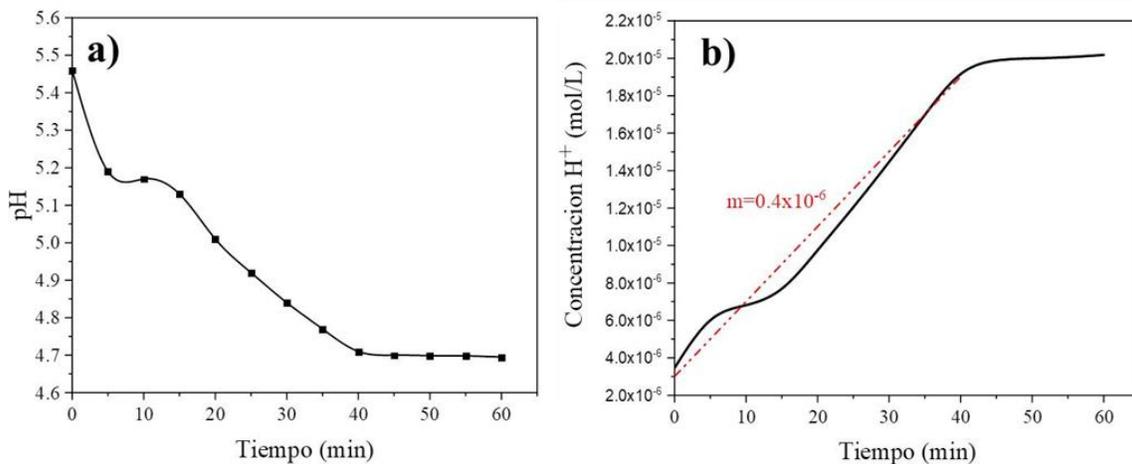


Figura 4.22. Monitoreo del cambio de pH durante la reacción de síntesis de AgNEs (a), velocidad de generación de iones H^+ (b).



De acuerdo a los anteriores estudios, las moléculas de azúcar contenidas en el extracto acuoso de *S. praealtum* participan como agentes reductores y estabilizantes. Para demostrar esto, se esperaría que posterior a la síntesis estos compuestos permanezcan sobre la superficie de las AgNPs como agentes de protección que estabilizan. Por ello, se realizó un estudio espectroscópico mediante UV-Vis para poder demostrarlo. En este estudio la mezcla de reacción de AgNPs se procedió a lavar exhaustivamente con el fin de eliminar los residuos orgánicos después de la reacción de bioreducción. La Figura 4.23 muestra el espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas. En dicho espectro aparece la banda de absorción a 434 nm atribuida a las AgNPs como se ha comentado anteriormente. Por otra parte, se observa que aún después del lavado, también sigue presente la banda a 365 nm y una tercer a 253 nm atribuidas al grupo carboxilato de los azúcares del extracto debido a la deslocalización de electrones en la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos carbonilo que aparentemente estarían interaccionando con AgNPs. Por lo tanto, los datos de UV-Vis también confirman la oxidación de azúcares para formar carboxilatos que estabilizan las AgNPs [141, 182].

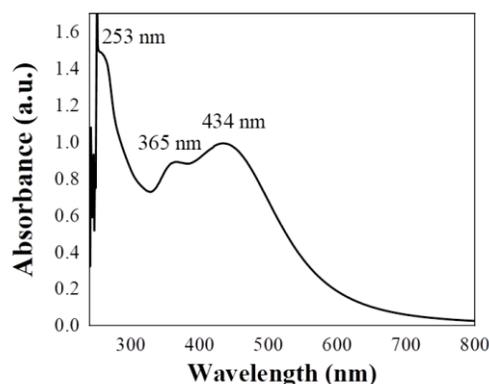


Figura 4.23. Espectro de UV-Vis de AgNPs posterior a lavadas exhaustivas.

De acuerdo con las evidencias anteriores, se puede sugerir un mecanismo de reacción, como se muestra en la Figura 4.24. La formación acíclica es posible por azúcares en el medio acuoso (a), un proceso de oxidación del carbono anomérico (C-1) que es termodinámicamente favorecido con la reducción concomitante de dos moléculas de AgNO_3 (b) para producir dos átomos de Ag^0 y derivados del ácido glucónico (c). La estabilización de las AgNPs se logra mediante la bien conocida acción tensioactiva proporcionada por los restos carboxilato formados durante el proceso redox (d).

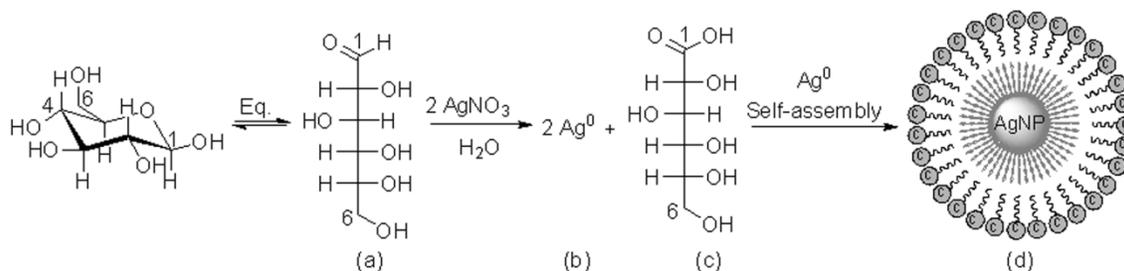


Figura 4.24. Mecanismo de reacción de la síntesis de AgNPs usando extracto de hoja de *S. praealtum* y su estabilización química.

Por otro lado, se realizó el mismo análisis espectroscópico mediante UV-Vis de la síntesis de AgNPs. La Figura 4.25 muestra 4 espectros de UV-Vis que corresponden al extracto acuoso de *S. praealtum* antes de la reacción; los AgNEs sintetizados sin lavar; los AgNEs después del lavado y el extracto después de la reacción (sobrenadante). En este, se puede ver bandas de absorción a 435, 425, 350 y 250 nm, parecidas a las observadas en AgNPs. Las dos primeras señales pertenecen al SPR de Ag nanométrica y, las dos restantes a la absorción de compuestos naturales de la planta *S. praealtum*. En la muestra de AgNEs lavada, las señales a 365 nm y 250 nm desaparecen mientras que, en los espectros del sobrenadante y AgNEs antes del lavado, esta señal permanece. Lo que significa, que dichos compuestos no están presentes cubriendo los AgNEs como sucedió en AgNPs. Por otra parte, debido a que el espectro del extracto presenta una tercera señal a 317 nm, se presenta a detalle por sí sólo en la Figura 4.26a. Se sugiere, que junto con las señales a 365 nm y 250 nm, el conjunto de señales indique también la presencia de moléculas de flavonoides en el extracto. Ya que estas señales de absorción en los extractos de 240 a 360 nm se han asociado al esqueleto de esos compuestos (Figura 4.26b). Donde, los máximos de absorción en el rango de 240 a 285 nm nombrada banda II, se origina por las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ en el anillo A. Mientras, que el máximo en el rango de 300 a 400 nm nombrado banda I, es debido a transiciones en el anillo B. Se reporta que estos rangos varían de acuerdo al tipo de flavonoide; mientras que las flavonas presentan un rango de absorción de 304 a 350 nm en la banda I, los flavonoles absorben en un rango comprendido de 352 a 385 nm. Además, forman complejos metálicos por quelación [183-185]. En base a lo anterior, se sugiere que además de los azúcares por sí solos, también moléculas de flavonoides, que por su mayor solubilidad se trate de flavonoides glicosilados, estén participando en la bioreducción de Ag^0 y de manera más importante en el autoensamble de los AgNEs. En la literatura existen una amplia cantidad de trabajos de síntesis de nanopartículas metálicas utilizando moléculas de flavonoides aprovechando las propiedades reductoras y quelantes de iones metálicos [9, 186-188].

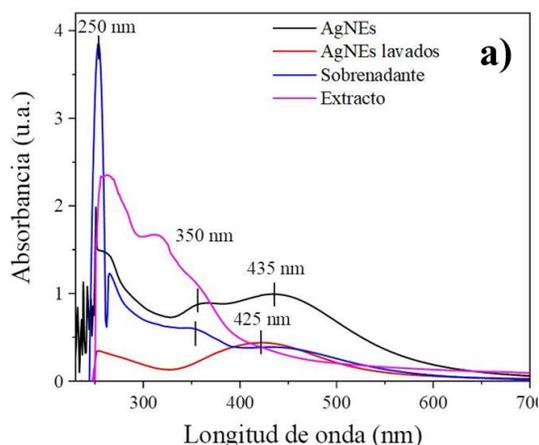


Figura 4.25. Espectros de UV-Vis de los AgNEs y las soluciones obtenidas antes y después del lavado.

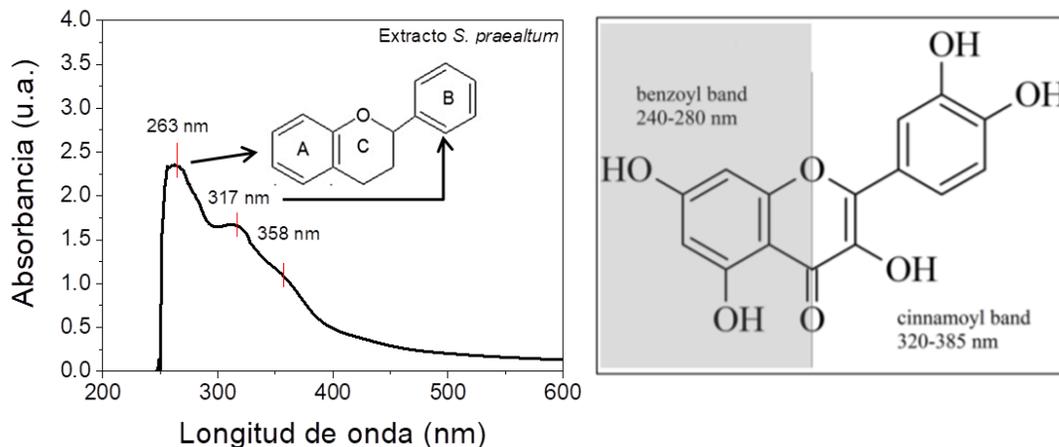


Figura 4.26. Espectro UV-Vis del extracto acuoso de *S. praealtum* que muestra las absorciones típicas de los anillos de flavonoides (a) y esquema de esqueleto de flavonol y bandas de absorción de acuerdo a su estructura [183].

En la literatura se ha demostrado que el uso de moléculas como péptidos [189], lípidos [190], glucosa [102] y ácidos orgánicos [148] permite la obtención efectiva de este tipo de estructura de nanoensambles metálicos. Por otro lado, también se ha probado la influencia que tienen los ácidos, no solamente en la reducción, sino en la etapa de ensamblaje. En el trabajo de Zhang y col. [147] demostraron que la adición de pequeñas cantidades ácidos, aparte de los agentes reductores, interviene al interactuar con iones plata, reduciendo la velocidad de reacción y al mismo tiempo como ligando para el autoensamblado de unidades nanométricas en la estructura. Por esto, y junto con los dato de RMN y FTIR se puede suponer que los ácidos aldónicos, como subproducto de la oxidación de azúcares, también están implicados como agentes estabilizadores-ligandos a causa de la interacción Ag-carboxilatos que estabiliza y ensambla las unidades nanométricas en este trabajo. Sin

embargo, un análisis espectroscópico más profundo reveló que también moléculas de flavonoides glicosilados participan en la formación de AgNEs.

Ya que los compuestos flavonoides tienen una reconocida capacidad reductora y quelante de iones metálicos [183-185] y para sustentar la participación de los flavonoides glicosilados en la síntesis de AgNEs, se llevó a cabo la determinación de actividad quelante por el método de formación del complejo Fe(II)-ferrozina. En la Figura 4.27a se presentan los resultados del ensayo quelante realizado al extracto de *S. praealtum* representados gráficamente mediante curva de porcentaje de efecto quelante frente a concentración de extracto (mg/mL) y se compara con la actividad quelante de un compuesto de iones metálicos hexadentado comercial conocido como EDTA. Este ensayo mostró la actividad quelante del extracto acuoso de *S. praealtum*, al exhibir un comportamiento no lineal dependiente de la concentración, esto es debido a la compleja naturaleza fitoquímica del extracto al contener varios quelantes con diferente afinidad por el hierro y que compiten con la ferrozina [122]. En contraste con la curva obtenida con EDTA, esta última presentó un comportamiento de reacción lineal y alcanza la saturación en 25 $\mu\text{g/mL}$. Es decir, la actividad quelante del extracto *S. praealtum* a una concentración 20 mg/mL equivale a 19 $\mu\text{g/mL}$ de EDTA.

Existen metabolitos vegetales como los fenoles y flavonoides que, además de presentar propiedades antioxidantes, han demostrado tener capacidad de disminución de estrés oxidativo mediante quelación de elementos traza, metales y eliminación de radicales libres [89, 184, 191]. Además, de ser considerados como de los principales candidatos en la redacción de iones metálicos para formación de nanopartículas junto con los terpenoides, azúcares reductores y proteínas [192, 193]. Por ello, en la tabla 4.3 se presentan los resultados de la determinación de cantidades de fenoles y flavonoides totales en el extracto de *S. praealtum*. Los valores fueron estimados en equivalentes de acuerdo a las curvas estándar de ácido gálico ($6.1652x-0.0016$ y $R^2= 0.9992$) y quercetina ($0.016x-0.0114$ y $R^2= 0.9995$) para fenoles y flavonoides, respectivamente. Se encontró, que el extracto de *S. praealtum* contiene una cantidad de compuestos fenólicos de 0.0101 $\mu\text{moles AGE/mg}$ extracto seco y 10.375 $\mu\text{moles QeE/mg}$ extracto. Aunque, la presencia de flavonoides en este ensayo contradice con la prueba de detección rápida de Shinoda. Se podría justificar a la cantidad de estos metabolitos que varían de acuerdo a la época del año que se cosechan y a las condiciones de estrés y nutrientes que son expuestas.

Por otro lado, si bien estos resultados no se puedan comparar directamente por la equivalencia en la que se realizaron, concuerdan con otras investigaciones que afirman la presencia de estos compuestos en el extracto de *S. praealtum* [194, 195], en los que han cuantificado la cantidad de compuestos fenoles y flavonoides en la hoja de *S. praealtum* expresado en mg equivalentes de ácido gálico/g extracto (10.53 mg AG/g extracto) y mg equivalentes de catequina/g de extracto (7.01 mgECT/g extracto) [196]. Por lo tanto, además

de la capacidad reductora, estos resultados confirman que el extracto de *S. praealtum* posee actividad quelante de iones metálicos.

Tabla 4.3. Resultados de la determinación de fenoles totales en μmoles equivalentes de ácido gálico/mg de extracto y flavonoides totales expresados en Equivalentes de μmoles de quercetina/mg extracto.

Planta	$\mu\text{moles AGE/mg extracto seco}$ (Fenoles totales)	$\mu\text{moles QeE/mg extracto seco}$ (Flavonoides totales)
<i>S. praealtum</i>	0.010121326	10.375

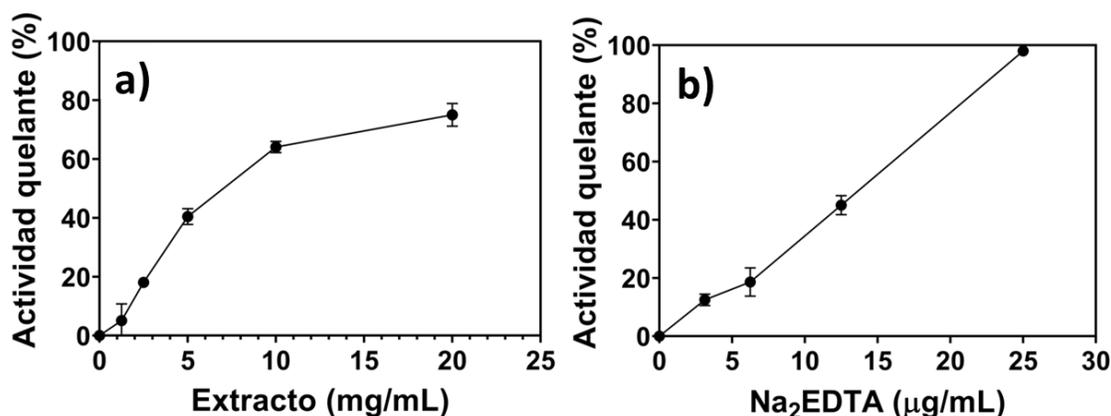


Figura 4.27. Actividad quelante del ion Fe (II) del extracto *S. praealtum* (a), control de quelante comercial EDTA (b).

A través de la revisión de la literatura, los estudios fitoquímicos realizados a la planta *S. praealtum* han demostrado que contiene compuestos valiosos para sintetizar nanopartículas metálicas, como ácidos carboxílicos, flavonoides, alcoholes, cumarinas, azúcares reductores, alcaloides, taninos, flavonoides, compuestos cianogénicos y glucósidos [90]. Además, tiene cantidades significativas de compuestos de kaempferol y quercetina, que atribuyen actividades antiinflamatorias y antioxidantes a cuatro flavonoides de kaempferol glicosilados; siendo kaempferol 3-O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2) - β -glucopiranosido-7-O- α -glucopiranosido, kaempferol 3-O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -glucopiranosido-7-O - α -ramnopiranosido, kaempferol 3-O- α -ramnopiranosido-7-O- α -ramnopiranosido (kaempferitrina) y kaempferol 3-O- β -glucopiranosido-7-O- α -ramnopiranosido [90].

De acuerdo con las evidencias anteriores, se puede sugerir un posible mecanismo de formación de los AgNEs, como se muestra en la Figura 4.28. Los iones Ag^+ pueden interactúan en primera instancia, con compuestos de azúcar acíclica en el carbono numérico (C-1), favoreciendo la reducción del ion metálico. En segunda instancia, los iones Ag^+ forman complejos intermedios con moléculas de flavonoides (complejos metal-flavonoides o también llamados quelatos) a través de sus grupos hidroxilo (comúnmente reportado en 3-hidroxil o 5-hidroxil del anillo C del esqueleto del flavonoide [184]). Estos grupos OH se

oxidan reduciendo los iones Ag^+ a Ag^0 . Estos complejos formados, al mismo tiempo pueden funcionar como centros de nucleación y catálisis de iones restantes, lo que permite el proceso de reducción y nucleación se lleven a cabo de manera simultánea. Posteriormente, crecen a través de la agregación de los iones o núcleos disponibles en el sistema que se van depositando en la superficie y generando un crecimiento anisotrópico formando los AgNEs. Se han sugeridos mecanismos similares en la síntesis de nanopartículas y ensamblajes metálicos [9, 187, 188].

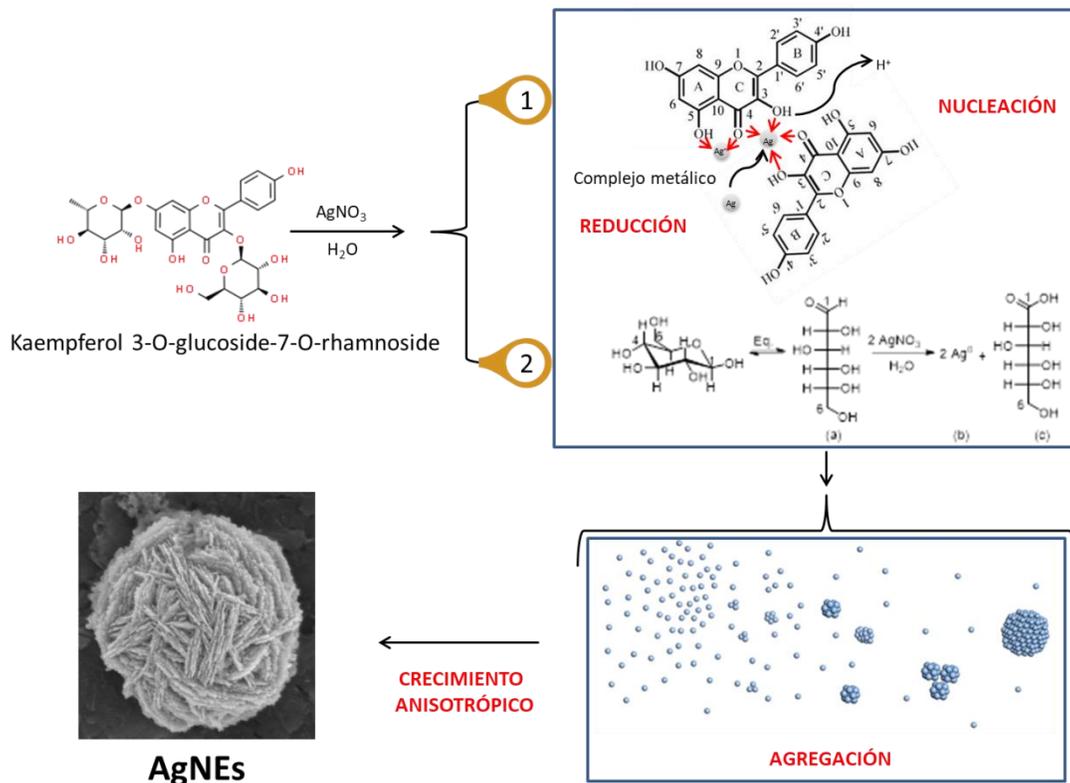


Figura 4.28. Mecanismo propuesto para la formación de los AgNEs usando extracto de hoja de *S. praealtum*.

4.5 Evaluación de las propiedades de los AgNEs y AgNPs

4.5.1 Actividad catalítica

En esta sección se estudió el comportamiento de degradación del colorante azul de metileno (methylene blue por su siglas en inglés MB) utilizando AgNEs y AgNPs con y sin un agente reductor auxiliar (NaBH_4) que demuestre la efectividad de estas nanoestructuras por sí solas para su uso en un proceso catalítico limpio. Se utilizaron las AgNPs y los AgNEs que se prepararon a las condiciones de 10 mg/mL de extracto constante y 5, 10 y 15 mM de AgNO_3 para el caso de AgNPs y AgNEs, respectivamente. Inicialmente, se hizo uso de la espectroscopía UV-Vis para examinar las características ópticas de las NPs y a través de

esta determinar la energía de band-gap de las partículas [197]. La Figura 4.29(a-c) muestra los espectros de absorción de los nanomateriales de Ag obtenidos en función de la concentración de la sal precursora, AgNO_3 (5, 10 y 15 mM), y sus respectivas gráficas Tauc (insertadas en la parte superior derecha). Aparece una banda de máxima absorción entre 425-429 nm de RPS. El espectro UV-Vis a 10 mM y 15 mM muestra una baja intensidad de absorbancia máxima, corrimiento al rojo y evidencia ampliada de diferentes grados de deslocalización extendida de electrones (efecto del confinamiento cuántico) en partículas autoensambladas [145, 198]. Por otro lado, la banda prohibida de los nanomateriales de plata obtenidos por extrapolación directa sobre la gráfica Tauc fue de 2,39, 2,41 y 2,26 eV, para las muestras de 5 mM, 10 mM y 15 mM, respectivamente. Estos resultados confirman la naturaleza nanométrica de los productos de plata obtenidos por *S. praealtum*. Además, debido al mismo efecto, los AgNEs y AgNPs presentan un valor de banda gap significativo muy similar a la literatura [199, 200], útil en aplicaciones optoelectrónicas, de baterías, sensores, semiconductores y catalíticas.

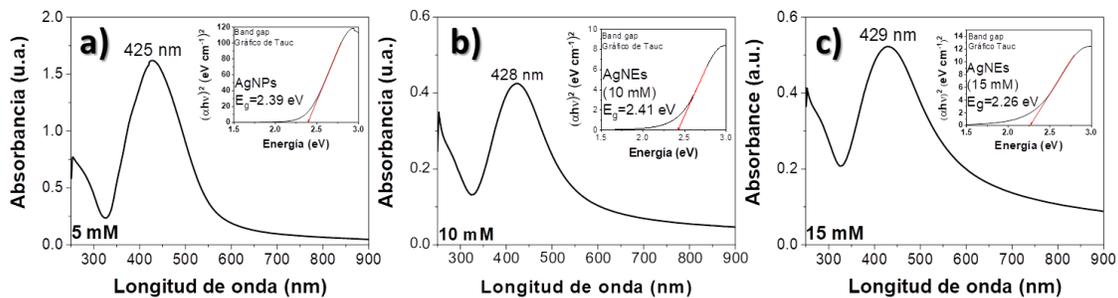


Figura 4.29. Espectros UV-Vis con sus respectivos gráficos Tauc (insertados en la parte superior derecha) que corresponden a nanomateriales de Ag obtenidos a diferentes concentraciones de AgNO_3 , 5 mM (a), 10 mM (b) y 15 mM (c).

En los espectros UV-Vis de la mezcla acuosa de MB + NaBH_4 (véase anexo 1) registrados en el intervalo de tiempo de 0-60 min de la combinación. Solo aparece un cambio mínimo en la intensidad de la banda MB después de 10 min, sin que quede ningún cambio aparente hasta los 60 min.

La Figura 4.30 presenta los espectros de absorción UV-Vis de la degradación del colorante azul de metileno (MB) con la presencia de 0,5 mg de AgNPs y AgNEs. Los estudios de degradación se realizaron con el material en forma de polvo, a temperatura ambiente y bajo la luz visible de la sala del laboratorio. Los espectros de reacción en la columna de la izquierda (Figura 4.30a-c) corresponden a los experimentos realizados en ausencia de NaBH_4 . Al mismo tiempo, los espectros de la derecha (Figura 4.30d-f) se realizaron agregando NaBH_4 (5 mM) como agente reductor. La reacción se monitoreó mediante UV-Vis desde unos pocos segundos hasta 120 min en intervalos de 10 min, la última medición a

las 24 h. Las bandas típicas de absorción de MB se identificaron entre 600-700 nm con un máximo a 664 nm y un hombro a 614 nm [201].

La disminución de la intensidad de las bandas indica la eficiencia fotocatalítica del nanomaterial con el tiempo de reacción. La decoloración en las cubetas (inserto) resulta del mismo proceso. La Tabla 4.4 resume los valores de degradación obtenidos en función del tiempo con y sin agente reductor (NaBH_4), según la cinética de cada material (véase anexo 2). Como se puede observar, alrededor del 50 % de la degradación ocurre a los 120 min, excepto para las AgNPs que alcanzan el 94 % en presencia de NaBH_4 . Los AgNEs pueden actuar como un fotocatalizador en la reducción de colorantes por sí mismas, y la adición de NaBH_4 aumenta la transferencia de electrones de estos nanomateriales. Por lo tanto, el excelente desempeño de las AgNPs en presencia de NaBH_4 sugiere que el área de superficie más grande disponible en las AgNPs influye más que las texturas y las porosidades superficiales presentes en las AgNEs [23], lo que permite más sitios fotoactivos disponibles que sirven como cintas transportadoras, en donde la transferencia de electrones es fundamental para la degradación, como se observa en la Figura 4.30, siendo favorecida por la presencia de iones BH_4^{-1} , facilitando la reacción redox en etapas tempranas y, por tanto, su eficacia, como también han demostrado otros autores [202-205].

Además, los valores de degradación superaron el 90 % a las 24 h con o sin NaBH_4 , lo que significa que en los primeros 120 min de reacción, el NaBH_4 facilita la transferencia de electrones acelera la degradación del colorante. Por otro lado, los experimentos se mantuvieron en un ambiente oscuro después de 120 min de exposición a la luz visible. Además, debido a la capacidad comprobada de las AgNPs para absorber colorante [23, 203, 206, 207], se sugiere que el resto de los no fotocatalizados el colorante se adsorbió en la superficie de las partículas de Ag durante el tiempo restante. Estos aspectos justifican el alto porcentaje de eliminación de MB de AgNPs y AgNEs por sí mismos después de 24 h. Por lo tanto, este método sugiere un proceso de degradación limpio independiente de la estructura, el tamaño y la morfología de las partículas de Ag.

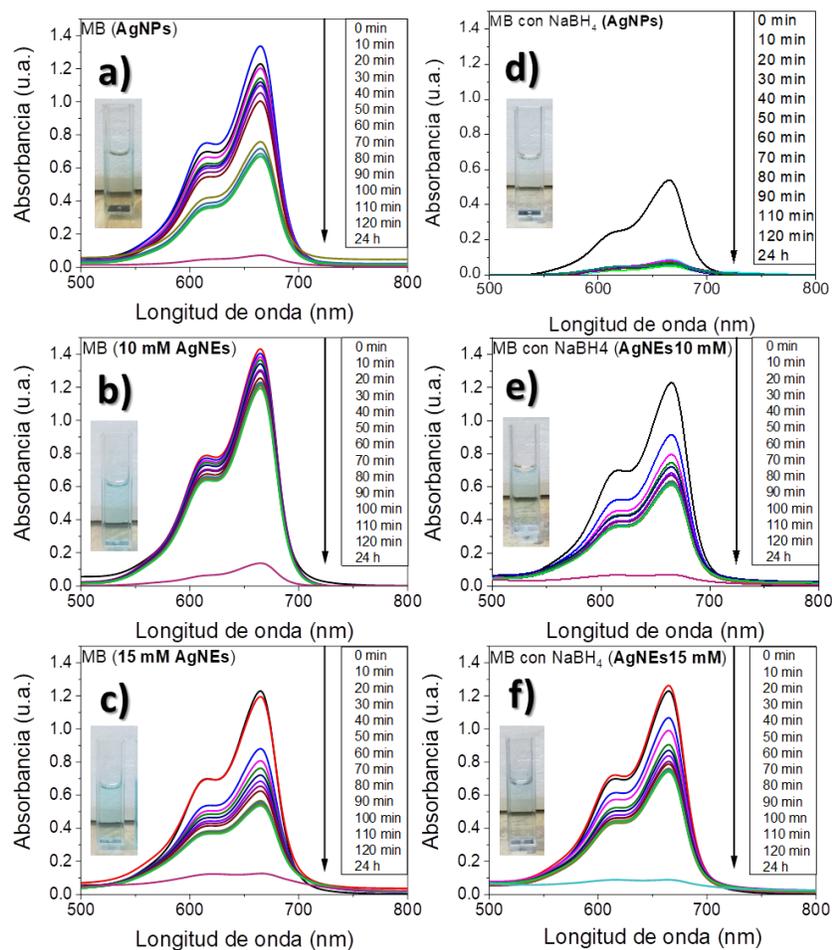


Figura 4.30. Espectros UV-Vis de degradación de MB en ausencia o presencia de NaBH_4 (columna izquierda y derecha, respectivamente) utilizando AgNPs (a, d) y AgNEs a 10 mM (b, e) y 15 mM (c, f).

Tabla 4.4. Resumen cinético del proceso de degradación obtenido en función del tiempo con o sin NaBH_4 como catalizador.

Nanomaterial	Catalizador	Reacción a 120 min (%)	Reacción a 24 h (%)	$K(\text{min}^{-1})$
AgNPs	NaBH_4	94.38	94	0.02495
	-	63.51	95	0.00689
AgNEs 10 mM	NaBH_4	59.31	89	0.01740
	-	16.65	94	0.00171
AgNEs 15 mM	NaBH_4	41.38	90	0.00819
	-	55.18	93	0.01230

La Figura 4.31 ilustra el mecanismo propuesto para la degradación de MB con y sin NaBH_4 utilizando AgNPs y AgNEs como fotocatalizadores. La Ag nanométrica tiene el fenómeno SPR al recibir luz visible, absorbiendo fotones que producen oscilaciones colectivas entre la banda de valencia (BV) y la banda de conducción (BC), generando un par electrón-hueco (e^-/h^+). Así, las moléculas de H_2O se descomponen al reaccionar con los huecos fotogenerados, cediendo sus electrones y produciendo radicales hidroxilo (HO^\cdot) [208, 209]. Si la energía de los fotones incidentes es lo suficientemente energética, el colorante actúa como un fotosensibilizador, se excita y dona su electrón fotogenerado al BC de las partículas de Ag, produciendo la fotooxidación del colorante (reportada regularmente bajo la luz solar) [209, 210]. Además, como el potencial de reducción de MB es bajo (+ 0.01 V), sus moléculas pueden reducirse directamente capturando electrones del BC de las NPs [207]. Sin embargo, también los electrones fotogenerados en el BC de las NPs se transfieren al O_2 superficialmente absorbido produciendo radicales superóxido ($\text{O}_2^\cdot^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La generación de estas especies reactivas también es responsable de la fotodegradación del colorante [17, 210, 211], adicionalmente, en el caso de las pruebas con NaBH_4 como agente reductor. La presencia del ion BH_4^- se asocia con una mayor eficiencia de inyección de electrones, promoviendo el movimiento de cargas a través del fotocatalizador (AgNPs, AgNEs) hacia las moléculas de MB adsorbidas en la superficie. La desorción posterior de moléculas MB incoloras y degradadas proporciona sitios adicionales para la descomposición del colorante [212, 213].

Debido a que los nanomateriales precipitaron unos segundos después de ser agregados a la mezcla de colorantes y permanecieron en reposo durante todo el proceso de degradación, se sugiere que el proceso catalítico en las reacciones sigue una combinación del mecanismo de Langmuir-Hinshelwood, donde las moléculas del colorante son adsorbidas, saturando la superficie de la partícula. Además, el mecanismo de Eley-Rideal menciona que las moléculas de NaBH_4 se adsorben en la superficie y el colorante reacciona sin tocar la superficie [214, 215].

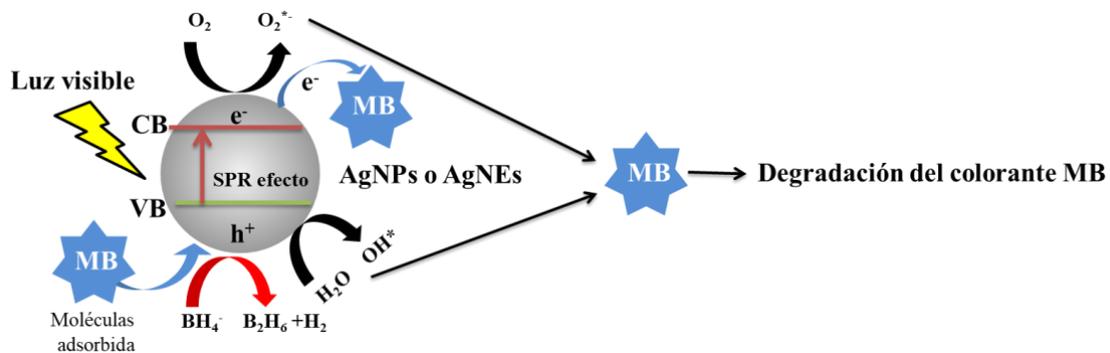


Figura 4.31. Mecanismo propuesto de degradación del colorante azul de metileno utilizando AgNPs y AgNEs con y sin NaBH_4 .

Teniendo en cuenta la mayor eficiencia de degradación por parte de las AgNPs (Figura 4.30a, d), se estudió la variación de la cantidad de AgNPs (0,25-1,5 mg) en la eficiencia de degradación del colorante realizada entre 0-120 min en intervalos de 15 min como se ve en la Figura 4.32(a-f). La intensidad del pico de MB disminuye con la cantidad de AgNPs utilizada, siendo más eficaz a 1.5 mg, donde se produce una degradación del 95 %. Esta eficiencia de degradación fue equivalente a la obtenida utilizando NaBH_4 y 0,5 mg de AgNPs. Al mismo tiempo, también es similar al obtenido después de 24 h de reacción. Mientras tanto, la Figura 4.33(a) muestra la velocidad de degradación registrada para las cantidades anteriores de AgNPs (Figura 4.32). Utilizando 1,5 mg de AgNPs, la velocidad de degradación también es mayor, alcanzando el 98 % en 120 min. En el caso de los AgNEs a 1,5 mg, su rendimiento es inferior al 90 % (véase anexo 3). Esta diferencia en la degradación se atribuye a la disminución del tamaño de la partícula del catalizador. Es bien sabido que cuando el tamaño de las NPs disminuye, el área superficial aumenta, y con ello, el número de átomos de Ag débilmente coordinados, mejorando la adsorción superficial activa que facilita la reducción de MB [216]. Así, los resultados anteriores sugieren que el aumento de la cantidad del catalizador puede conducir a un proceso más rápido y con altas eficiencias en tan solo 120 min debido a la presencia de más partículas fotocatalíticas disponibles, demostrando ser más ecológico sin necesidad de agentes tóxicos externos. Estos resultados son similares a los obtenidos en ausencia de NaBH_4 utilizando una fuente de luz solar y visible [217, 218].

Por otro lado, la Figura 4.33(b) muestra el gráfico de barras con la línea de tendencia (inserto superior izquierdo) en función de la cantidad de AgNPs en la degradación de MB. En este gráfico, el proceso de degradación sigue una tendencia logarítmica en función de la concentración de AgNPs. Asimismo, luego de 120 min de reacción, la concentración mínima de AgNPs a la cual tiene 1% de degradación fue de 0.08 mg de AgNPs, mientras que a 1.6 mg de AgNPs puede llegar a la máxima degradación, 100%.

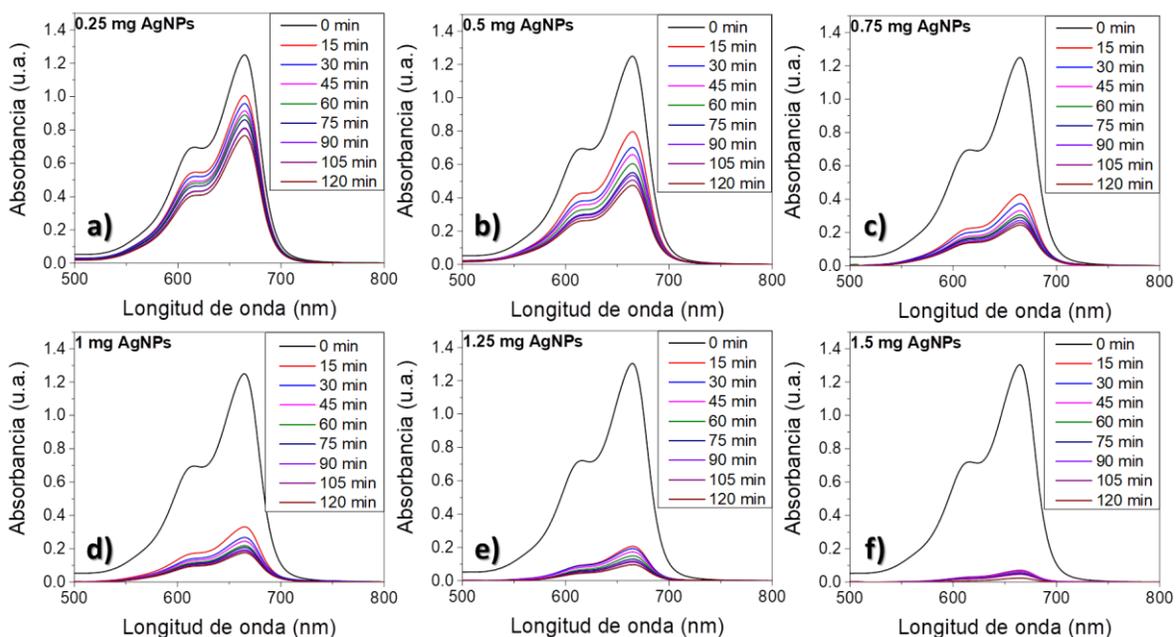


Figura 4.32. Mecanismo propuesto de degradación del colorante azul de metileno utilizando AgNPs y AgNEs con y sin NaBH_4 .

Es fundamental conocer la capacidad de reutilización del material como catalizador en el proceso de degradación. La Figura 4.34(a-e) presenta los espectros UV-Vis del proceso de degradación de MB en presencia de 1.5 mg de AgNPs durante 120 min y 5 ciclos de reutilización de material. Después de cada experimento, el catalizador se recuperó por centrifugación y se secó para el siguiente ciclo sin ningún lavado adicional. La Figura 4.34(f) resume los resultados de degradación obtenidos para cada ciclo. Se observa una alta degradación (90 %) hasta el 3er ciclo, mientras que cae al 66 % en el 5to ciclo, indicando la reciclabilidad y estabilidad del catalizador hasta el 3er ciclo de proceso sin necesidad de tratamiento superficial adicional. Estos resultados se deben a la saturación del área superficial de las AgNPs por los productos adsorbidos durante las reacciones. Por lo tanto, los AgNPs deben lavarse a fondo con agua y etanol después de cada tratamiento para evitar la pérdida de actividad catalítica. Se ha reportado que el lavado de las AgNPs en cada ciclo permite obtener más del 90 % hasta el 5° ciclo [109, 110, 219, 220].

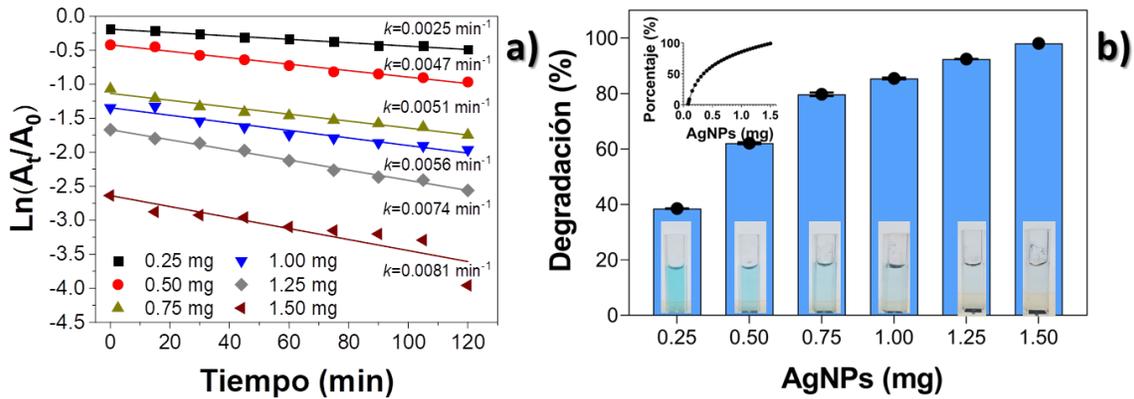


Figura 4.33. Curvas cinéticas de degradación de MB en función de la cantidad de AgNPs (a); gráfico de barras que muestra la línea de tendencia de degradación (inserto superior izquierdo) (b).

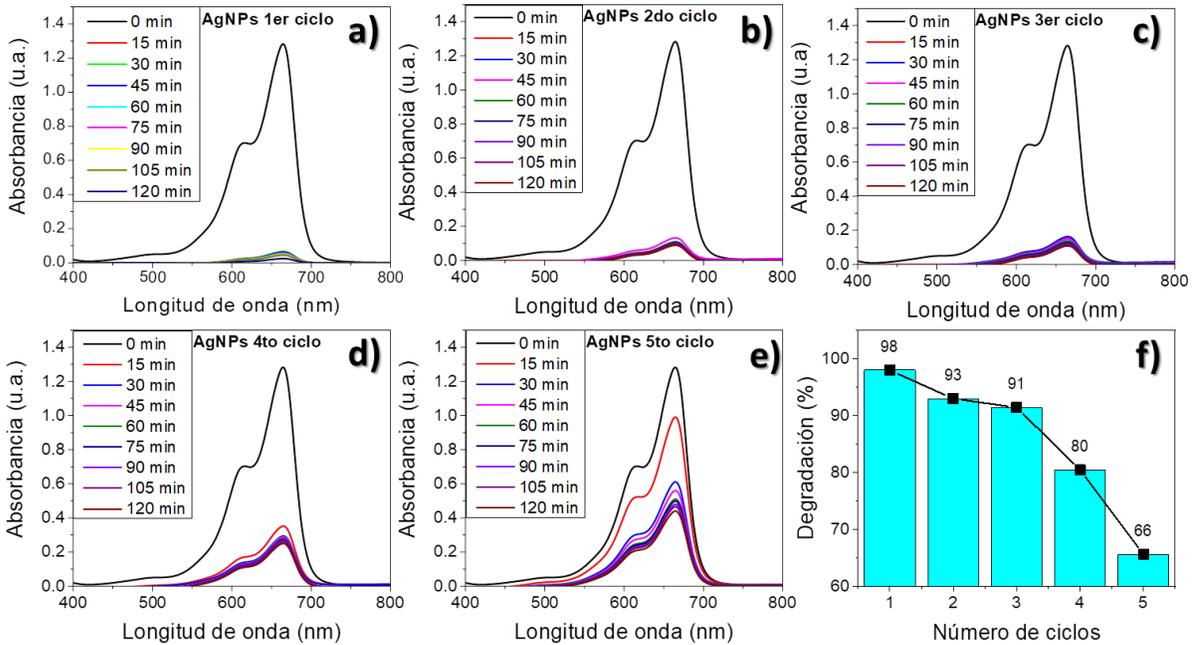


Figura 4.34. Espectros UV-Vis de ciclos de reutilización de AgNPs (a), y gráfico de barras del % de degradación en cada proceso (b).

4.5.2 Actividad antibacterial

La plata ha sido uno de los metales distinguidos en el campo de aplicación en sistemas biológicos y medicina [221]. Se ha utilizado para tratar heridas, quemaduras e infecciones graves [222]. En consecuencia, los nanomateriales a base de plata se han vuelto atractivos en este campo de investigación por su eficacia antimicrobiana contra bacterias multirresistentes, pero aún es necesario reforzar el conocimiento al respecto [222, 223]. El

uso de antibióticos ha provocado que un gran número de microorganismos patógenos desarrollen resistencia a ellos [224]. Por ello, es importante desarrollar nuevos posibles agentes antibacterianos que respondan a un uso alternativo ante este problema. En este apartado se estudia de forma comparativa el efecto antibacteriano de los AgNEs y AgNPs frente a bacterias de tipo Gram positiva y Gram negativa.

Para este propósito se utilizaron AgNPs y AgNEs sintetizados bajo condiciones experimentales 10 mg/mL de extracto de *S. praealtum* y, 5 y 10 mM de AgNO_3 , respectivamente. En la Figura 4.35(a-b) se muestran las AgNPs y AgNEs obtenidos de la reacción de bioreducción. En el inciso a, se resalta la presencia de partículas individuales dispersas de Ag de morfología esférica y tamaño relativamente homogéneo descrito en el histograma (inserto) que proyecta el tamaño de las AgNPs en un rango $\sim 10\text{-}40$ nm con un tamaño promedio de 22 nm. Mientras que en el inciso b, se puede observar una partícula AgNEs, altamente esférico y denso con un diámetro de ~ 4.5 μm , ensamblados por unidades nanométricas superficiales.

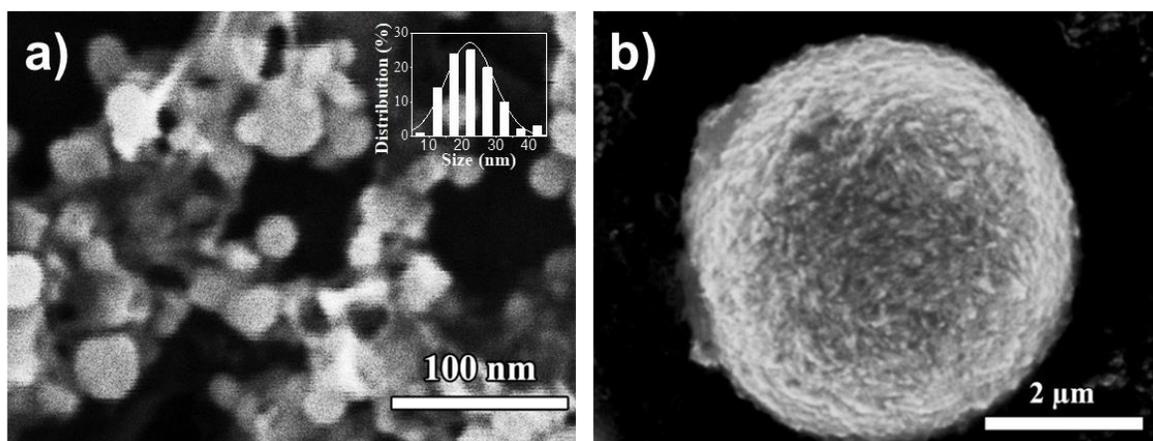


Figura 4.35. Micrografías MEB que muestran AgNPs e histograma de tamaño (a) y una AgNEs esférica (b).

Para la actividad antibacteriana de los AgNEs en forma esférica comparado a las AgNPs frente a *S. aureus* y *E. coli* por medio del método de difusión de disco, se estableció de manera de control positivo y negativo la solución de AgNO_3 (fuente de iones Ag^+) y extracto de *S. praealtum*, respectivamente. En la Figura 4.36 se observan los antibiogramas de las dos cepas bacterianas expuestas a concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs y AgNEs. Los resultados mostraron nula actividad antibacteriana para AgNEs así como para el control (muestra extracto de *S. praealtum*). En tanto, utilizando AgNPs, aparecieron apreciables zonas de inhibición en ambas bacterias a partir de 150 $\mu\text{g/mL}$, al igual que el control que consistió solo en AgNO_3 como fuente de iones Ag^+ (véase anexo 4). Además, las zonas de inhibición en *E. coli* (Gram negativa) son mayores en contraste a las de *S. aureus* (Gram positivas).

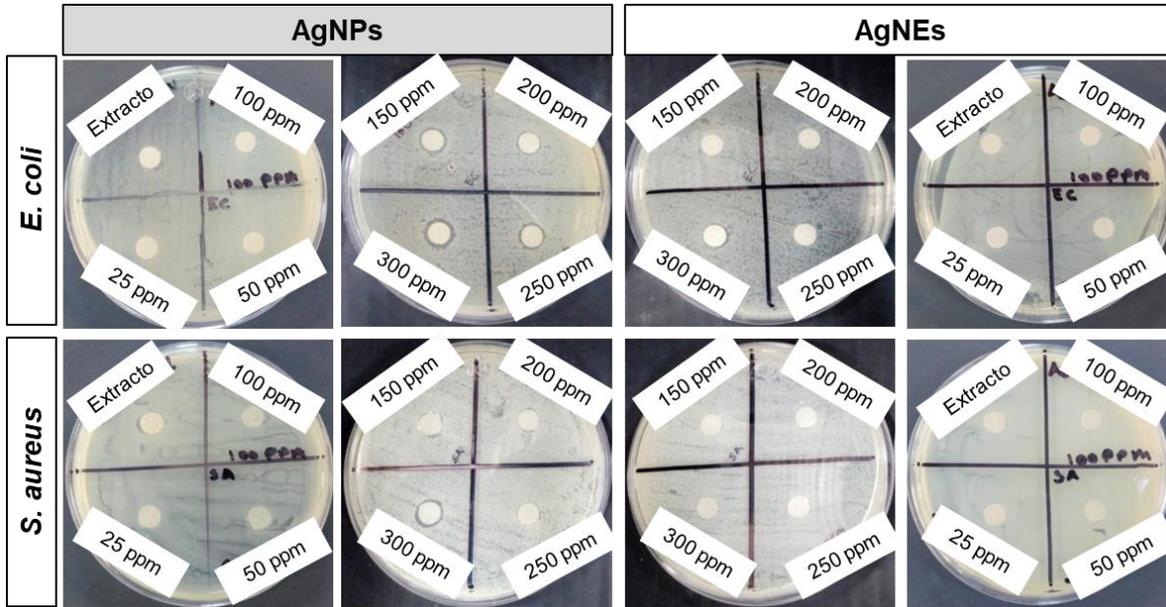


Figura 4.36. Ensayos antibacterianos entre AgNEs y AgNPs en bacterias *E. coli* y *S. aureus* a diferentes concentraciones de nanomateriales.

Al no presentar halo de inhibición por parte de los AgNEs, en la Figura 4.37 se muestra el comportamiento antibacteriano sólo de las AgNPs en función de la concentración. Se encontró que el diámetro de inhibición fue aumentando proporcionalmente a la concentración de AgNPs en ambas cepas de bacterias. Donde, el diámetro de inhibición de AgNPs a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es comparable al control positivo (AgNO_3 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Siento la *E. Coli* la más sensible debido a características propias por ser Gram-negativa, atribuible a las diferencias estructurales de la pared celular compuesta de peptidoglucanos en Gram positivas y, ausente en Gram negativa [225], resultando más susceptibles al contacto con AgNPs como lo afirman otros autores [140]. En estos resultados, es evidente que el tamaño nanométrico por parte de las AgNPs sintetizadas en este trabajo, permite mayor eficacia de interacción con la bacteria. Lo que significa que los factores de tamaño y forma son importantes para la propiedad antibacteriana. Ya que una reducción de tamaño elevara la superficie de contactos, aumentando la liberación de iones de Ag mejorando la toxicidad en bacterias [226, 227].

La actividad antibacteriana de las AgNPs se ha relacionado con i) la acumulación de Ag sobre las membranas celulares de las bacterias, causando la filtración celular; ii) la morfología celular se deforma; iii) inhibe la replicación del DNA y genera su rompimiento; iv) estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), dañinas sobre el DNA y membranas celulares y v) la inactivación de enzimas desnaturizando proteínas [222]. Teniendo como consecuencia por ejemplo, la inhibición del proceso respiratorio, ya que inactivan enzimas inherentes a este proceso bioquímico, dando como resultado la muerte celular. Por ello, para el desarrollo de agentes antimicrobianos efectivos es una de las

principales razones de la síntesis de AgNPs. Debido a que se ha informado que entre más pequeñas son las AgNPs, son más dañinas para las células bacterianas [228].

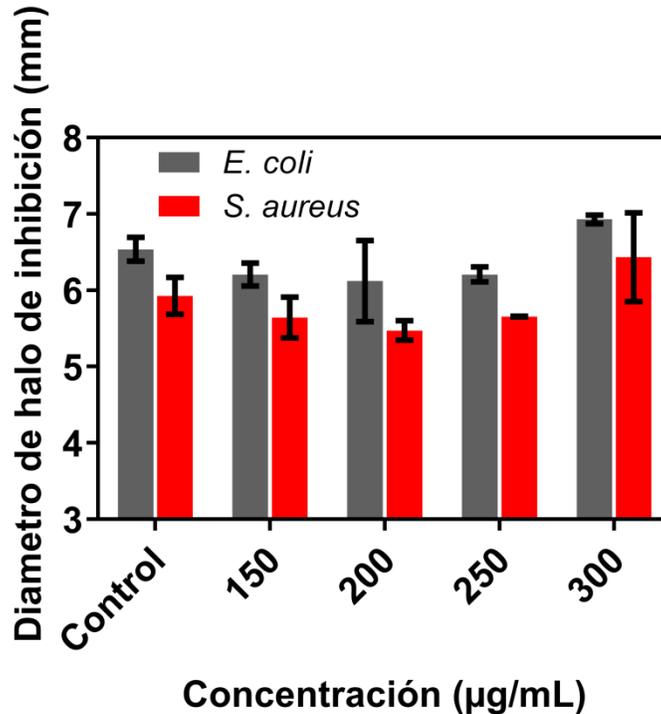


Figura 4.37. Gráfico de barras del diámetro de inhibición bacteriana de AgNPs en contra de *E. coli* y *S. aureus*.

A modo de comparación, se evaluó a mayores concentraciones de AgNEs y AgNPs (200, 250, 300, 350 y 500 µg/mL) (resultados no mostrados) para conocer si existía un valor de MIC. Sin embargo, para ambos casos no se logró obtener el MIC (véase anexo 5). Solamente las AgNPs mostraron una imbibición parcial a partir de los 300 µg/mL. Mediante estos resultados, se sugiere que el recubrimiento por parte de los estabilizadores provenientes del extracto de *S. praealtum* en las AgNPs, influyen actuando como barrera que limita la reactividad y una liberación reducida de iones Ag, lo que disminuye su reactividad y con ello actividad antibacteriana [229]. Por otra parte, los AgNEs, a pesar de estar compuestas de Ag tienen nula utilidad antibacteriana en contraste a las AgNPs. Lo que significa, que el tamaño y la morfología influye de manera importante para esta propiedad en las AgNEs. Ya que para un tamaño grande es difícil una interacción más directa con las células en el medio lo que dificulta la liberación de iones [230]. Además, la morfología altamente esférica de las AgNEs disminuye el área superficial de contacto efectiva, como la que poseen las partículas pequeñas individuales como las AgNPs.

Los resultados de los AgNEs en este trabajo difieren con los encontrados en la literatura al comparar la eficaz actividad antibacteriana de otras estructuras con altas área superficial

expuesta, debido a su arquitectura jerárquica que las componen como nanoestructura dentrítica [231], nanoláminas [9, 225], nanoporos [226]. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, se sugiere que el extracto de *S. praealtum* dota de estabilidad química y física a las AgNPs y AgNEs, ya que al comparar nanoestructuras sintetizadas de manera similar a este trabajo (síntesis verdes) utilizando extracto de plantas como *Hamelia patens* [115] y *Arctostaphylos pungens Kunth* [21] de tipo flor y nanodendritas estas presentan una clase actividad antioxidante ante las mismas cepas bacterianas. Por lo tanto, derivado del recubrimiento de compuestos fitoquímicos de *S. praealtum*, las nanoestructuras de plata evaluadas presentan baja bioactividad en bacterias.

4.5.3 Citotoxicidad en levaduras como modelo eucariota

Con el fin de conocer el comportamiento en cuanto a la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en la Figura 4.38 presenta la curva de crecimiento de la levadura para el medio YPD. En la cual, se puede distinguir visualmente la fase de adaptación aproximadamente de 3 h, seguida de las fases de crecimiento y estacionaria, esta última, sin cambio aparente de crecimiento en el tiempo, después de 15 h iniciado la cinética.

Los parámetros cinéticos exactos del crecimiento de la levadura, presentados en la tabla 4.5, como son la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$); duración de la fase de latencia (λ) y tiempo de generación (G), fueron determinados siguiendo el modelo empírico de Gompertz mediante la siguiente ecuación:

$$Y = ae^{-e^{(b-c*t)}} \quad (4.2)$$

En el cual Y corresponde al log ($\text{DO}_{\text{inicial}}/\text{DO}_{\text{en el tiempo } t}$), la constante $-a$ como la asíntota en máximo crecimiento de las células, $-b$ velocidad máxima decrecimiento, $-c$ como tiempo en el que se da la máxima velocidad de crecimiento y $-t^2$ como el tiempo en h. Se encontró que estos parámetros cinéticos son cercanos a los reportados en otros trabajos utilizando otros medios como caldo de melaza [232].

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos de crecimiento la levadura *S. cerevisiae*.

$\mu_{\text{máx}}$ =	0.6649936 h ⁻¹	velocidad específica de crecimiento
λ =	2.875215641 h	Duración de la fase adaptación
G=	1.042336619 h	Tiempo de generación

Por otro lado, este tipo de estudios preliminares son la base para determinar en qué fase es afectada la levadura. Ya sea que el efecto citotóxico de disminución de crecimiento se deba a un aumento significativo en el tiempo en la etapa de adaptación o, una disminución en la

tasa de crecimiento exponencial. Esto lo demostró Penders y col. [233], al evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de Au con diferentes morfologías sobre bacterias. Indicando que la interacción con materiales nanométricos, induce estrés local en las bacterias lo que provoca una disminución de la tasa de crecimiento y/o un aumento de la etapa de latencia o adaptación. Además se ha utilizado este modelo cinético de crecimiento en estudios antimicrobianos de las AgNPs contra bacterias *E. coli* y *S. aureus*.

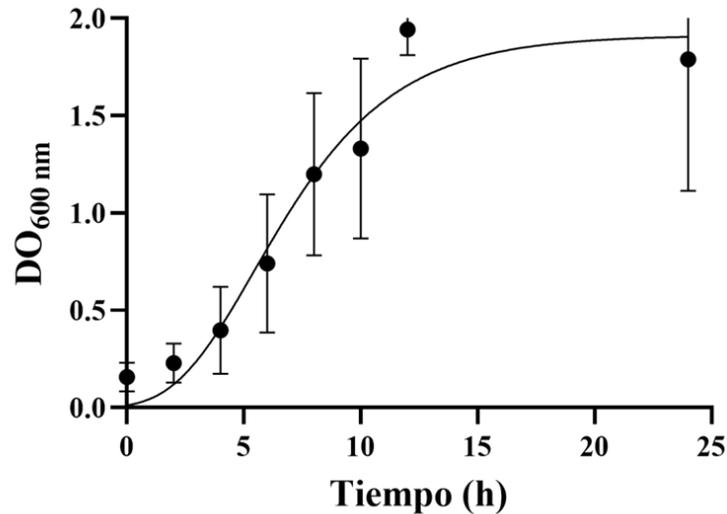


Figura 4.38. Modelo de Gompertz para crecimiento de *S. cerevisiae*.

Como efecto de toxicidad, se evaluó la inhibición del crecimiento celular para determinar el efecto toxicológico de los AgNEs y AgNPs utilizando la cepa *S. cerevisiae* como modelo para células eucariotas. La Figura 4.39 presenta el gráfico correspondiente a la prueba de crecimiento de levadura después de haber sido expuesto a concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNEs y AgNPs. Como control negativo y positivo se evaluó a la misma concentración en solución AgNO_3 como fuente de iones Ag^+ y extracto de *S. praealtum*, respectivamente. Como control blanco se utilizó solo levaduras en medio de cultivo. Los resultados no revelan un efecto toxicológico significativo tanto de los componentes fitoquímicos del extracto como en AgNEs. Sin embargo, las muestras de AgNO_3 y AgNPs presentaron inhibición de crecimiento de la levadura, al disminuir con respecto al control en un 95 % (AgNO_3) y 11 % (AgNPs).

En relación a los resultados mostrados anteriormente, donde los AgNPs no presentaron efecto citotóxico alguno y, la toxicidad mostrada solamente por las muestras de AgNO_3 y AgNPs, se realizó la evaluación de inhibición de crecimiento de *S. cerevisiae* a concentración de AgNPs menores y mayores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (20, 40, 60, 80, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$). En la Figura 4.40 se muestra el gráfico correspondiente a la prueba de crecimiento de levadura a diferentes concentraciones de AgNPs. Se observa en la Figura que para 20

$\mu\text{g/mL}$ y $40 \mu\text{g/mL}$ de AgNPs, el crecimiento disminuye con respecto al control en un 4% y un 7%, respectivamente. Además, a la concentración de $60 \mu\text{g/mL}$, el crecimiento se inhibe en un 12 %, y así para dosis más altas de AgNPs.

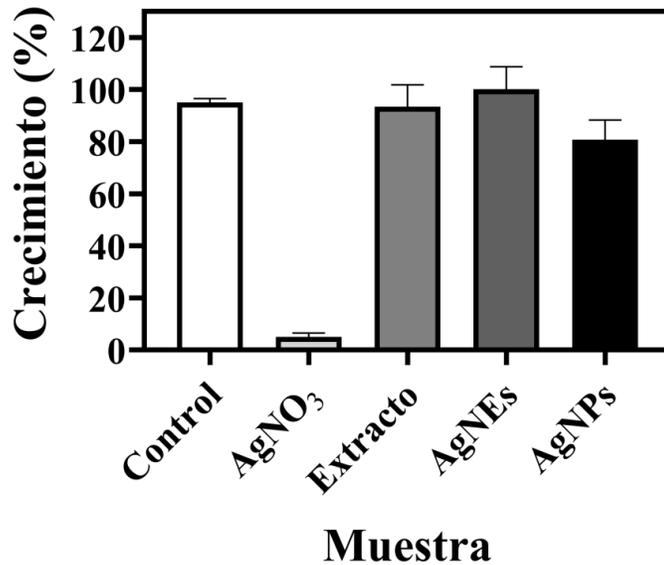


Figura 4.39. Efecto de inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* W303-1 expuesto a muestras de AgNO₃, extracto, AgNEs y AgNPs. Los valores se presentan como la media \pm DE.

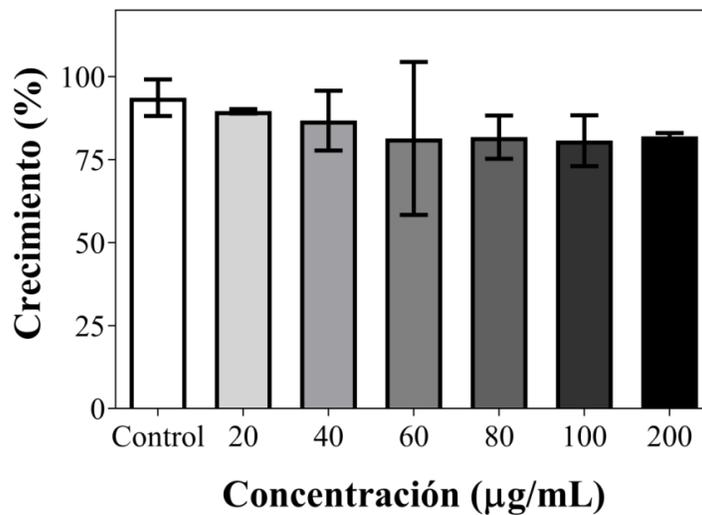


Figura 4.40. Efecto de inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* W303-1 expuesto a diferentes concentraciones de AgNPs.

Para conocer si los datos arrojados por el ensayo de crecimiento que muestran inhibición en presencia de AgNPs y AgNO₃ son resultados de daño por muerte celular se realizó el ensayo de viabilidad por azul de tripano. En la Figura 4.41 se presentan imágenes tomadas a partir del microscopio óptico de las muestras celulares expuestas a azul de tripano

(extracto, AgNPs y AgNO₃) y un close up, la muestra de AgNO₃ que esquematiza la identificación de células viables (blancas) y células muertas (teñidas). Como se puede observar, todas las muestras excepto la muestra tratada con AgNO₃ exhiben 100 % de viabilidad, ya que en ninguna imagen existe la presencia de células muertas (teñidas). Sin embargo, en la muestra con AgNO₃ claramente se observa poca cantidad de unidades celulares y de éstas, gran porcentaje se encuentran teñidas de azul de tripano, lo que indica daño celular letal debido a la disrupción de la membrana celular, misma que permite el ingreso de colorante dentro de la levadura. Con base a lo anterior, se evaluó la disminución de viabilidad de AgNO₃ a diferentes concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL (Figura 4.42), encontrando valores de viabilidad de 24, 16 y 6 %, respectivamente. Lo que demuestra que, el daño a las células de levaduras por parte de las AgNPs apunta ser de tipo estrés en las fases de crecimiento.

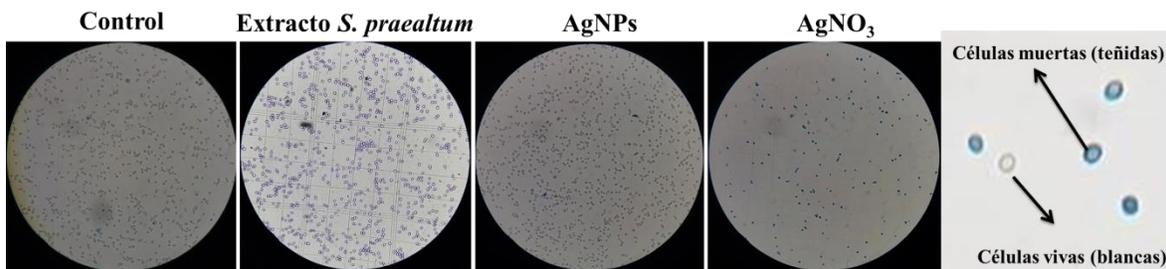


Figura 4.41. Citotoxicidad celular de *S. cerevisiae* expuestas a extracto *S. praealtum*, AgNPs y AgNO₃ mediante el ensayo de viabilidad celular por azul de tripano y representación de células vivas y muertas.

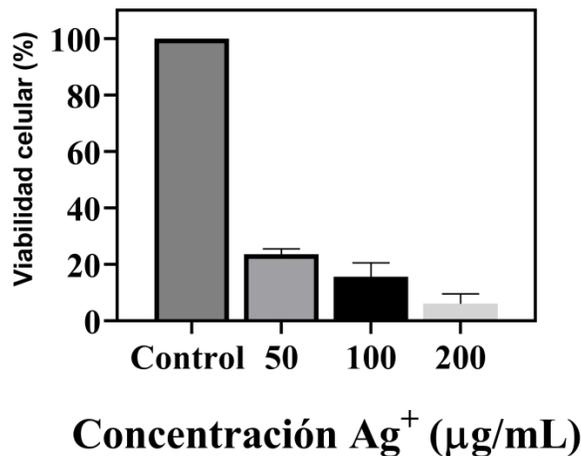


Figura 4.42. Viabilidad celular de *S. cerevisiae* expuesta a diferentes concentraciones de AgNO₃ mediante azul de tripano.

Al no exhibir un daño celular letal aparente en las levaduras por exposición con AgNPs, se exploró un posible mecanismo de su citotoxicidad, en células eucariotas debido al estrés oxidativo midiendo la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS mediante

espectroscopía de fluorescencia [234]. Para esto, en la Figura 4.43 se presentan los resultados en un gráfico de barras el porcentaje de generación de EROs respecto al control (0 $\mu\text{g/mL}$) expresado como media \pm desviación estándar (DE) para diferentes concentraciones de AgNPs (50, 150 y 250 $\mu\text{g/mL}$). Se produce un aumento proporcional de las barras hasta un 20 y un 42%, correspondiente a las concentraciones de 50 y 150 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esta tendencia revela que las AgNPs provocaron la producción de EROs. Sin embargo, a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje de ROS generado se mantuvo constante en 42 %, lo que sugiere que las EROs generadas en el rango de 150–250 $\mu\text{g/mL}$ no dependieron de la concentración de AgNPs.

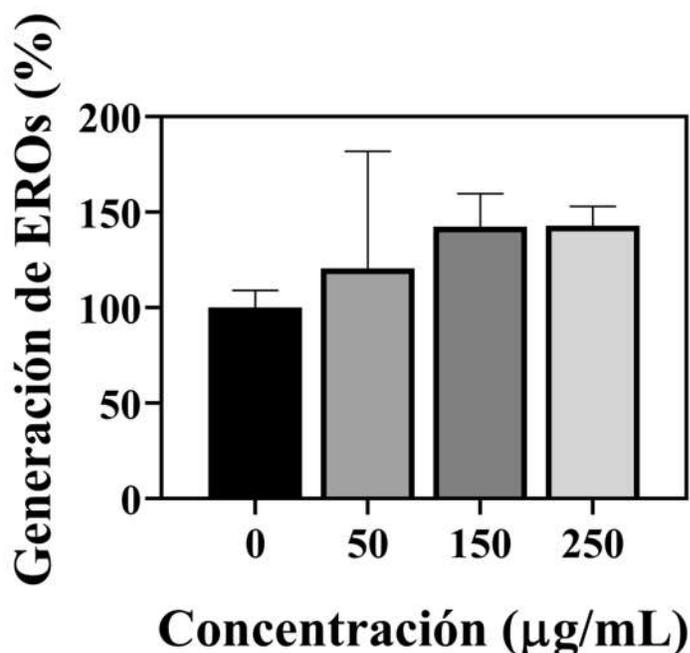


Figura 4.43. Producción relativa de ROS en células de levadura *S. cerevisiae* bajo exposición a diferentes concentraciones de AgNPs (0, 50, 150 y 250 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h.

Se ha reportado en la literatura potenciales aplicaciones en catálisis, fotoluminiscencia y fluorescencia mejorada en superficie, debido a que contienen proporciones de superficie a masa, altas densidades de bordes, esquinas y partículas dispuestas en forma escalonadas en sus nanopétalos [9]. Sin embargo, los AgNEs sintetizados en este trabajo parecen tener una nula reactividad, aun cuando contienen todas las anteriores características morfológicas y estructurales de una estructura jerárquica autoensamblada. Lo que señala, que el tamaño y la estabilidad fitoquímica influyen en esta baja bioactividad por parte de los AgNEs en levaduras.

Mientras tanto, la toxicidad de AgNPs y AgNO_3 en la levadura parece ser atribuido principalmente a la liberación y presencia de iones Ag^+ . Sin embargo, el tamaño también

influye, ya que la media de las AgNPs sintetizadas fue de 14 nm y mostró menor toxicidad que las AgNPs más pequeñas (10 nm) obtenidas por otros autores [235]. Además, basándose en el análisis de formación de AgNPs en secciones previas, en las que se señala a los glucósidos como los principales participantes en la reducción, estabilización y ligante. Se sugiere que los glucósidos que estabilizan las AgNPs pueden reducir la toxicidad de las nanoestructuras, dado un contacto multivalente entre la pared de la levadura y los azúcares [177, 236]. Es decir, los monómeros de azúcar podrían disminuir significativamente la toxicidad debido a la biocompatibilidad de estas moléculas con los sistemas biológicos [173, 177, 237].

Otros investigadores han demostrado la biocompatibilidad de las AgNPs sintetizadas por extractos naturales con respecto a las AgNPs sintetizadas por vías químicas bajo diferentes modelos de células eucariotas. Por ejemplo, utilizando líneas celulares de fibroblastos humanos, las AgNPs obtenidas por rutas convencionales tienen una toxicidad superior al 50 % utilizando 120 µg/mL de AgNPs. En tanto, al usar 240 µg/mL de AgNPs sintetizadas por métodos verdes, la toxicidad alcanza alrededor del 20% [238]. En otro trabajo [239], la toxicidad fue inferior al 5% utilizando 18 µg/mL de AgNPs obtenidas con el extracto de *Salacia Chinensis*. Asimismo, 10 µg/mL de AgNPs comerciales disminuyen la viabilidad en *S. cerevisiae* hasta en un 64% [240]. En contraste, las AgNPs biosintetizadas por extracto acuoso de cáscaras de marañón presentan una toxicidad de aproximadamente 40% [241] considerando la norma ISO 10993-5:2009 para la evaluación biológica de dispositivos médicos. Se establece un efecto citotóxico para una reducción del crecimiento superior al 30%. Por lo tanto, las AgNPs sintetizadas con extracto de *S. praealtum* que muestran una inhibición máxima del crecimiento del 12 % pueden considerarse seguras para su aplicación con células eucariotas.

Por su parte, los resultados arrojados por el ensayo de EROs difieren de algunos encontrados en la literatura, demostrando el efecto tóxico dependiente de la concentración. Por ejemplo, Chairuangkitti y col. [242] establecieron que la disminución de la viabilidad de las células de carcinoma de pulmón humano expuestas a AgNPs se debió a un aumento de EROs debido a la concentración de NPs. Por otro lado, Babele y col. [243] mostró la misma tendencia de generación de EROs en *S. cerevisiae* con la concentración de AgNPs biosintetizada por el extracto de *grosella espinosa*.

Por el contrario, Kasemets y col. [118] obtuvieron una disminución en la generación de EROs en *S. cerevisiae* con el aumento de AgNPs, recubiertas de caseína y polivinilpirrolidona (PVP), atribuyendo principalmente la toxicidad a la liberación de iones Ag^+ . Mientras que Chang y col. [234] presentaron un comportamiento de disminución de EROs a la concentración de 100 µg/mL de AgNPs en una línea celular derivada del hipocampo de ratón, atribuido al daño mitocondrial con dosis crecientes de AgNPs. Por lo

tanto, a altas concentraciones de AgNPs, en ausencia de inhibición de EROs, se considera que no hay daño mitocondrial irreversible, como se muestra en otros trabajos [244, 245].

Estos datos se correlacionan directamente con los obtenidos de la prueba de crecimiento y viabilidad por azul de tripano, donde no hubo un aumento considerable en la inhibición después de 100 µg/mL de AgNPs. Por lo tanto, los resultados muestran que las AgNPs inducen un bajo porcentaje de citotoxicidad al inhibir el crecimiento celular través del estrés oxidativo intracelular con producción de EROs. En consecuencia, se propone que tanto el tamaño como los agentes protectores superficiales de las NPs, de fitoquímicos provenientes de *S. praealtum* ayuden a disminuir la toxicidad de las nanoestructuras, sintetizadas con extracto acuoso de *S. praealtum*, en la levadura.



CAPÍTULO

5

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, fue posible la síntesis de AgNEs y AgNPs mediante síntesis verde empleando el extracto acuoso de la planta *S. praealtum*. La planta *S. praealtum* ofrece ventajas fitoquímicas para ser utilizado en la síntesis de nanomateriales por reducción química verde. Siendo posible obtener diferentes tamaños y morfologías en partículas de Ag en función de la concentración de extracto, sal, así como de la temperatura de reacción y agitación.

Se determinó que la concentración del extracto en la síntesis induce el crecimiento de nanoestructuras como consecuencia al exceso de iones de Ag^+ reducidos y la cantidad de estabilizantes-ligantes que participan como agentes de dirección. De la misma forma, un exceso de Ag^+ debida a la concentración de sal precursora, permite un exceso de iones que se depositan sobre la superficie por difusión y permiten el crecimiento y formación de AgNEs, ya que bajas concentración solo permitió formar AgNPs.

Mientras tanto, cuando se usó una temperatura de reacción por encima de temperatura ambiente aumenta la velocidad de reducción de Ag y también facilita la agregación de AgNPs, al igual que una agitación mecánica que induce un crecimiento agregativo en menor tiempo.

Los resultados obtenidos por técnicas espectroscópicas como ^1H RMN, FTIR y UV-Vis, junto con los conseguidos por cuantificación fitoquímica y actividad quelante, señalaron a los compuestos glucósidos como los compuestos principales que participaron en la reducción y formación de AgNEs y AgNPs. También, señalaron que los grupos carboxilatos formados por la oxidación de azúcares reductores tienen interacción con la superficie de las partículas de Ag. Sin embargo, un análisis espectroscópico más profundo reveló que también moléculas de flavonoides glicosilados participan en la formación de AgNEs.

Al evaluar las propiedades catalíticas, antibacteriales y citotóxicas de forma comparativa entre AgNEs y AgNPs, se determinó que tanto las AgNEs como las AgNPs son catalizadores eficientes para degradar colorantes orgánicos con eficacias de degradación del 90 % para AgNEs y 98 % para AgNPs a sólo 120 min. Además, se motró una eficacia por encima del 90 % después de 24 h, incluso sin un agente reductor adicional (NaBH_4). Por otra parte, las AgNPs presentaron actividad antibacterial parcial contra las bacterias *E. coli* Gram negativa y *S. aureus* Gram positiva, en tanto los AgNEs poseen baja bioactividad al no presentar efecto antibacterial para las mismas cepas.

Asimismo, los AgNEs no presentaron citotoxicidad aparente sobre la levadura *S. cerevisiae* como modelo de célula eucariota. En tanto, las AgNPs muestran toxicidad relativamente baja. La baja bioactividad por parte de las partículas de plata de este trabajo se le atribuye a

la diferencia de tamaño de las partículas y al recubrimiento por parte de las biomoléculas del extracto de *S. praealtum* que estabilizan creando una barrera físico-química que evita la interacción entre las NP y la membrana de la pared celular, evitando una mayor toxicidad. Estableciendo que el principal mecanismo de acción de las AgNPs sobre las levaduras, es la incitar un grado de estrés oxidativo.

CAPÍTULO

6

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KANG L, XU P, CHEN D, ZHANG B, DU Y, HAN X, LI Q, WANG H-L. Amino Acid-Assisted Synthesis of Hierarchical Silver Microspheres for Single Particle Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 117(19). 10007-10012, 2013.
- [2] ZENG M, CAO H, ZHANG Q, GAO X, FU L. Self-Assembly of Metal Oxide Nanoparticles in Liquid Metal toward Nucleation Control for Graphene Single-Crystal Arrays. *Chem*. 4(3). 626-636, 2018.
- [3] BHOSALE S V, AL KOBASI M, JADHAV R W, JONES L A. Flower-Like Superstructures: Structural Features, Applications and Future Perspectives. *The Chemical Record*. 21(2). 257-283, 2021.
- [4] WANG A, HUANG J, YAN Y. Hierarchical molecular self-assemblies: construction and advantages. *Soft Matter*. 10(19). 3362-3373, 2014.
- [5] LANDEROS-PÁRAMO L, SAAVEDRA-MOLINA A, CHOLICO-GONZÁLEZ D, ROSAS G. A comparative study of the catalytic activity between Ag nanoparticles and Ag flower-like particles synthesized by the *Sedum praealtum* aqueous extract. *Particulate Science and Technology*. 1-12, 2022.
- [6] LUO M, SONG Y, DAI L L. Heterogeneous or competitive self-assembly of surfactants and nanoparticles at liquid-liquid interfaces. *Molecular Simulation*. 35(10-11). 773-784, 2009.
- [7] MA K, GONG Y, AUBERT T, TURKER M Z, KAO T, DOERSCHUK P C, WIESNER U. Self-assembly of highly symmetrical, ultrasmall inorganic cages directed by surfactant micelles. *Nature*. 558(7711). 577-580, 2018.
- [8] XU L, HAN G, HU J, HE Y, PAN J, LI Y, XIANG J. Hydrophobic coating- and surface active solvent-mediated self-assembly of charged gold and silver nanoparticles at water-air and water-oil interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 11(30). 6490-6497, 2009.
- [9] MOLINA G A, ESPARZA R, LÓPEZ-MIRANDA J L, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ A R, ESPAÑA-SÁNCHEZ B L, ELIZALDE-PEÑA E A, ESTEVEZ M. Green synthesis of Ag nanoflowers using *Kalanchoe Daigremontiana* extract for enhanced photocatalytic and antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 180. 141-149, 2019.
- [10] SHIN J W, LIM H-R, CHO H-B, KWON Y-T, CHOA Y-H. Segregation-controlled self-assembly of silver nanowire networks using a template-free solution-based process. *Nanoscale*. 13(18). 8442-8451, 2021.
- [11] CHEN M, NIU X, YU P, LI Q, LI Y, LI X, ADNAN K. Numerical investigation of magnetic-field induced self-assembly of nonmagnetic particles in magnetic fluids. *Journal of Fluids and Structures*. 97. 103008, 2020.

- [12] MOGHIMI-RAD J, ISFAHANI T D, HADI I, GHALAMDARAN S, SABBAGHZADEH J, SHARIF M. Shape-controlled synthesis of silver particles by surfactant self-assembly under ultrasound radiation. *Applied Nanoscience*. 1(1). 27-35, 2011.
- [13] LI H, YAN Y, GU X, JIAO L, PENG H, CUI W. Organic-inorganic hybrid based on co-assembly of polyoxometalate and dopamine for synthesis of nanostructured Ag. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 538. 513-518, 2018.
- [14] LI M, CAI Y-N, PENG C-F, WEI X-L, WANG Z-P. DNA dendrimer-templated copper nanoparticles: self-assembly, aggregation-induced emission enhancement and sensing of lead ions. *Microchimica Acta*. 188(10). 346, 2021.
- [15] M. ABDUL HAKKEEM H, BABU A, KUMAR PAL S, PEER MOHAMED A, KUMAR GHOSH S, PILLAI S. Cellulose nanocrystals directed in-situ assembly of Au@Ag nanostructures with multifunctional activities. *Microchemical Journal*. 168. 106393, 2021.
- [16] ROOPAN S M, ROHIT, MADHUMITHA G, RAHUMAN A A, KAMARAJ C, BHARATHI A, SURENDRA T V. Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*. 43. 631-635, 2013.
- [17] ARAVIND M, AHMAD A, AHMAD I, AMALANATHAN M, NASEEM K, MARY S M M, PARVATHIRAJA C, HUSSAIN S, ALGARNI T S, PERVAIZ M, ZUBER M. Critical green routing synthesis of silver NPs using jasmine flower extract for biological activities and photocatalytical degradation of methylene blue. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 9(1). 104877, 2021.
- [18] BEHZAD F, NAGHIB S M, KOUHBANANI M A J, TABATABAEI S N, ZARE Y, RHEE K Y. An overview of the plant-mediated green synthesis of noble metal nanoparticles for antibacterial applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 94. 92-104, 2021.
- [19] AHN E-Y, PARK Y. Anticancer prospects of silver nanoparticles green-synthesized by plant extracts. *Materials Science and Engineering: C*. 116. 111253, 2020.
- [20] CARBONE K, PALIOTTA M, MICHELI L, MAZZUCA C, CACCIOTTI I, NOCENTE F, CIAMPA A, DELL'ABATE M T. A completely green approach to the synthesis of dendritic silver nanostructures starting from white grape pomace as a potential nanofactory. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(5). 597-609, 2019.
- [21] GONZÁLEZ-GARCÍA G, BORJAS-GARCÍA S E, LANDEROS-PARAMO L, SALINAS-DELGADO Y, BRETADO-ARAGÓN L A, ROSAS G. Ag Nanoflowers and Nanodendrites Synthesized by a Facile Method and Their Antibacterial Activity. *Journal of Cluster Science*. 2022.
- [22] DEL MORAL-G A, LÓPEZ-LUKE T, SAAVEDRA-MOLINA A, GÓMEZ-HURTADO M A, ROSAS G. Time-dependent eco-friendly method to produce Au

- nanometric assemblies with fluorescent properties. *Journal of Crystal Growth*. 564. 126130, 2021.
- [23] CHÁVEZ K, ROSAS G. Facile synthesis of self-assembling silver spheres and evaluation of their catalytic properties in organic dyes degradation. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 97(2). 320-328, 2021.
- [24] SILVA-TORRES R, MONTELLANO-ROSALES H, RAMOS-ZAMORA D, CASTRO-MUSSOT M E, CERDA-GARC A-ROJAS C M. Spermicidal activity of the crude ethanol extract of *Sedum praealtum* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 85(1). 15-17, 2003.
- [25] BORIOLLO M F G, MARQUES M B, DA SILVA T A, DA SILVA J J, DIAS R A, SILVA FILHO T H N, MELO I L R, DOS SANTOS DIAS C T, BERNARDO W L D C, DE MELLO SILVA OLIVEIRA N, PETERS V M, HÖFLING J F, SPOLIDORIO D M P. Antimicrobial potential, phytochemical profile, cytotoxic and genotoxic screening of *Sedum praealtum* A. DC. (balsam). *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 20(1). 133, 2020.
- [26] CASTRO-MUSSOT M E, SILVA-TORRES R, MELÉNDEZ-CAMARGO E. Anti-inflammatory and anti-phagocytic activities in the extract of *Sedum praealtum* (Siempreviva). *Mechanism and action of phytoconstituents*. 1-8, 2011.
- [27] HASSAN M H A, ELWEKEEL A, MOAWAD A, AFIFI N, AMIN E, AMIR D E. Phytochemical constituents and biological activity of selected genera of family Crassulaceae: A review. *South African Journal of Botany*. 141. 383-404, 2021.
- [28] DE MELO G O, MALVAR D D C, VANDERLINDE F A, ROCHA F F, PIRES P A, COSTA E A, DE MATOS L G, KAISER C R, COSTA S S. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 124(2). 228-232, 2009.
- [29] DEL CARMEN BELTRÁN-OROZCO M, RASCÓN J J O, CEDILLO F D, TORRES R S. Chemical composition and antioxidant ability of the crude extract of *Sedum praealtum* flowers. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 778-784, 2013.
- [30] HUGGIAS S, BOLLA P A, AZCARATE J C, SERRADELL M A, CASELLA M L, PERUZZO P J. Noble metal nanoparticles-based heterogeneous bionano-catalysts supported on S-layer protein/polyurethane system. *Catalysis Today*. 372. 98-106, 2021.
- [31] FU Y, YIN Z, QIN L, HUANG D, YI H, LIU X, LIU S, ZHANG M, LI B, LI L, WANG W, ZHOU X, LI Y, ZENG G, LAI C. Recent progress of noble metals with tailored features in catalytic oxidation for organic pollutants degradation. *Journal of Hazardous materials*. 422. 126950, 2022.
- [32] PARVATHIRAJA C, SHAILAJHA S, SHANAVAS S, GURUNG J. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Cyperus pangorei* and its potential in structural, optical and catalytic dye degradation. *Applied Nanoscience*. 11(2). 477-491, 2021.

- [33] QI L, ZHANG K, QIN W, HU Y. Highly efficient flow-through catalytic reduction of methylene blue using silver nanoparticles functionalized cotton. *Chemical Engineering Journal*. 388. 124252, 2020.
- [34] WASILEWSKA A, KLEKOTKA U, ZAMBRZYCKA M, ZAMBROWSKI G, ŚWIĘCICKA I, KALSKA-SZOSTKO B. Physico-chemical properties and antimicrobial activity of silver nanoparticles fabricated by green synthesis. *Food Chemistry*. 400. 133960, 2023.
- [35] ASONG J A, FRIMPONG E K, SEEPE H A, KATATA-SERU L, AMOO S O, AREMU A O. Green Synthesis of Characterized Silver Nanoparticle Using *Cullen tomentosum* and Assessment of Its Antibacterial Activity. Disponible en:
- [36] SINGH C, ANAND S K, UPADHYAY R, PANDEY N, KUMAR P, SINGH D, TIWARI P, SAINI R, TIWARI K N, MISHRA S K, TILAK R. Green synthesis of silver nanoparticles by root extract of *Premna integrifolia* L. and evaluation of its cytotoxic and antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*. 297. 127413, 2023.
- [37] MAJEED S, SARAVANAN M, DANISH M, ZAKARIYA N A, IBRAHIM M N M, RIZVI E H, NISAANDRABI S U, BARABADI H, MOHANTA Y K, MOSTAFAVI E. Bioengineering of green-synthesized TAT peptide-functionalized silver nanoparticles for apoptotic cell-death mediated therapy of breast adenocarcinoma. *Talanta*. 253. 124026, 2023.
- [38] VILLALPANDO M, GÓMEZ-HURTADO M A, ROSAS G, SAAVEDRA-MOLINA A. Ag nanoparticles synthesized using *Lavandula angustifolia* and their cytotoxic evaluation in yeast. *Materials Today Communications*. 31. 103633, 2022.
- [39] RASHEED T, BILAL M, LI C, NABEEL F, KHALID M, IQBAL H M. Catalytic potential of bio-synthesized silver nanoparticles using *Convolvulus arvensis* extract for the degradation of environmental pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 181. 44-52, 2018.
- [40] KANCHI S, AHMED S. Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and their Applications. ed. Wiley, 2018.
- [41] PRABHU S, POULOSE E K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2(1). 32, 2012.
- [42] KULKARNI S K. Nanotechnology: Principles and Practices. ed. Springer International Publishing, 2014.
- [43] MURTY B S, SHANKAR P, RAJ B, RATH B B, MURDAY J. Textbook of Nanoscience and Nanotechnology. ed. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [44] K C K, N A. Introduction To Nanoscience And Nanotechnology. ed. Prentice-Hall Of India Pvt. Limited, 2009.
- [45] HULLA J E, SAHU S C, HAYES A W. Nanotechnology: History and future. *Human & Experimental Toxicology*. 34(12). 1318-1321, 2015.

- [46] VARADAN V K. Nanoscience and Nanotechnology in Engineering. ed. World Scientific, 2010.
- [47] BAIG N, KAMMAKAKAM I,FALATH W. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*. 2(6). 1821-1871, 2021.
- [48] RANI U A, NG L Y, NG C Y,MAHMOUDI E. A review of carbon quantum dots and their applications in wastewater treatment. *Advances in Colloid and Interface Science*. 278. 102124, 2020.
- [49] BUZEA C,PACHECO I. Nanomaterials and their Classification. ed. New Delhi. Springer India, 2017.
- [50] GOGOTSI Y. Nanomaterials Handbook. ed. CRC Press, 2006.
- [51] HARISH V, TEWARI D, GAUR M, YADAV A B, SWAROOP S, BECHELANY M,BARHOUM A. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: Bioimaging, Biosensing, Drug Delivery, Tissue Engineering, Antimicrobial, and Agro-Food Applications. Disponible en:
- [52] ANTELO QUEIJO Á. Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares. ed. Univ Santiago de Compostela, 2008.
- [53] DOMINGO P A S. La nanotecnología. ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2010.
- [54] SALEH T A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*. 20. 101067, 2020.
- [55] GARCÍA MARTÍNEZ J, ABELLÁN SÁEZ G, CARRILLO GÓMEZ A I,LINARES PÉREZ N. Nanomateriales para aplicaciones avanzadas. 2006.
- [56] ASMATULU R. Nanotechnology Safety. ed. Elsevier Science, 2013.
- [57] GARCIA-MARTINEZ J, ABELLÁN SÁEZ G, CARRILLO GÓMEZ A I,LINARES PÉREZ N. Nanomateriales para aplicaciones avanzadas. 2006.
- [58] BHAGYARAJ S M, OLUWAFEMI S O, KALARIKKAL N,THOMAS S. Synthesis of Inorganic Nanomaterials: Advances and Key Technologies. ed. Elsevier Science, 2018.
- [59] SRIVASTAVA N, SRIVASTAVA M, MISHRA P K,GUPTA V K. Green Synthesis of Nanomaterials for Bioenergy Applications. ed. Wiley, 2020.
- [60] KHAN I, SAEED K,KHAN I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017.
- [61] OLUWAFEMI O S, VUYELWA N, SCRIBA M,SONGCA S P. Green controlled synthesis of monodispersed, stable and smaller sized starch-capped silver nanoparticles. *Materials Letters*. 106. 332-336, 2013.
- [62] MARTOS J M M, DE PAULA GÓMEZ CUEVAS F,FÍSICO J C. Ciencia e ingeniería de los materiales. ed. Ediciones Paraninfo, S.A, 2014.

- [63] MANN S. Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions. *Nature Materials*. 8(10). 781-792, 2009.
- [64] CARBONE K, PALIOTTA M, MICHELI L, MAZZUCA C, CACCIOTTI I, NOCENTE F, CIAMPA A, DELL'ABATE M T. A completely green approach to the synthesis of dendritic silver nanostructures starting from white grape pomace as a potential nanofactory. *Arabian Journal of Chemistry*. 2018.
- [65] TRAN Q H, LE A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 4(3). 033001, 2013.
- [66] MOHAPATRA S, NGUYEN T A, NGUYEN-TRI P. Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles: Fundamentals and Applications. ed. Elsevier Science, 2018.
- [67] SHUKLA A K, IRAVANI S. Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles. ed. Elsevier Science, 2018.
- [68] SADEGHI B, GHOLAMHOSEINPOOR F. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134. 310-315, 2015.
- [69] CAO G, WANG Y. Nanostructures And Nanomaterials: Synthesis, Properties, And Applications (2nd Edition). ed. World Scientific Publishing Company, 2011.
- [70] CAMPBELL F C. Elements of Metallurgy and Engineering Alloys. ed. ASM International, 2008.
- [71] KHALEGHI A, SADRAMELI S M, MANTEGHIAN M. Thermodynamic and kinetics investigation of homogeneous and heterogeneous nucleation. 40(4). 167-192, 2020.
- [72] CAO G, WANG Y. Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications. ed. World Scientific, 2011.
- [73] FREIXEDAS F G, BAUZÁ A C, SÖHNEL O. Cristalización en Disolución: Conceptos Básicos. ed. Reverté, 2000.
- [74] BLACKMAN J. Metallic Nanoparticles. ed. Elsevier Science, 2008.
- [75] HAUMESSER P H. Nucleation and Growth of Metals: From Thin Films to Nanoparticles. ed. Elsevier Science, 2016.
- [76] RAJ S, CHAND MALI S, TRIVEDI R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Encicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 503(4). 2814-2819, 2018.
- [77] LOGAMBAL S, THILAGAVATHI T, CHANDRASEKAR M, INMOZHI C, BELLE EBANDA KEDI P, BASSYOUNI F A, UTHRAKUMAR R, MUTHUKUMARAN A, NAVEENKUMAR S, KAVIYARASU K. Synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles: Incorporated *Couroupita guianensis*

- flower petal extract for biomedical applications. *Journal of King Saud University - Science*. 35(1). 102455, 2023.
- [78] ELSHAZLY E H, NASR A, ELNOSARY M E, GOUDA G A, MOHAMED H, SONG Y. Identifying the Anti-MERS-CoV and Anti-HcoV-229E Potential Drugs from the Ginkgo biloba Leaves Extract and Its Eco-Friendly Synthesis of Silver Nanoparticles. Disponible en:
- [79] ASGHAR M A, ZAHIR E, SHAHID S M, KHAN M N, ASGHAR M A, IQBAL J, WALKER G. Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity. *LWT*. 90. 98-107, 2018.
- [80] ALAHDAL F A M, QASHQOOSH M T A, MANEA Y K, MOHAMMED R K A, NAQVI S. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Phragmanthera austroarabica* extract and their biological/environmental applications. *Sustainable Materials and Technologies*. 35. e00540, 2023.
- [81] BHATTARAI B, ZAKER Y, BIGIONI T P. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Challenges and opportunities. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 12. 91-100, 2018.
- [82] GUPTA V K, KUMAR S, KUKREJA R, CHANDER N. Experimental thermal performance investigation of a direct absorption solar collector using hybrid nanofluid of gold nanoparticles with natural extract of *Azadirachta Indica* leaves. *Renewable Energy*. 202. 1021-1031, 2023.
- [83] PATIL T P, VIBHUTE A A, PATIL S L, DONGALE T D, TIWARI A P. Green synthesis of gold nanoparticles via *Capsicum annum* fruit extract: Characterization, antiangiogenic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Applied Surface Science Advances*. 13. 100372, 2023.
- [84] WANG R, YAO Y, SHEN M, WANG X. Green synthesis of Au@Ag nanostructures through a seed-mediated method and their application in SERS. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 492. 263-272, 2016.
- [85] HENDI A A, AWAD M A, ALANAZI M M, VIRK P, ALROWAILY A W, BAHLOOL T, MERGHAN N M, AOUBAINI F, HAGMUSA B. Phytomediated synthesis of bimetallic Ag/Au nanoparticles using orange peel extract and assessment of their antibacterial and anticancer potential. *Journal of King Saud University - Science*. 35(2). 102510, 2023.
- [86] RAI M, POSTEN C. Green Biosynthesis of Nanoparticles: Mechanisms and Applications. ed. CABI, 2013.
- [87] TAIZ L, ZEIGER E. Fisiología vegetal. ed. Universitat Jaume I, 2006.
- [88] MAHAJAN R, SAGAR T, HUSSAIN S, NIPUNTA, KAPOOR N. Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants under Abiotic Stress. ed. Singapore. Springer Nature Singapore, 2023.

- [89] DEL CARMEN BELTRÁN-OROZCO M, RASCÓN J J O, CEDILLO F D, TORRES R S. Chemical composition and antioxidant ability of the crude extract of *Sedum praealtum* flowers. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 25(10). 778, 2013.
- [90] DE MELO G O, MALVAR D D C, VANDERLINDE F A, PIRES P A, CÔRTEZ W S, FILHO P G, MUZITANO M F, KAISER C R, COSTA S S. Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. *Journal of Ethnopharmacology*. 102(2). 217-220, 2005.
- [91] SALAS P A E, VALENCIA G, MORALES V M F. Siempreviva: un espermicida natural y avances de su caracterización fitoquímica. *Revista Investigación Científica*. 4(2). 2008.
- [92] MELÉNDEZ CAMARGO M E, BUENDÍA ROMERO M, RAMOS ZAMORA D, CARDONA CARRILLO P, VILLARREAL MALDONADO M E. Study of the anti-inflammatory effect of *Sedum praealtum* (Siempreviva) in the rat: dose-dependent response. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 45. 129-130, 2002.
- [93] FARRÀS R P, GIMÉNEZ A J. Bioquímica de los microorganismos. ed. Reverté, 1997.
- [94] VILLAFARÈ H H M. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2.a edición. ed. Editorial Universidad de Antioquia, 2008.
- [95] VEGA T C A, LIZARAZO M P R. Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico. 2008.
- [96] FELDMANN H. Yeast: molecular and cell biology. ed. John Wiley & Sons, 2011.
- [97] SCHUBERTH C, WEDLICH-SÖLDNER R. Building a patchwork—The yeast plasma membrane as model to study lateral domain formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1853(4). 767-774, 2015.
- [98] MAGER W H, WINDERICKX J. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in pharmacological sciences*. 26(5). 265-273, 2005.
- [99] BAI X-H, LI W, DU X-S, ZHANG P, LIN Z-D. Synthesis of spherical silver particles with micro/nanostructures at room temperature. *Composites Communications*. 4. 54-58, 2017.
- [100] LIU Z, QI X, WANG H. Synthesis and characterization of spherical and mono-disperse micro-silver powder used for silicon solar cell electronic paste. *Advanced Powder Technology*. 23(2). 250-255, 2012.
- [101] EID K A M, AZZAZY H M E. Controlled synthesis and characterization of hollow flower-like silver nanostructures. *International Journal of Nanomedicine*. 7. 1543-1550, 2012.
- [102] SHIN Y, BAE I-T, EXARHOS G J. “Green” approach for self-assembly of platinum nanoparticles into nanowires in aqueous glucose solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 348(1). 191-195, 2009.

- [103] JAFFAR S S, SAALLAH S, MISSON M, SIDDIQUEE S, ROSLAN J, LENGGORO W. Green Synthesis of Flower-Like Carrageenan-Silver Nanoparticles and Elucidation of Its Physicochemical and Antibacterial Properties. Disponible en:
- [104] MARIMUTHU S, ANTONISAMY A J, MALAYANDI S, RAJENDRAN K, TSAI P-C, PUGAZHENDHI A, PONNUSAMY V K. Silver nanoparticles in dye effluent treatment: A review on synthesis, treatment methods, mechanisms, photocatalytic degradation, toxic effects and mitigation of toxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 205. 111823, 2020.
- [105] GOLA D, KRITI A, BHATT N, BAJPAI M, SINGH A, ARYA A, CHAUHAN N, SRIVASTAVA S K, TYAGI P K, AGRAWAL Y. Silver nanoparticles for enhanced dye degradation. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 4. 100132, 2021.
- [106] PANDEY S, DO J Y, KIM J, KANG M. Fast and highly efficient catalytic degradation of dyes using κ -carrageenan stabilized silver nanoparticles nanocatalyst. *Carbohydrate Polymers*. 230. 115597, 2020.
- [107] DOAN V-D, LUC V-S, NGUYEN T L-H, NGUYEN T-D, NGUYEN T-D. Utilizing waste corn-cob in biosynthesis of noble metallic nanoparticles for antibacterial effect and catalytic degradation of contaminants. *Environmental Science and Pollution Research*. 27(6). 6148-6162, 2020.
- [108] NAGAJYOTHI P C, PRABHAKAR VATTIKUTI S V, DEVARAYAPALLI K C, YOO K, SHIM J, SREEKANTH T V M. Green synthesis: Photocatalytic degradation of textile dyes using metal and metal oxide nanoparticles-latest trends and advancements. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 50(24). 2617-2723, 2020.
- [109] KADAM J, DHAWAL P, BARVE S, KAKODKAR S. Green synthesis of silver nanoparticles using cauliflower waste and their multifaceted applications in photocatalytic degradation of methylene blue dye and Hg²⁺ biosensing. *SN Applied Sciences*. 2(4). 738, 2020.
- [110] CHIKKANAYAKANAHALLI PARAMESH C, HALLIGUDRA G, GANGARAJU V, SRIRAMOJU J B, SHASTRI M, KACHIGERE B H, HABBANAKUPPE D P, RANGAPPA D, KANCHUGARAKOPPAL SUBBEGOWDA R, DODDAKUNCHE SHIVARAMU P. Silver nanoparticles synthesized using saponin extract of Simarouba glauca oil seed meal as effective, recoverable and reusable catalyst for reduction of organic dyes. *Results in Surfaces and Interfaces*. 3. 100005, 2021.
- [111] HAMAD A, KHASHAN K S, HADI A. Silver Nanoparticles and Silver Ions as Potential Antibacterial Agents. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 30(12). 4811-4828, 2020.

- [112] KESHARI A K, SRIVASTAVA R, SINGH P, YADAV V B, NATH G. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 11(1). 37-44, 2020.
- [113] BRUNA T, MALDONADO-BRAVO F, JARA P, CARO N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. Disponible en:
- [114] DAS C G A, KUMAR V G, DHAS T S, KARTHICK V, GOVINDARAJU K, JOSELIN J M, BAALAMURUGAN J. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 27. 101593, 2020.
- [115] CHÁVEZ K, SALINAS-DELGADO Y, BRETADO L A, GÓMEZ-HURTADO M A, SANTOS-RAMOS I. Antibacterial Assessment of Ag Nanoflowers Synthesized by a Facile Method. *Available at SSRN 4299874*. 2022.
- [116] ALOMAR T S, ALMASOUD N, AWAD M A, EL-TOHAMY M F, SOLIMAN D A. An eco-friendly plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: Characterization, pharmaceutical and biomedical applications. *Materials Chemistry and Physics*. 249. 123007, 2020.
- [117] SKÓRA B, KRAJEWSKA U, NOWAK A, DZIEDZIC A, BARYLYAK A, KUSLIŚKIEWICZ M. Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*. 11(1). 1-13, 2021.
- [118] KASEMETS K, KÄOSAAR S, VIJA H, FASCIO U, MANTECCA P. Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: a nano-biointeraction perspective. *Nanotoxicology*. 13(8). 1041-1059, 2019.
- [119] RASMUSSEN L, SHI H, LIU W, SHANNON K B. Quantification of silver nanoparticle interactions with yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using single-cell ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 414(9). 3077-3086, 2022.
- [120] BELTRÁN DELGADO Y, MORRIS QUEVEDO H J, DE LA CRUZ E R, QUEVEDO MORALES Y, BERMÚDEZ SAVÓN R C. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 32. 121-129, 2013.
- [121] AINSWORTH E A, GILLESPIE K M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*. 2(4). 875-877, 2007.
- [122] LE K, CHIU F, NG K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*. 105(1). 353-363, 2007.
- [123] RAZACK S A, SURESH A, SRIRAM S, RAMAKRISHNAN G, SADANANDHAM S, VEERASAMY M, NAGALAMADAKA R B, SAHADEVAN R. Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Hibiscus rosa-sinensis* for fortifying wheat biscuits. *SN Applied Sciences*. 2(5). 898, 2020.

- [124] WELI A M, AL-SALMI S, AL HOQANI H, HOSSAIN M A. Biological and phytochemical studies of different leaves extracts of *Pteropyrum scoparium*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 7(4). 481-486, 2018.
- [125] PIZZOLATO P, LILLIE R D. MAYER'S TANNIC ACID-FERRIC CHLORIDE STAIN FOR MUCINS. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 21(1). 56-64, 1973.
- [126] SÁENZ R J A. Contribución al estudio fitoquímico de plantas costarricenses. I. Análisis Alcaloidal. *Revista de Biología Tropical*. 12(1). 67-74, 1964.
- [127] V N B, C G L, R C H H. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. ed. Editorial Universidad de Costa Rica, 2003.
- [128] SIFONTES Á B, MELO L, MAZA C, MENDES J J, MEDIAVILLA M, BRITO J L, ZOLTAN T, ALBORNOZ A. Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes. *Química Nova*. 33. 1266-1269, 2010.
- [129] KAABIPOUR S, HEMMATI S. A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 12. 102-136, 2021.
- [130] JAMIL S, DASTAGIR G, FOUDAH A I, ALQARNI M H, YUSUFOGLU H S, ALKREATHY H M, ERTURK O, KHAN R A, SHAH M A R. Biosynthesis of Biocompatible AgNPs Using Medicinally Important *Carduus edelbergii* Rech. f. Extract for Multifarious Biological Activities. *Journal of Nanomaterials*. 2022.
- [131] NÚÑEZ R Á, PÉREZ B R, MOTZEZAK R H, CHIRINOS M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*. 12(2). 129-135, 2012.
- [132] FODOR S, BAIA L, BAÁN K, KOVÁCS G, PAP Z, HERNADI K. The Effect of the Reducing Sugars in the Synthesis of Visible-Light-Active Copper(I) Oxide Photocatalyst. Disponible en:
- [133] BLACKBURN R S, HARVEY A. Green Chemistry Methods in Sulfur Dyeing: Application of Various Reducing d-Sugars and Analysis of the Importance of Optimum Redox Potential. *Environmental Science & Technology*. 38(14). 4034-4039, 2004.
- [134] AMIBO T A, BEYAN S M, MUSTEFA M, SUNDRAMURTHY V P, BAYU A B. Development of Nanocomposite based Antimicrobial Cotton Fabrics Impregnated by Nano SiO₂ Loaded AgNPs Derived from *Eragrostis Teff* straw. *Materials Research Innovations*. 26(7). 405-414, 2022.
- [135] CHANDRAN PRIYADARSHNI K, KRISHNAMOORTHY R, MUMTHA C, ULAGAN MAHALINGAM P. Biochemical analysis of cultivated mushroom, *Pleurotus florida* and synthesis of silver nanoparticles for enhanced antimicrobial effects on clinically important human pathogens. *Inorganic Chemistry Communications*. 142. 109673, 2022.

- [136] ARCHANA H, GEETHA BOSE V. Evaluation of phytoconstituents from selected medicinal plants and its synergistic antimicrobial activity. *Chemosphere*. 287. 132276, 2022.
- [137] GEBRE S H. Bio-inspired Synthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles: The Key Role of Phytochemicals. *Journal of Cluster Science*. 2022.
- [138] ALHARBI N S, ALSUBHI N S, FELIMBAN A I. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 15(3). 109-124, 2022.
- [139] BERGAL A, MATAR G H, ANDAÇ M. Olive and green tea leaf extracts mediated green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs): comparison investigation on characterizations and antibacterial activity. *BioNanoScience*. 12(2). 307-321, 2022.
- [140] MORALES-LOZOYA V, ESPINOZA-GÓMEZ H, Z. FLORES-LÓPEZ L, SOTELO-BARRERA E L, NÚÑEZ-RIVERA A, CADENA-NAVA R D, ALONSO-NUÑEZ G, RIVERO I A. Study of the effect of the different parts of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the green synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Applied Surface Science*. 537. 147855, 2021.
- [141] CHOUDHURY R, MISRA T K. Gluconate stabilized silver nanoparticles as a colorimetric sensor for Pb²⁺. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 545. 179-187, 2018.
- [142] NIKOLIĆ V D, ILIĆ D P, NIKOLIĆ L B, STANOJEVIĆ L P, CAKIĆ M D, TAČIĆ A D, ILIĆ-STOJANOVIĆ S S. The synthesis and characterization of iron (II): Gluconate. *Savremene tehnologije*. 3(2). 16-24, 2014.
- [143] DEVADIGA A, VIDYA SHETTY K, SAIDUTTA M B. Effect of Precursor Salt Solution Concentration on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized Using Aqueous Leaf Extracts of *T. catappa* and *T. grandis* Linn f.—A Green Synthesis Route. *Materials, Energy and Environment Engineering*. MOHAN B R, SRINIKETHAN G, MEIKAP B C. ed. Singapore. 145-151, 2017.
- [144] LIU J, LIN Q, ZHOU Y, DAI J, HAN Y. Shape Controllable Synthesis of Silver Particles by Selecting the Crystallization Routes. *KONA Powder and Particle Journal*. 37. 166-175, 2020.
- [145] NHUNG T T, LEE S-W. Green Synthesis of Asymmetrically Textured Silver Meso-Flowers (AgMFs) as Highly Sensitive SERS Substrates. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 6(23). 21335-21345, 2014.
- [146] ZHANG C-Y, HAO R, ZHAO B, FU Y-Z, HAO Y-W, LIU Y-Q. Novel synthesis of hierarchical flower-like silver assemblies with assistance of natural organic acids for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Materials Science*. 52(19). 11391-11401, 2017.
- [147] ZHANG B, XU P, XIE X, WEI H, LI Z, MACK N H, HAN X, XU H, WANG H-L. Acid-directed synthesis of SERS-active hierarchical assemblies of silver nanostructures. *Journal of Materials Chemistry*. 21(8). 2495-2501, 2011.

- [148] LIU J, LIN Q, ZHOU Y, DAI J, HAN Y. Shape Controllable Synthesis of Silver Particles by Selecting the Crystallization Routes. *KONA Powder and Particle Journal*. advpub. 2020.
- [149] NONAPPA, IKKALA O. Hydrogen Bonding Directed Colloidal Self-Assembly of Nanoparticles into 2D Crystals, Capsids, and Supracolloidal Assemblies. *Advanced Functional Materials*. 28(27). 1704328, 2018.
- [150] THANH N T K, MACLEAN N, MAHIDDINE S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews*. 114(15). 7610-7630, 2014.
- [151] TAMILARASI P, MEENA P. Green synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) using *Gomphrena globosa* (Globe amaranth) leaf extract and their characterization. *Materials Today: Proceedings*. 33. 2209-2216, 2020.
- [152] DUTTA T, GHOSH N N, DAS M, ADHIKARY R, MANDAL V, CHATTOPADHYAY A P. Green synthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using Citrus limetta peel extract: Experimental and theoretical studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 8(4). 104019, 2020.
- [153] ZAHEER Z, RAFIUDDIN. Nucleation and growth kinetics of silver nanoparticles prepared by glutamic acid in micellar media. *International Journal of Chemical Kinetics*. 44(10). 680-691, 2012.
- [154] UMEH S I, AKUJOBI C O, EKAJI F A. Optimization of Selected Process Parameters Affecting Yield of Green Synthesized Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Activity. *Biotechnology Journal International*. 25(2). 25-36, 2021.
- [155] WEININGER S J, STERMITZ F R. Química orgánica. ed. Reverté, 1988.
- [156] LONGANO D, DITARANTO N, SABBATINI L, TORSI L, CIOFFI N. Synthesis and Antimicrobial Activity of Copper Nanomaterials. ed. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [157] CHEN H, KERN E, ZIEGLER C, EYCHMÜLLER A. Ultrasonically Assisted Synthesis of 3D Hierarchical Silver Microstructures. *The Journal of Physical Chemistry C*. 113(44). 19258-19262, 2009.
- [158] HE S, YAO J, JIANG P, SHI D, ZHANG H, XIE S, PANG S, GAO H. Formation of Silver Nanoparticles and Self-Assembled Two-Dimensional Ordered Superlattice. *Langmuir*. 17(5). 1571-1575, 2001.
- [159] RICHARDS V N, RATH N P, BUHRO W E. Pathway from a Molecular Precursor to Silver Nanoparticles: The Prominent Role of Aggregative Growth. *Chemistry of Materials*. 22(11). 3556-3567, 2010.
- [160] RAHAIEE S, RANJBAR M, AZIZI H, GOVAHI M, ZARE M. Green synthesis, characterization, and biological activities of saffron leaf extract-mediated zinc oxide nanoparticles: A sustainable approach to reuse an agricultural waste. *Applied Organometallic Chemistry*. 34(8). e5705, 2020.

- [161] JEBRIL S, KHANFIR BEN JENANA R, DRIDI C. Green synthesis of silver nanoparticles using *Melia azedarach* leaf extract and their antifungal activities: In vitro and in vivo. *Materials Chemistry and Physics*. 248. 122898, 2020.
- [162] MADDINEDI S B, MANDAL B K, MADDILI S K. Biofabrication of size controllable silver nanoparticles – A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 167. 236-241, 2017.
- [163] WEN T, BRUSH L N, KRISHNAN K M. A generalized diffusion model for growth of nanoparticles synthesized by colloidal methods. *Journal of Colloid and Interface Science*. 419. 79-85, 2014.
- [164] DJEDDOU K, BOULOU DENINE M, SOUALAH ALILA H, BOUOUDINA M. Formation of Silver Nanoparticles by a Novel Irradiation Method Without a Reducing Agent and Their Impact on Four Pathogenic Bacterial Strains. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 30(8). 3095-3104, 2020.
- [165] YAQOOB A A, UMAR K, IBRAHIM M N M. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience*. 10(5). 1369-1378, 2020.
- [166] MOCHOCHOKO T, OLUWAFEMI O S, JUMBAM D N, SONGCA S P. Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth. *Carbohydrate Polymers*. 98(1). 290-294, 2013.
- [167] WARD J L, HARRIS C, LEWIS J, BEALE M H. Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 62(6). 949-957, 2003.
- [168] BAGNO A, RASTRELLI F, SAIELLI G. Prediction of the ¹H and ¹³C NMR Spectra of α -D-Glucose in Water by DFT Methods and MD Simulations. *The Journal of Organic Chemistry*. 72(19). 7373-7381, 2007.
- [169] AMANIAMPONG P N, TRINH Q T, LI K, MUSHRIF S H, HAO Y, YANG Y. Porous structured CuO-CeO₂ nanospheres for the direct oxidation of cellobiose and glucose to gluconic acid. *Catalysis Today*. 306. 172-182, 2018.
- [170] SAMOILOVA N A, KRAYUKHINA M A, KLIMOVA T P, BABUSHKINA T A, VYSHIVANNAYA O V, BLAGODATSKIKH I V, YAMSKOV I A. Oxidation of glucose to gluconic acid using a colloidal catalyst containing gold nanoparticles and glucose oxidase. *Russian Chemical Bulletin*. 63(4). 1009-1016, 2014.
- [171] TAJMIR-RIahi H A. Sugar interaction with silver ion. Synthesis, spectroscopic and structural analysis of silver-gluconate compounds. *Inorganica Chimica Acta*. 125(1). 43-47, 1986.
- [172] TRIVEDI M K, DIXIT N, PANDA P, SETHI K K, JANA S. In-depth investigation on physicochemical and thermal properties of magnesium (II) gluconate using spectroscopic and thermoanalytical techniques. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 7(5). 332-337, 2017.

- [173] MARASINI S, TEGAFAW T, MIAO X, HO S L, CHA H, CHANG Y, OH I T, CHAE K S, YASEEN A M, GHAZANFARI A, HUAN Y, LEE G H. Relaxometric, Optical and Cell Viability Properties of D-Glucuronic Acid Coated Cr₂O₃ Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 18(9). 6333-6338, 2018.
- [174] SIDDIQUI M N, REDHWI H H, ACHILIAS D S, KOSMIDOU E, VAKALOPOULOU E, IOANNIDOU M D. Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Study of Their Antimicrobial Properties. *Journal of Polymers and the Environment*. 26(2). 423-433, 2018.
- [175] YADAV V D, KRISHNAN R A, JAIN R, DANDEKAR P. In-situ silver nanoparticles formation as a tool for non-enzymatic glucose sensing: Study with an enzyme mimicking salt. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 580. 123715, 2019.
- [176] AYAZ AHMED K B, MOHAMMED A S, VEERAPPAN A. Interaction of sugar stabilized silver nanoparticles with the T-antigen specific lectin, jacalin from *Artocarpus integrifolia*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 145. 110-116, 2015.
- [177] PANZARINI E, MARIANO S, VERGALLO C, CARATA E, FIMIA G M, MURA F, ROSSI M, VERGARO V, CICCARELLA G, CORAZZARI M, DINI L. Glucose capped silver nanoparticles induce cell cycle arrest in HeLa cells. *Toxicology In Vitro*. 41. 64-74, 2017.
- [178] KUMAR C G, MAMIDYALA S K, REDDY M N, REDDY B V S. Silver glyconanoparticles functionalized with sugars of sweet sorghum syrup as an antimicrobial agent. *Process Biochemistry*. 47(10). 1488-1495, 2012.
- [179] UZNANSKI P, BRYSEWSKA E. Synthesis of silver nanoparticles from carboxylate precursors under hydrogen pressure. *Journal of Materials Science*. 45(6). 1547-1552, 2010.
- [180] UZNANSKI P, ZAKRZEWSKA J, FAVIER F, KAZMIERSKI S, BRYSEWSKA E. Synthesis and characterization of silver nanoparticles from (bis)alkylamine silver carboxylate precursors. *Journal of Nanoparticle Research*. 19(3). 121, 2017.
- [181] CIOFFI N, RAI M. Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects. ed. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [182] NIKOLIĆ V, ILIĆ D, NIKOLIĆ L, STANOJEVIĆ L, ČAKIĆ M, TAČIĆ A, ILIĆ-STOJANOVIĆ S. The synthesis and characterization of iron(II): Gluconate. *Savremene tehnologije*. 3. 16-24, 2014.
- [183] MALEŠEV D, KUNTIĆ V. Determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Arhiv za farmaciju*. 56(5). 878-879, 2006.
- [184] MALEŠEV D, KUNTIĆ V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 72(10). 921-939, 2007.

- [185] HUSSEIN A A, BARBERENA I, CORREA M, COLEY P D, SOLIS P N, GUPTA M P. Cytotoxic Flavonol Glycosides from *Triplaris cumingiana*. *Journal of Natural Products*. 68(2). 231-233, 2005.
- [186] MILANEZI F G, MEIRELES L M, DE CHRISTO SCHERER M M, DE OLIVEIRA J P, DA SILVA A R, DE ARAUJO M L, ENDRINGER D C, FRONZA M, GUIMARÃES M C C, SCHERER R. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of gold nanoparticles capped with quercetin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27(7). 968-974, 2019.
- [187] OUESLATI M H, TAHAR L B, HARRATH A H. Catalytic, antioxidant and anticancer activities of gold nanoparticles synthesized by kaempferol glucoside from *Lotus leguminosae*. *Arabian Journal of Chemistry*. 13(1). 3112-3122, 2020.
- [188] MARTINEZ-ANDRADE J M, AVALOS-BORJA M, VILCHIS-NESTOR A R, SANCHEZ-VARGAS L O, CASTRO-LONGORIA E. Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment—A novel modification. *PLOS ONE*. 13(1). e0190866, 2018.
- [189] MIYAKE R, NITANAI Y, NAKAGAWA Y, XING J, HARANO K, NAKAMURA E, OKABAYASHI J, MINAMIKAWA T, URUMA K, KANAIZUKA K, KURIHARA M. Preparation of Hierarchically Assembled Silver Nanostructures based on the Morphologies of Crystalline Peptide-Silver(I) Complexes. *ChemPlusChem*. 84(3). 295-301, 2019.
- [190] EDE S R, ANANTHARAJ S, SAKTHIKUMAR K, KARTHICK K, KUNDU S. Investigation of various synthetic protocols for self-assembled nanomaterials and their role in catalysis: progress and perspectives. *Materials Today Chemistry*. 10. 31-78, 2018.
- [191] MORENO E, ORTIZ B L, RESTREPO L P. Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Revista Colombiana de Química*. 43(3). 41-48, 2014.
- [192] GRUMEZESCU A M. Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-up and Biological Aspects of Pharmaceutical Nanotechnology. ed. Elsevier Science, 2017.
- [193] BASIUK V A, BASIUK E V. Green Processes for Nanotechnology: From Inorganic to Bioinspired Nanomaterials. ed. Springer International Publishing, 2015.
- [194] BRAVO-ÁVILA F M, RODRÍGUEZ-SAHAGÚN A, CASTELLANOS-HERNÁNDEZ O, RUVALCABA-RUIZ D. Regeneración de *Sedum praealtum* A. DC (siempreviva) vía organogénesis. *Nova scientia*. 8(17). 126-139, 2016.
- [195] FLORES-MORALES V, GALVÁN-VALENCIA M, DURON-TORRES S, ROSALES J. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de siempreviva. *Investigación Científica*. 6. 1-7, 2012.
- [196] HERNÁNDEZ-MORENO L V, SALAZAR J R, PABÓN L C, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ P. Antioxidant activity and quantification of phenols and flavonoids

- of Colombian plants used in urinary tract infections. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 25(1). 2022.
- [197] MENAZEA A A. Femtosecond laser ablation-assisted synthesis of silver nanoparticles in organic and inorganic liquids medium and their antibacterial efficiency. *Radiation Physics and Chemistry*. 168. 108616, 2020.
- [198] SIVAKUMAR A, RITA A, SAHAYA JUDE DHAS S, MARTIN BRITTO DHAS S A. Tuning of surface plasmon resonance of silver nano particles by shock waves for plasmonic device applications. *Optics & Laser Technology*. 128. 106235, 2020.
- [199] MISTRY H, THAKOR R, PATIL C, TRIVEDI J, BARIYA H. Biogenically proficient synthesis and characterization of silver nanoparticles employing marine procured fungi *Aspergillus brunneoviolaceus* along with their antibacterial and antioxidative potency. *Biotechnology Letters*. 43(1). 307-316, 2021.
- [200] RODDU A K, WAHAB A W, AHMAD A, TABA P. Green-route synthesis and characterization of the silver nanoparticles resulted by bio-reduction process. *Journal of Physics: Conference Series*. 1341(3). 032004, 2019.
- [201] ACEDO-MENDOZA A G, INFANTES-MOLINA A, VARGAS-HERNÁNDEZ D, CHÁVEZ-SÁNCHEZ C A, RODRÍGUEZ-CASTELLÓN E, TÁNORI-CÓRDOVA J C. Photodegradation of methylene blue and methyl orange with CuO supported on ZnO photocatalysts: The effect of copper loading and reaction temperature. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 119. 105257, 2020.
- [202] GOLA D, TYAGI P K, ARYA A, GUPTA D, RAGHAV J, KAUSHIK A, AGARWAL M, CHAUHAN N, SRIVASTAVA S K. Antimicrobial and dye degradation application of fungi-assisted silver nanoparticles and utilization of fungal retentate biomass for dye removal. *Water Environment Research*. 93(11). 2727-2739, 2021.
- [203] HU D, YANG X, CHEN W, FENG Z, HU C, YAN F, CHEN X, QU D, CHEN Z. *Rhodiola rosea* Rhizome Extract-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Potential Antioxidant and Catalytic Reduction Activities. *ACS Omega*. 6(38). 24450-24461, 2021.
- [204] MEHATA M S. Green route synthesis of silver nanoparticles using plants/ginger extracts with enhanced surface plasmon resonance and degradation of textile dye. *Materials Science and Engineering: B*. 273. 115418, 2021.
- [205] RAJASEKAR R, SAMUEL M, EDISON T N J I, RAMAN N. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using *Alstonia scholaris* for enhanced catalytic degradation of methylene blue. *Journal of Molecular Structure*. 1246. 131208, 2021.
- [206] AHMAD T, VEENU, NAZIM A, FAROOQ U, KHAN H, JAIN S K, UBAIDULLAH M, AHMED J. Biosynthesis, characterization and photo-catalytic degradation of methylene blue using silver nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*. 29. 1039-1043, 2020.

- [207] MOHAMMADZADEH KAKHKI R, HEDAYAT S, MOHAMMADZADEH K. Novel, green and low cost synthesis of Ag nanoparticles with superior adsorption and solar based photocatalytic activity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 30(9). 8788-8795, 2019.
- [208] AHMED M K, EL-NAGGAR M E, ALDALBAHI A, EL-NEWEHY M H, MENAZEA A A. Methylene blue degradation under visible light of metallic nanoparticles scattered into graphene oxide using laser ablation technique in aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*. 315. 113794, 2020.
- [209] MAVAEI M, CHAHARDOLI A, SHOKOOHINIA Y, KHOSHROO A, FATTAHI A. One-step Synthesized Silver Nanoparticles Using Isoimperatorin: Evaluation of Photocatalytic, and Electrochemical Activities. *Scientific Reports*. 10(1). 1762, 2020.
- [210] SINGH J, DHALI WAL A S. Plasmon-induced photocatalytic degradation of methylene blue dye using biosynthesized silver nanoparticles as photocatalyst. *Environmental Technology*. 41(12). 1520-1534, 2020.
- [211] KANNIAH P, RADHAMANI J, CHELLIAH P, MUTHUSAMY N, JOSHUA JEBASINGH SATHIYA BALASINGH THANGAPANDI E, REETA THANGAPANDI J, BALAKRISHNAN S, SHANMUGAM R. Green Synthesis of Multifaceted Silver Nanoparticles Using the Flower Extract of *Aerva lanata* and Evaluation of Its Biological and Environmental Applications. *ChemistrySelect*. 5(7). 2322-2331, 2020.
- [212] BARZINJY A A, HAMAD S M, AYDIN S, AHMED M H, HUSSAIN F H S. Green and eco-friendly synthesis of Nickel oxide nanoparticles and its photocatalytic activity for methyl orange degradation. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 31(14). 11303-11316, 2020.
- [213] SOMASUNDARAM C K, ATCHUDAN R, EDISON T N J I, PERUMAL S, VINODH R, SUNDRAMOORTHY A K, BABU R S, ALAGAN M, LEE Y R. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using marine algae for catalytic degradation of methylene blue. *Catalysts*. 11(11). 1377, 2021.
- [214] IQBAL S, ZAHOOR C, MUSADDIQ S, HUSSAIN M, BEGUM R, IRFAN A, AZAM M, FAROOQI Z H. Silver nanoparticles stabilized in polymer hydrogels for catalytic degradation of azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 202. 110924, 2020.
- [215] NASEEM K, BEGUM R, WU W, IRFAN A, AL-SEHEMI A G, FAROOQI Z H. Catalytic reduction of toxic dyes in the presence of silver nanoparticles impregnated core-shell composite microgels. *Journal of Cleaner Production*. 211. 855-864, 2019.
- [216] BONNIA N N, KAMARUDDIN M S, NAWAWI M H, RATIM S, AZLINA H N, ALI E S. Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Ptychogonum*

- Hydropiper' and Study its Catalytic Degradation of Methylene Blue. *Procedia Chemistry*. 19. 594-602, 2016.
- [217] KHAN A U, YUAN Q, WEI Y, KHAN Z U, TAHIR K, KHAN S U, AHMAD A, KHAN S, NAZIR S, KHAN F U. Ultra-efficient photocatalytic deprivation of methylene blue and biological activities of biogenic silver nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 159. 49-58, 2016.
- [218] RAJKUMAR R, EZHUMALAI G, GNANADESIGAN M. A green approach for the synthesis of silver nanoparticles by *Chlorella vulgaris* and its application in photocatalytic dye degradation activity. *Environmental Technology & Innovation*. 21. 101282, 2021.
- [219] CHAND K, JIAO C, LAKHAN M N, SHAH A H, KUMAR V, FOUAD D E, CHANDIO M B, ALI MAITLO A, AHMED M, CAO D. Green synthesis, characterization and photocatalytic activity of silver nanoparticles synthesized with *Nigella Sativa* seed extract. *Chemical Physics Letters*. 763. 138218, 2021.
- [220] MEHWISH H M, RAJOKA M S R, XIONG Y, CAI H, AADIL R M, MAHMOOD Q, HE Z, ZHU Q. Green synthesis of a silver nanoparticle using *Moringa oleifera* seed and its applications for antimicrobial and sun-light mediated photocatalytic water detoxification. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 9(4). 105290, 2021.
- [221] HALAWANI E M, HASSAN A M, GAD EL-RAB S M F. Nanoformulation of Biogenic Cefotaxime-Conjugated-Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Efficacy Against Multidrug-Resistant Bacteria and Anticancer Studies. *International Journal of Nanomedicine*. 15. 1889-1901, 2020.
- [222] MAITY G N, MAITY P, CHOUDHURI I, SAHOO G C, MAITY N, GHOSH K, BHATTACHARYYA N, DALAI S, MONDAL S. Green synthesis, characterization, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using arabinoxylan isolated from *Kalmegh*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 162. 1025-1034, 2020.
- [223] CHEN Y, REN L, SUN L, BAI X, ZHUANG G, CAO B, HU G, ZHENG N, LIU S. Amphiphilic silver nanoclusters show active nano-bio interaction with compelling antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria. *NPG Asia Materials*. 12(1). 56, 2020.
- [224] CHURCH N A, MCKILLIP J L. Antibiotic resistance crisis: challenges and imperatives. *Biologia*. 76(5). 1535-1550, 2021.
- [225] LIU S, MA J, WANG S, CHEN S, WANG B, LI J. Silver nanoparticles incorporated chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers for antibacterial applications. *Materials Letters*. 255. 126570, 2019.
- [226] LIU N, LI X, LI J, CAO Y, FENG L. Hierarchical architectures of Ag clusters deposited biomimetic membrane: Synthesis, emulsion separation, catalytic and

- antibacterial performance. *Separation and Purification Technology*. 241. 116733, 2020.
- [227] ESMAILE F, KOOHESTANI H, ABDOLLAH-POUR H. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles green synthesized using *Ziziphora clinopodioides* extract. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 14. 100303, 2020.
- [228] YILMAZ M T, İSPIRLI H, TAYLAN O, DERTLI E. Synthesis and characterisation of alternan-stabilised silver nanoparticles and determination of their antibacterial and antifungal activities against foodborne pathogens and fungi. *LWT*. 128. 109497, 2020.
- [229] ZHANG H, CHEN S, JIA X, HUANG Y, JI R, ZHAO L. Comparison of the phytotoxicity between chemically and green synthesized silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 752. 142264, 2021.
- [230] BO X, WANG L, ZHAO Y. Facile synthesis of Ag/La₂O₂CO₃ hierarchical micro/nanostructures for antibacterial activity and phosphate removal. *Journal of Rare Earths*. 38(12). 1372-1378, 2020.
- [231] XIONG R, LU C, ZHANG W, ZHOU Z, ZHANG X. Facile synthesis of tunable silver nanostructures for antibacterial application using cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*. 95(1). 214-219, 2013.
- [232] AGUILAR J, ESPINOZA M, CABANILLAS J, ÁVILA I, GARCÍA A, JULCA J, TACANGA D, ZUTA I, LINARES G. Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial Science*. 5(1). 37-47, 2015.
- [233] PENDERS J, STOLZOFF M, HICKEY D J, ANDERSSON M, WEBSTER T J. Shape-dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 12. 2457-2468, 2017.
- [234] CHANG X, WANG X, LI J, SHANG M, NIU S, ZHANG W, LI Y, SUN Z, GAN J, LI W, TANG M, XUE Y. Silver nanoparticles induced cytotoxicity in HT22 cells through autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 208. 111696, 2021.
- [235] KÄOSAAR S, KAHRU A, MANTECCA P, KASEMETS K. Profiling of the toxicity mechanisms of coated and uncoated silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 using a set of its 9 single-gene deletion mutants defective in oxidative stress response, cell wall or membrane integrity and endocytosis. *Toxicology In Vitro*. 35. 149-162, 2016.
- [236] DOROBANTU L S, FALLONE C, NOBLE A J, VEINOT J, MA G, GOSS G G, BURRELL R E. Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae. *Journal of Nanoparticle Research*. 17(4). 172, 2015.
- [237] KENNEDY D C, ORTS-GIL G, LAI C-H, MÜLLER L, HAASE A, LUCH A, SEEBERGER P H. Carbohydrate functionalization of silver nanoparticles

- modulates cytotoxicity and cellular uptake. *Journal of Nanobiotechnology*. 12(1). 59, 2014.
- [238] KUMMARA S, PATIL M B,URIAH T. Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles – A comparative study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84. 10-21, 2016.
- [239] JADHAV K, DEORE S, DHAMECHA D, H R R, JAGWANI S, JALALPURE S,BOHARA R. Phytosynthesis of Silver Nanoparticles: Characterization, Biocompatibility Studies, and Anticancer Activity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 4(3). 892-899, 2018.
- [240] GALVÁN MÁRQUEZ I, GHIYASVAND M, MASSARSKY A, BABU M, SAMANFAR B, OMIDI K, MOON T W, SMITH M L,GOLSHANI A. Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*. 13(3). e0193111, 2018.
- [241] BONATTO C C,SILVA L P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. *Industrial Crops and Products*. 58. 46-54, 2014.
- [242] CHAIRUANGKITTI P, LAWANPRASERT S, ROYTRAKUL S, AUEVIRIYAVIT S, PHUMMIRATCH D, KULTHONG K, CHANVORACHOTE P,MANIRATANACHOTE R. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicology In Vitro*. 27(1). 330-338, 2013.
- [243] BABELE P K, SINGH A K,SRIVASTAVA A. Bio-Inspired Silver Nanoparticles Impose Metabolic and Epigenetic Toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Pharmacology*. 10. 2019.
- [244] CANAPARO R, FOGLIETTA F, LIMONGI T,SERPE L. Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. *Materials*. 14(1). 53, 2020.
- [245] MYTYCH J, ZEBROWSKI J, LEWINSKA A,WNUK M. Prolonged Effects of Silver Nanoparticles on p53/p21 Pathway-Mediated Proliferation, DNA Damage Response, and Methylation Parameters in HT22 Hippocampal Neuronal Cells. *Molecular Neurobiology*. 54(2). 1285-1300, 2017.

ANEXOS

7.1 Anexo 1

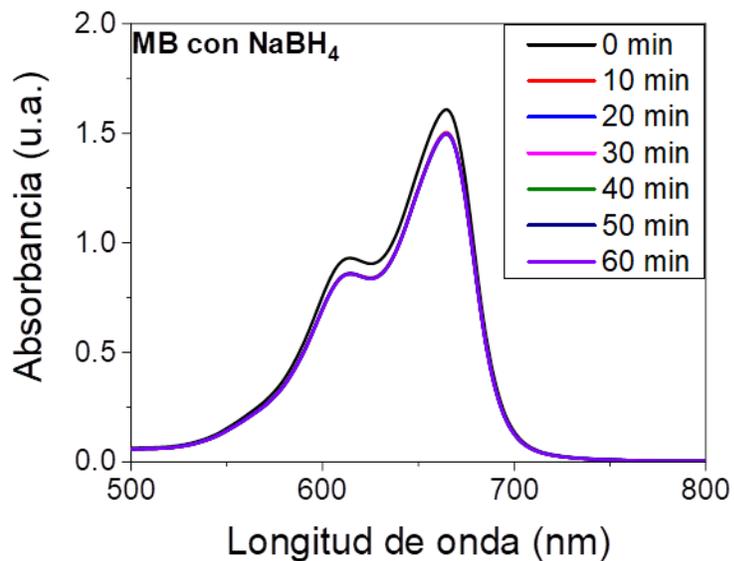


Figura 7.1. Espectros UV-Vis de la mezcla MB + NaBH_4 en función del tiempo.

7.2 Anexo 2

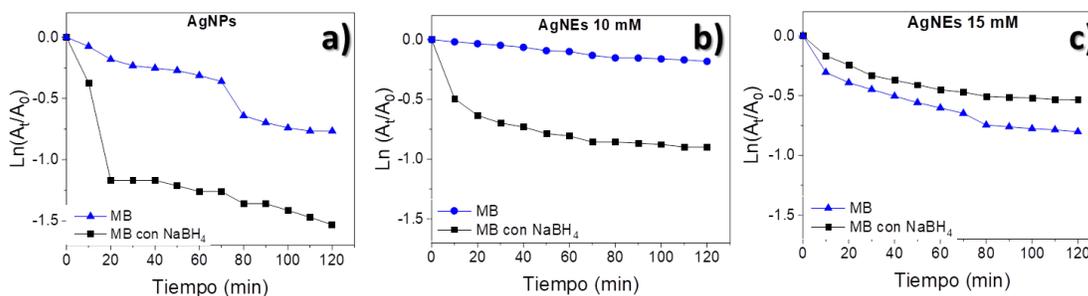


Figura 7.2. Curvas cinéticas $\text{Ln}(A_t/A_0)$ de degradación de MB usando AgNPs (a), AgNEs (b-c), con o sin NaBH_4 .

7.3 Anexo 3

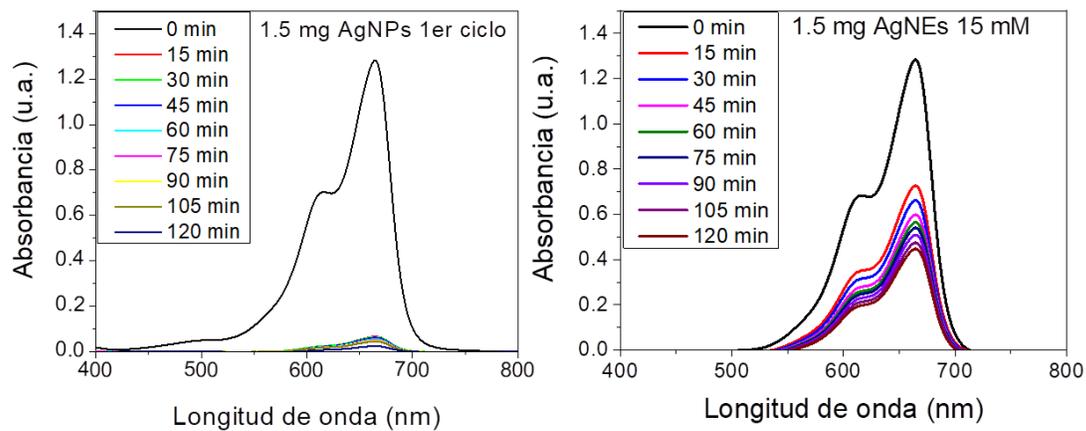


Figura 7.3. Espectros UV-Vis de degradación de MB en función del tiempo utilizando 1.5 mg de AgNPs (a) y AgNEs (b).

7.4 Anexo 4

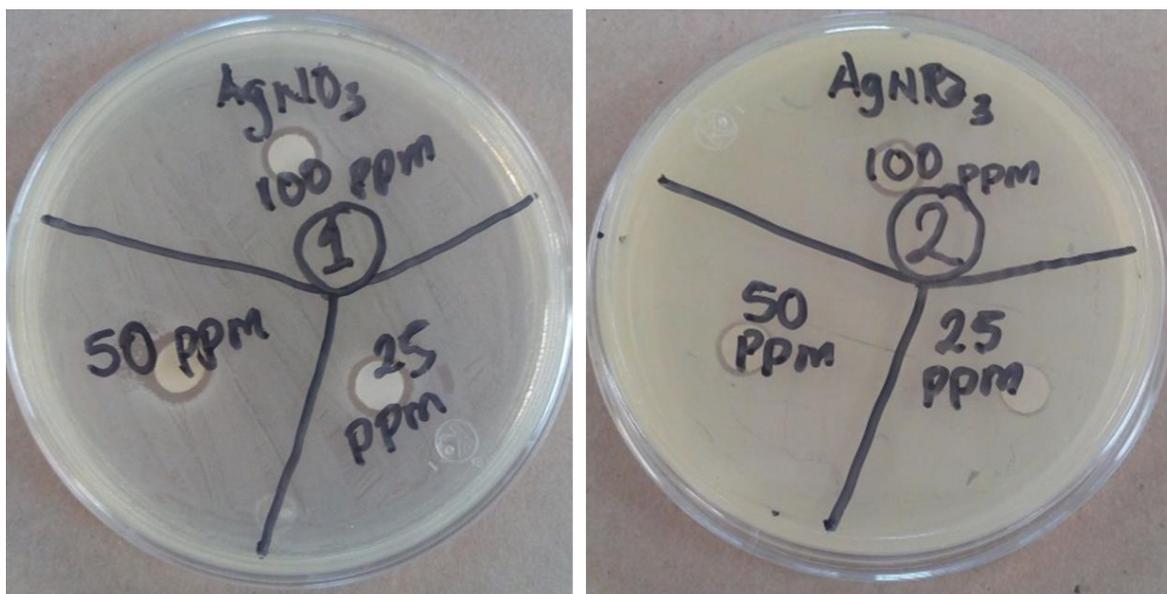


Figura 7.4. Halos de inhibición para el control positivo que consistió en $AgNO_3$ a concentraciones de 25, 50 y 100 ppm en *E. coli* (a) y *S. aureus* (b).

7.5 Anexo 5

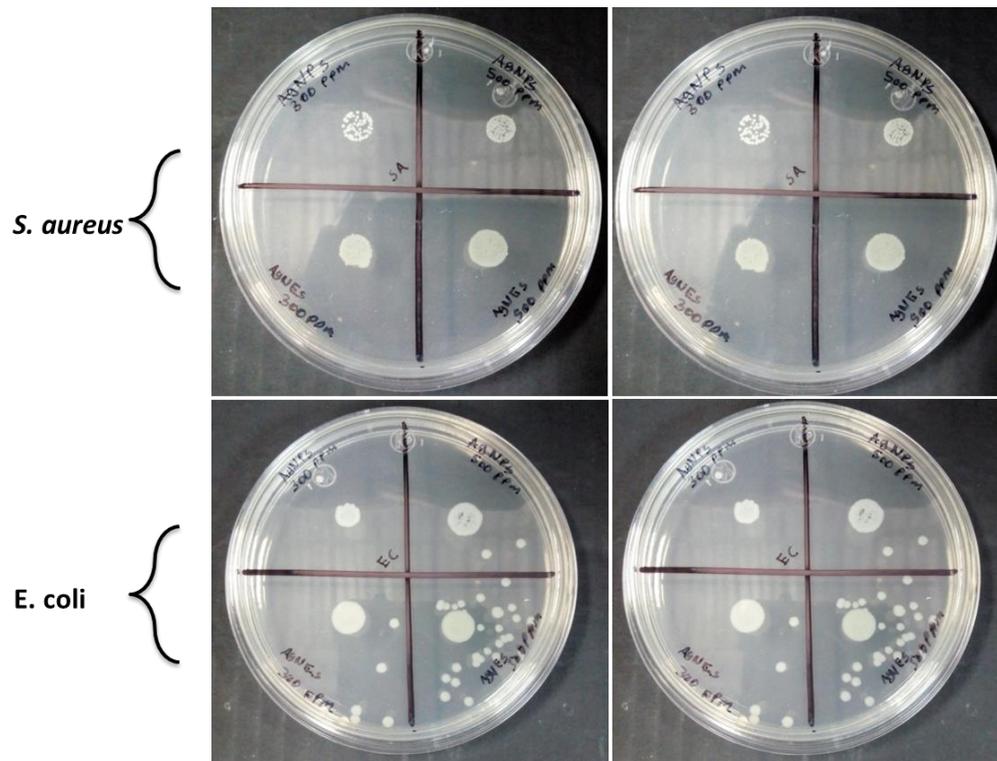


Figura 7.5. Halos de inhibición para las pruebas de MIC en AgNPs y AgNEs

PRODUCTOS OBTENIDOS

Artículos indexados

- **The effect of AgNPS bio-functionalization on the cytotoxicity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***
LANDEROS-PÁRAMO L, SAAVEDRA-MOLINA A, GÓMEZ-HURTADO M A, ROSAS G. The effect of AgNPS bio-functionalization on the cytotoxicity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *3 Biotech*. 12(9). 196, 2022.
- **A comparative study of the catalytic activity between Ag nanoparticles and Ag flower-like particles synthesized by the *Sedum praealtum* aqueous extract.**
LANDEROS-PÁRAMO L, SAAVEDRA-MOLINA A, CHOLICO-GONZÁLEZ D, ROSAS G. A comparative study of the catalytic activity between Ag nanoparticles and Ag flower-like particles synthesized by the *Sedum praealtum* aqueous extract. *Particulate Science and Technology*. 1-12, 2022.

Proceedings

- **Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Mixture of Aqueous Extracts of *Sedum praealtum* and *Origanum vulgare*.**
LANDEROS-PÁRAMO L, ROSAS G. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Mixture of Aqueous Extracts of *Sedum praealtum* and *Origanum vulgare*. *Microscopy and Microanalysis*. 25(S2). 2372-2373, 2019.



The effect of AgNPs bio-functionalization on the cytotoxicity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

L. Landeros-Páramo¹ · A. Saavedra-Molina² · Mario A. Gómez-Hurtado² · G. Rosas¹

Received: 18 January 2022 / Accepted: 21 July 2022
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2022

Abstract

This work used *Sedum praealtum* leaf extract to synthesize silver nanoparticles (AgNPs) in a single step. The cytotoxicity of AgNPs was studied with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* W303-1. In addition, the antioxidant activity of the DPPH radical was studied both in the extract of *S. praealtum* and in the AgNPs. UV–Vis spectroscopy determined the presence of AgNPs by the location of the surface plasmon resonance (SPR) band at 434 nm. TEM and XRD analyzes show AgNPs with fcc structure and hemispherical morphology. Also, AgNPs range in size from 5 to 25 nm and have an average size of 14 nm. ¹H NMR, FTIR, and UV–Vis spectroscopy techniques agreed that glycosidic compounds were the main phytochemical components responsible for the reduction and stabilization of AgNPs. In addition, AgNPs presented a maximum of 12% toxicity in yeast attributed to the generation of ROS. Consequently, there was low bioactivity because glycoside compounds cover the biosynthesized AgNPs from *S. praealtum*. These findings allow applications of AgNPs involving contact with mammals and higher organisms.

Keywords Silver nanoparticles · *Sedum praealtum* · Yeast cell · Cytotoxicity · Antioxidant potential

Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) have received considerable attention due to their catalytic (Aravind et al. 2021), optical (Jouyban and Rahimpour 2020), electrical (Chen et al. 2009; Noh et al. 2021), antimicrobial (Hashim et al. 2020; Renuka et al. 2020) and antioxidant properties (Govindappa et al. 2021). AgNPs have been synthesized using a wide variety of physical and chemical methods, such as laser ablation (Menazea 2020), thermal evaporation (Al-Masoodi et al. 2020), microwave-assisted (Araruna et al. 2020), chemical reduction (Krishnakumar et al. 2018), hydrothermal (Akso-maityte et al. 2013), spray pyrolysis (Shih and Chien 2013), etching method (Kim et al. 2019), and green methods. However, some of them generate waste that is harmful to the

environment. Green synthesis is an environmentally friendly, relatively easy, and low-cost method that uses a variety of media such as bacteria (Mathivanan et al. 2019; Saeed et al. 2020), yeasts (Fernández et al. 2016), fungi (Bolbanabad et al. 2020; Ma et al. 2017), microalgae (Princy et al. 2021), cyanobacteria (Husain et al. 2019), enzymes (Talekar et al. 2016), and plant extracts (Sahayaraj et al. 2020; Sherin et al. 2020). Among these, the AgNPs synthesis with plant extracts is considered the most versatile, fast, and easy, leading to its large-scale application (Ahmad et al. 2021).

Nanoparticles synthesized by green methods allow their use in biomedicine (Alomar et al. 2020; Pereira et al. 2020; Tripathi et al. 2019). For example, AgNPs are suitable for applications as antimicrobial and antioxidant agents (Odeniyi et al. 2020) due to their broad spectrum against Gram-positive and Gram-negative pathogenic cells (Ameen et al. 2020; Biswal and Misra 2020). The antibacterial capacity of AgNPs is due to their nanometric size, allowing unique properties and a slow and controlled release of ions (Aadil et al. 2019; Käosaar et al. 2016). AgNPs are an excellent biocidal alternative confirmed by various assays based on cell growth and viability (Xiaozhou Wen et al. 2020).

On the other hand, the nanomaterials development and their production for large-scale applications will lead to their

✉ L. Landeros-Páramo
landeros_jose_luis@yahoo.com; 1491290c@umich.mx

¹ Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, UMSNH, Edificio U., Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, edificio B-3., Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México



A comparative study of the catalytic activity between Ag nanoparticles and Ag flower-like particles synthesized by the *Sedum praealtum* aqueous extract

Luis Landeros-Páramo^a, Alfredo Saavedra-Molina^b, Diana Cholico-González^a, and G. Rosas^a 

^aInstituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, UMSNH, edificio U., Ciudad Universitaria, Morelia, México; ^bInstituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, edificio B-3., Ciudad Universitaria, Morelia, México

ABSTRACT

This work shows that using *Sedum praealtum* extract, silver nanoparticles (AgNPs) and flower-like silver self-assemblies (AgFLs) can be synthesized by varying only the concentration of AgNO₃. In addition, the comparison of its catalytic activity on the degradation of the methylene blue dye (MB) was evaluated. SEM showed spherical AgNPs of ~15 nm at 5 mM (AgNO₃) concentration, and AgFLs are formed at 10 mM (AgNO₃). XRD patterns confirmed the fcc crystal structure of the materials. FTIR spectroscopy determined that glycoside compounds are the main participants as reducing agents, stabilizers, and binders. UV-Vis spectroscopy confirmed the obtaining of Ag nanomaterials through the characteristic resonance band of the surface plasmon (RSP). In addition, the value of the band-gap was determined to measure the catalytic activity in the degradation of MB. The photocatalytic activity was mainly favored by smaller sizes of AgNPs, over the texture and surface porosity of AgFLs. However, it is independent of the morphology, and the use of an external reducing agent (NaBH₄) since a 90% degradation is obtained after 24 h of reaction due to the combined action of photocatalysis and dye adsorption.

KEYWORDS

Synthesis; nanoparticles; self-assembly; flower-like; characterization; catalysis

1. Introduction

Noble metal self-assembling nanostructures have been of scientific interest in nanotechnology because of their intriguing properties and exciting applications in electronics, catalysis, chemistry, electrochemistry, and biological detection (H. Chen et al. 2014; Y. Zhang et al. 2018; Chávez and Rosas 2021; Nourmohammadi Khiarak et al. 2021). Different building blocks integrate self-assembly structures as 0D, 1D, and 2D. Self-assembly is the autonomous and spontaneous organization of molecular or nanometric units into patterns or structures (Lee 2008; Q. Zhang et al. 2009; B. Zhang et al. 2011; Liu et al. 2020). Thus, the properties and macroscopic behavior of complex 3D nanostructures arise from combining the properties of the individual building blocks and their mutual interactions (B. Zhang et al. 2011; Generalova et al. 2021). Furthermore, the properties of the assemblies depend on the morphology and the size of the building blocks (L. Li, Sun, et al. 2021).

Self-assembly includes the use of surfactants (Luo et al. 2009; Ma et al. 2018), solvent mixtures (Xu et al. 2009; Shin et al. 2021), induction of magnetic fields (M. Chen et al. 2020), ultrasound (Moghimi-Rad et al. 2011; H. Li et al. 2018), biological templates (M. Li, Cai, et al. 2021; M. Abdul Hakkeem et al. 2021), and combinations thereof.

Alternatively, plant extracts have been used extensively for the synthesis of noble metal nanoparticles. Plant extracts

contain a variety of biomolecules that can act as reducing and stabilizing agents (Ahn and Park 2020; Behzad et al. 2021). Ecological methods are inexpensive, easy, and environmentally friendly (Roopan et al. 2013; Aravind et al. 2021). However, it is well known that plant extracts also contain various binding agents, used as directing agents as it works with surfactants for the formation and anisotropic growth of metal nanostructures. Consequently, to develop self-assembled morphology through green synthesis, it would be necessary for the plant extract to contain efficient, reducing agents that cause relatively rapid nucleation, low amounts of stabilizing agents, and directing agents or ligands that shape the nanostructure self-assembled. Although green synthesis with plant extracts is used extensively for AgNPs, few works explore the formation of self-assembly structures (Molina et al. 2019). Among these works, Del Moral-G et al. (2021) synthesized Au self-assemblies using *Taraxacum officinale* plant extract. Au Self-Assemblies have dendritic morphology and mean size of 158 nm. The nanodendrites showed fluorescence at 280 u.a., which could be important for widespread applications such as fluorescent biosensors in therapy and imaging. Chávez and Rosas (2021) reported the self-assembly of silver spheres using the *Hamelia patens* plant extract as a reducing agent. The spheres obtained have an average size of 2 μm and are made up of 20 nm thick petals, showing good performance

Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Mixture of Aqueous Extracts of *Sedum praealtum* and *Origanum vulgare*

L. Landeros-Páramo^{*1}, G. Rosas¹

¹- Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, UMSNH, Morelia, Michoacán, México.

* Corresponding author: landeros_jose_luis@yahoo.com

In recent years silver nanoparticles have generated interest for their unique properties about the macro scale given rise to research focused on the synthesis and modification of these nanomaterials [1]. Nanoscience through a variety of synthesis methods such as physical, chemical and green has studied the obtaining of nanoparticles. The latter offers the possibility of being economical and respectful to the environment by using plants including fruits, medicinal plants, shrubs, and even undergrowth [2]. From different parts of the plant are extracted the biomolecules antioxidant, and surfactants that work as reducing and capping agents, depending on the plant species are specific in type and quantity that leads to obtaining crystalline nanoparticles in a variety of shapes and sizes [3].

In this study, the synthesis of silver nanoparticles was carried out by chemical reduction of Ag^+ to Ag^0 of silver nitrate (AgNO_3), using of aqueous extracts of *Sedum praealtum* and *Origanum vulgare* plants, as well as the mixture of them at room temperature. The extracts were prepared using the dried and ground leaves in a mortar; Subsequently, the infusion was carried out with each of the plants separately, mixing 100 mL of distilled water with 2 g of vegetable powder, heating to 60 °C for a period of 30 min, and then filtering, the silver solution was elaborated at concentrations of 8, 6, 4 and 2 mM in deionized water. In the synthesis procedure, 5 mL of *Sedum praealtum* extract and 5 mL of silver salt solution were mixed in the first instance, generating a 1:1 volumetric ratio. In the same way, it was performed with *Origanum vulgare* plant extract. For the case of the synthesis combining the extracts, 2.5 mL of each extract and 5 mL of precursor salt was incorporated. The formation of nanoparticles was indicated by the color change of the reaction mixture from light brown to dark. The presence and size distribution were explored by UV-Vis (OceanOptics USB4000). The morphology, chemical analysis and distribution of the nanoparticles through scanning electron microscopy (JEOLJSM-7600F). Finally, the composition and crystal structure analyzed by X-ray diffraction (Bruker D8 Advance, DAVINCI Lynx eye). Fig. 1 shows the UV-vis spectra related to silver nanoparticles obtained by extracts of *Sedum praealtum*, *Origanum vulgare* and mixtures thereof these at 8 mM salt, where specific signals between 400 and 500 nm are observed. In the UV-Vis spectrum, *Sedum praealtum* has an SPR peak at 490 nm. Meanwhile, *Origanum vulgare* has an SPR peak at 480 nm. Regard to the mixture of them the maximum is found at 480 nm.

The three curves have a widened shape being more defined in the mix of both extracts, results that indicate that combining the biomolecules of both plants generate more uniform nanoparticles in size [4]. Fig. 2 corresponds to the XRD pattern that shows the indexed planes (111), (200), (220) and (311) which correspond to the angles 38 °, 44.5 °, 64.5 °, and 77.5 °, of the silver fcc, respectively in the extract mixture. Fig. 3a-c corresponds to the micrographs of the silver reduced by *Sedum praealtum* and *Origanum vulgare* and the mixture of them respectively. It is observed, that spherical and uniform Ag nanoparticles are obtained with *Sedum praealtum* extract. While, spherical, triangular and other morphologies with different size distributions synthesize through *Origanum vulgare* extract. However, by combining the plants, uniform nanoparticles are obtained in size and spheroid morphology. EDS