



S.E.P

S.E.S.T.N.M

TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“BIOSÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA Y PRUEBAS
DE ACTIVIDAD MICROBICIDA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

ANGÉLICA MARIEL SILVA GÓMEZ

No. CONTROL: 0528M1056

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Sonia Mireya Martínez Gallegos

Co-DIRECTOR:

Dra. Genoveva Rosano Ortega

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, JULIO DE 2016.

Metepec, Méx., 27/Junio/2016

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-902/2016

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. ANGÉLICA MARIEL SILVA GÓMEZ
CANDIDATA AL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS,
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y PRUEBAS DE ACTIVIDAD MICROBICIDA**" la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Educación, Integridad y Ciencia



DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE

JLGR/magj





Metepec, Méx., 20/Junio /2016

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
DEPI-395-500/2016

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **"BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y PRUEBAS DE ACTIVIDAD MICROBICIDA"**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta la C. ANGÉLICA MARIEL SILVA GÓMEZ, con número de control 0528M1056 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA SONIA MIREYA MARTÍNEZ GALLEGOS
DIRECTORA DE TESIS

DRA. GENOVEVA ROSANO ORTEGA
CO-DIRECTORA DE TESIS

DR. PABLO SAMUEL SCHABES RETCHKIMAN
REVISOR

DR. CARLOS ARTURO VEGA LEBRÚN
REVISOR

DRA. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA
REVISORA



Antes de que nos
olviden,
haremos
historia...

DEDICATORIAS

A Dios, que hace posibles todas las cosas y guía nuestro camino.

A mi Mamá María Esther Gómez Sánchez que siempre es un ejemplo de fortaleza y nos ha enseñado a nunca rendirnos.

A mis hermanos Ana y Alejandro.

A los hermosos ANB que siempre nos dan alegría.

A mis sobrinitos Victoria Fernanda y Bebe Mil-Os.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Sonia Mireya Martínez Gallegos por la dirección de este trabajo de Tesis.

Al Dr. Pablo Samuel Schabes Retchkiman por su apoyo en la codirección de Tesis, acceso al microscopio electrónico de transmisión y su colaboración y amistad durante todo el proyecto.

A la Q.F.B. Verónica Albiter López, con quien tuve el placer de compartir y aprender el desarrollo de las pruebas bactericidas en el Laboratorio de Microbiología Servicios del LIIA en el Instituto Tecnológico de Toluca, además de su amable colaboración en conjunto con la I.Q Martha Manjarrez durante mi estancia en la Maestría.

A la Dra. Genoveva Rosano Ortega y Dr. Carlos Arturo Vega Lebrún por su colaboración y contribuciones que enriquecieron ampliamente esta investigación.

Deseo también agradecer la invaluable ayuda de los técnicos en el Laboratorio Central de Microscopia del Instituto de Física de la UNAM (LACMIF), Sr Arq. Diego Quiterio Vargas, Fis. Roberto Hernández Reyes y al Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa.

Al CONACYT por la beca recibida en el periodo 2014-2016.

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNP) por el método de bioreducción utilizando lirio acuático de la laguna Chignahuapan, Almoloya del Rio, se ajustaron las condiciones óptimas de pH y se determinó la influencia de la sección del lirio en la obtención de AgNP en polvo, y su actividad microbicida se evaluó ante las cepas de *E. Coli* ATCC 25992 y *S. aureus* ATCC 6538.

Por primera vez, se determina el contenido de fenoles totales entre secciones de la planta (raíces, tallos y hojas) y se cuantifican los taninos hidrolizables, encontrando que la mayor cantidad se presenta en las secciones verdes de la planta (tallos y hojas) en el rango de 29.4-35.9 mg/L. La concentración de compuestos fenólicos reductores (taninos) en éstas secciones, influyó en la formación de más nanopartículas y en las morfologías poliédricas que incluyeron los sistemas cristalinos (trigonal, cúbico y hexagonal); mientras que al utilizar las raíces, que tienen un menor contenido fenólico, predominó una morfología esférica y el sistema cristalino cúbico.

El efecto microbicida de las AgNP estuvo influenciado por la concentración inicial de células bacterianas y el tipo de microorganismo utilizado. El desempeño de las nanopartículas fue mayor al estar en contacto con *S. aureus* a pesar de ser una bacteria de tipo Gram (+), requiriendo 10 mg/L para eliminar una cuenta inicial incontable, mientras que con *E. coli*, 15 mg/L eliminaron una cuenta menor comprendida entre 460 y 860 UFC/mL. Los resultados en las pruebas de actividad microbiana se obtuvieron al utilizar la suspensión de AgNP donde se encuentran presentes las fases Ag^+ y Ag^0 a escala de puntos cuánticos, con un marcado efecto microbicida a partir de 1 mg/L.

ABSTRACT

Microbial resistance to conventional disinfectants has created the necessity to develop alternative agents to avoid them, presenting an optimal setting for new formulations based on metallic nanoparticles with antimicrobial properties.

In this work we use *Eichhornia crassipes* which is an aquatic invasive plant, as reducing agent to synthesize silver nanoparticles (AgNP) by using a green method. The samples were collected from Chignahuapan lagoon located in Almoloya del Rio, Mexico. In the biosynthesis, the optimum pH and the plant section were determinate. For the first time, total phenolic compounds and hydrolysable tannins in roots, stems and leaves were quantified. The main contain of these compounds was on the green sections (stems and leaves) in range of 29.4-35.9 mg/L, and it had an influence on polyhedral morphology obtained for the AgNP included systems as trigonal, cubic and hexagonal. On the other hand, using the Water hyacinth roots with the lower contain of tannins, the AgNP size increased and spherical morphology and cubic crystal structure predominated.

The AgNP were obtained in powder by centrifugation at 10000 rpm, and microbicidal activity was assessed against strains of *E. coli* ATCC 25992 and *S. aureus* ATCC 6538. The microbicidal effect of AgNP was influenced by the initial concentration of bacterial cells and bacterial tested. The activity of the nanoparticles was higher with *S. aureus* bacterium Gram (+) , requiring 10 mg /L to kill an uncountable units forming colony (UFC), whereas *E. coli*, 15 mg / L for 460 and 860 UFC/mL. The results of microbial activity obtained by using AgNP suspension (where Ag⁺ and Ag⁰ in quantum dots scale were present) had an enhanced microbicidal effect noticeable at 1 mg / L.

ÍNDICE

1. FUNDAMENTOS

1.1 AGUA	3
1.2 NANOTECNOLOGÍA	4
1.3 TANINOS	6
1.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)	9
1.5 EFECTOS MICROBICIDAS DE LA PLATA	11
1.5.1 Plata iónica /AgNO ₃	11
1.5.2 Nanopartículas de plata.....	13

2. MATERIALES Y MÉTODO

2.1 REACTIVOS	16
2.2 MUESTREO DE LIRIO ACUÁTICO Y PROCESAMIENTO	17
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	18
2.3.1 Identificación de polifenoles presentes en las secciones de <i>Eichhornia crassipes</i>	18
2.3.2 Cuantificación de fenoles totales en <i>Eichhornia crassipes</i>	18
2.3.3 Cuantificación Espectrofotométrica de Taninos Hidrolizables	19
2.3.3.1 Preparación de extractos	19
2.3.3.2 Hidrólisis de Taninos Hidrolizables	19
2.2.3.3 Curva de calibración de Taninos Hidrolizables	19
2.2.3.4 Cuantificación de Taninos Hidrolizables.....	20
2.4 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)	20
2.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	21
2.5.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y espectrometría de dispersión de energía de rayos (EDS)	21
2.5.2 Análisis Termogravimétrico	21

2.5.3	Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	22
2.5.4	Área superficial	22
2.5.5	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	22
2.6	CUANTIFICACIÓN DE PLATA EN LAS SUSPENSIONES DE AgNP	22
2.7	PRUEBAS DE ACTIVIDAD MICROBICIDA	23
2.7.1	Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas	23
2.7.1.1	Siembra de cepas de control	23
2.7.1.2	Preparación del inóculo	24
2.7.1.3	Siembra del inóculo	24
2.7.2	Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable.....	24
2.7.3	Mínima concentración bactericida (MIB)	24
2.7.4	Comparación entre agentes antimicrobianos	25
2.7.5	Crecimiento bacteriano en presencia de AgNP	25
2.7.6	Influencia del extracto de <i>E. crassipes</i> como agente microbicida.....	25
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1	CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	26
3.1.1	Identificación de polifenoles presentes en las secciones de <i>Eichhornia crassipes</i>	26
3.1.2	Cuantificación de fenoles totales en <i>Eichhornia crassipes</i>	27
3.1.3	Cuantificación espectrofotométrica de Taninos Hidrolizables	29
3.2	BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)	31
3.3	CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	36
3.3.1	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y alta resolución (HRTEM)	36
3.3.2	Análisis Termogravimétrico (TG)	59

3.3.3 Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	61
3.3.4 Área superficial	63
3.3.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	64
3.4 RECUPERACIÓN DE AgNP EN LAS SUSPENSIONES	66
3.5 CUANTIFICACIÓN DE PLATA EN LAS SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)	67
3.6 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BACTERICIDA	71
a) <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	
3.6.1 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas	71
3.6.2 Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable	72
3.6.3 Determinación de la mínima bactericida (MIB)	73
3.6.4 Comparación entre agentes microbianos de plata	78
3.6.5 Crecimiento bacteriano en presencia de AgNP	81
b) <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	
3.6.6 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas	82
3.6.7 Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable	84
3.6.8 Determinación de la mínima concentración bactericida (MIB)	85
3.6.9 Comparación entre agentes microbianos de plata	87
3.6.10 Crecimiento bacteriano en presencia de AgNP	90
3.6.11 Influencia del extracto de <i>E. crassipes</i> como agente microbicida	91
CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química que constituye a los taninos	7
Figura 1.2 Cumplimiento al reto microbiano de derivados clorados, extractos cítricos y coloidales en base a la NOM-181-SSA1-1998	15
Figura 3.1 Espectro UV de polifenoles presentes en raíces, tallos y hojas de <i>Eichhornia crassipes</i>	26
Figura 3.2 Curva de calibración fenoles totales	27
Figura 3.3 Espectro UV de la hidrólisis de taninos hidrolizables	29
Figura 3.4 Curva de calibración para ácido elágico	30
Figura 3.5 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 12 .	31
Figura 3.6 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 10 .	32
Figura 3.7 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 9 ...	33
Figura 3.8 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 7	33
Figura 3.9 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 4 ...	34
Figura 3.10. HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 12 a) partícula icosaédrica b) romboédrica.c) AgNP con presencia de maclas	36
Figura 3.11 AgNP a pH 12 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	37
Figura 3.12 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 12 con su respectivo patrón de FFT a) nanopartícula de Ag, y nanopartículas de AgO b) estructura trigonal y c) hexagonal	37
Figura 3.13 Análisis EDS de AgNP sintetizadas con hojas y pH 12	38
Figura 3.14 HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 12: partícula a) esférica y b) cúbica	39
Figura 3.15 AgNP a pH 12 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	39
Figura 3.16 Imagen HRTEM de nanopartículas de AgO sintetizadas con tallos y pH 12: a) estructura triclinica y b) cúbica	40

ÍNDICE DE FIGURAS (cont.)

Figura 3.17	HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 10: a) Forma dodecaedro-romboidal truncada y b) dodecaedral-rombica, c) icosaedral	40
Figura 3.18	AgNP a pH 10 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	41
Figura 3.19	Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas a pH 10 a una orientación [4,-8,0] con arreglo a) cúbico y b) trigonal	41
Figura 3.20	Análisis EDS de AgNP sintetizadas con hojas y pH 10	42
Figura 3.21	HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 10: a) Forma cubica truncada en las esquinas y b) dodecaédrica	42
Figura 3.22	AgNP con pH 10 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	43
Figura 3.23	Imagen HRTEM de partículas producidas a pH 10 a) AgO con arreglo cúbico eje de zona [8,-8,0] y b) Ag con arreglo hexagonal y eje de zona [2,-2,0]	43
Figura 3.24	Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con raíz y pH 10: forma cúbica	44
Figura 3.25	AgNP a pH 10 y raíces: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	44
Figura 3.26	a) Imagen HRTEM de partículas de AgO con arreglo cúbico producidas a pH 10	45
Figura 3.27	Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 7 a) Forma icosaédrica, b) esférica c) octaédrica	47
Figura 3.28	AgNP a pH 7 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	47
Figura 3.29	Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 7 con su respectivo patrón de FFT a) nanopartícula de Ag, b) nanopartícula en fase Ag ₂ O ₃ y c) nanopartícula de AgO	48

ÍNDICE DE FIGURAS (cont.)

Figura 3.30	Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 7 a) morfología cuboctaédrica, b) nanocrystal superpuesto a AgNP	48
Figura 3.31	AgNP a pH 7 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	49
Figura 3.32	Imagen HRTEM y FFT de nanopartículas de sintetizadas con tallos y pH 7: a) nanopartícula de AgO y estructura cúbica y b) nanopartícula de Ag ₂ O ₃ y estructura hexagonal	49
Figura 3.33	Imágenes HRTEM que muestran la morfología de nanopartículas sintetizadas con raíces y pH 7 a) morfología octaédrica b) cuboctaédrica	50
Figura 3.34	AgNP a pH 7 y raíces: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	50
Figura 3.35	Imagen HRTEM y FFT de nanopartículas de sintetizadas con raíces y pH 7: nanopartículas de AgO y a) estructura hexagonal, b) estructura cúbica; c) nanopartícula de Ag ₂ O ₃ y estructura trigonal	51
Figura 3.36	Análisis EDS de AgNP sintetizadas con raíces y pH7	51
Figura 3.37	Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 4 a) morfología cuboctaédrica, b) icosaédrica, c) partícula esférica con efecto moiré	53
Figura 3.38	AgNP a pH 4 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	54
Figura 3.39	Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas con hojas a pH 4 a) con arreglo hexagonal y b) triclinico	54
Figura 3.40	Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 4 a) morfología cuboctaédrica y b) cúbica	55
Figura 3.41	AgNP a pH 4 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	55

ÍNDICE DE FIGURAS (cont.)

Figura 3.42 Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas a pH 4 con tallos y arreglo a) cúbico y b) trigonal	56
Figura 3.43 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con raíces y pH 4 a) morfología cubica truncada y b) icosaedrales	56
Figura 3.44 AgNP a pH 4 y raíces: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula	57
Figura 3.45 Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas a pH 4 con raíces y arreglo a) hexagonal y b) trigonal	57
Figura 3.46. Termograma de las hojas de <i>Eichhornia crassipes</i>	59
Figura 3.47. Termograma de los tallos de <i>Eichhornia crassipes</i>	60
Figura 3.48. FT-IR de la biomasa de a) tallos, b) hojas y c) raíces previo a la síntesis de AgNP	61
Figura 3.49 FT-IR de la biomasa de a) tallos, b) hojas y c) raíces posterior a la síntesis de AgNP	62
Figura 3.50 Micrografía de la estructura de: a) hojas y b) tallos de <i>Eichhornia crassipes</i> después de ser acondicionada con HCl.....	64
Figura 3.50 cont. Micrografía de la estructura de: c) raíces de <i>Eichhornia</i> <i>crassipes</i> después de ser acondicionada con HCl y d) estructura de celulosa y hemicelulosa	65
Figura 3.51 Espectro EDS de la biomasa hojas de <i>Eichhornia crassipes</i>	65
Figura 3.52 Espectro UV-Vis para la optimización del tiempo de centrifugación de las suspensiones de AgNP a 10,000 rpm.....	67
Figura 3.53 Espectro UV-Vis de AgNP-susp y AgNP-cen sintetizadas con hojas y buffer pH 12.....	70
Figura 3.54 Número de colonias de <i>E. coli</i> en función de la concentración de AgNP a partir de concentración inicial de a) 460 UFC/mL y b) 860 UFC/mL	74
Figura 3.55 Porcentaje de supervivencia de <i>E. coli</i> aplicando: a) solución comercial de plata ionizada-SCOM, b) nitrato de plata- AgNO ₃ , c) nanopartículas de plata-AgNP y d) suspensión de AgNP	79

ÍNDICE DE FIGURAS (cont.)

Figura 3.56 Curva de crecimiento de E. coli en presencia de diferentes concentraciones de AgNP	81
Figura 3.57 Porcentaje de supervivencia de S. aureus al aplicando: a) solución comercial de plata ionizada-SCOM, b) nitrato de plata- AgNO ₃ , c) nanopartículas de plata-AgNP sólidas y d) suspensión de AgNP-SUSP, en el rango de 1 a 20 mg/L.....	88
Figura 3.58 Curva de crecimiento de S. aureus en presencia de diferentes concentraciones de AgNP	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Reactivos	16
Tabla 2.2	Condiciones de secado para <i>Eichhornia crassipes</i>	17
Tabla 3.1	Concentración de fenol en mg/L para las secciones de <i>Eichhornia crassipes</i> antes y después del lavado con HCl	28
Tabla 3.2	Porcentaje de taninos hidrolizables estimados como ácido elágico (A.E.) y taninos hidrolizables (T.H.)	30
Tabla 3.3	Picos de absorbancia de las muestras (nm)	35
Tabla 3.4	Parámetros obtenidos en la síntesis de AgNP en pH básico para: hojas (H), tallos (T) y raíces (R)	45
Tabla 3.5	Parámetros obtenidos en la síntesis de AgNP a pH 7 para hojas (H), tallos (T) y raíces (R)	52
Tabla 3.6	Parámetros obtenidos en la síntesis de AgNP a pH 4 para hojas (H), tallos (T) y raíces (R)	58
Tabla 3.7	Área superficial y porosidad en <i>Eichhornia crassipes</i>	63
Tabla 3.8.	Recuperación de AgNP en polvo de las suspensiones después del proceso de ultracentrifugación	66
Tabla 3.9	Concentración en mg/L de plata para las fracciones obtenidas de las suspensiones con raíces tallos y hojas a pH 12	68
Tabla 3.10	Cuenta en placa obtenida para cada una de las repeticiones del inóculo 1×10^{-7} (Ec1, Ec 2 y Ec 3).....	71
Tabla 3.11	Cuenta en placa del crecimiento de <i>E. coli</i> con diferentes concentraciones del inóculo y AgNP :Inc.-Incontable	72
Tabla 3.12	No. de colonias de <i>E. coli</i> en función de la concentración de AgNP	74
Tabla 3.13	UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB (Inc.-incontable) y b) duplicado	75
Tabla 3.14	Actividad antimicrobiana reportada AgNP utilizando la cepa <i>E. coli</i> .SD- <i>sin definir</i>	77

ÍNDICE DE TABLAS (cont.)

Tabla 3.15 UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB con solución comercial de plata ionizada-SCOM, nitrato de plata- AgNO ₃ , nanopartículas de plata-AgNP y la suspensión de AgNP -SUSP, para <i>E. coli</i> a partir de una concentración inicial de a) 510 y b) 740 UFC/mL	78
Tabla 3.16 Cuenta en placa obtenida para inóculos de <i>S. aureus</i> . Inc.- Incontable	83
Tabla 3.17 Cuenta en placa del crecimiento de <i>S. aureus</i> con diferentes concentraciones del inóculo y AgNP.....	84
Tabla 3.18 UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB utilizando el inóculo preparado con la dilución 1x10 ⁻¹ y duplicado	85
Tabla 3.19 Actividad antimicrobiana reportada para AgNP utilizando la cepa <i>S. aureus</i>	86
Tabla 3.20 UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB con solución comercial de plata ionizada-SCOM, nitrato de plata- AgNO ₃ , nanopartículas de plata-AgNP y la suspensión de AgNP -SUSP, para <i>S. aureus</i> a partir de una cuenta inicial incontable	88
Tabla 3.21 UFC/mL antes y después de aplicar el extracto de <i>E. crassipes</i> sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> (Inc.-Incontable).....	91

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la ciencia que interviene en el diseño, la producción y el empleo de estructuras y objetos, que cuentan con dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nanómetros. Los resultados de la nanociencia, se transforman en nanotecnología como nuevos y funcionales materiales, que ofrecen soluciones a los retos tecnológicos y ambientales actuales por su aplicación en sectores tales como el de la información, comunicaciones, energía, tecnologías alimentarias, productos sanitarios y farmacéuticos entre otros (Huy *et al.*, 2014; Khloud *et al.*, 2009).

Para la obtención de nanopartículas metálicas se han utilizado métodos físicos, químicos o biológicos, sin embargo, la necesidad de protocolos de obtención amigables con el medio ambiente y no tóxicos, ha conducido a una demanda creciente de la bionanotecnología, a través de compuestos polifenólicos que se encuentran en la estructura de las plantas y que actúan como agentes reductores debido a sus numerosos grupos -OH (Li *et al.*, 2015; Prusty y Parida, 2014; Rodríguez *et al.*, 2013), obteniendo nanopartículas con diámetros en la escala de puntos cuánticos.

Entre las nanopartículas metálicas frecuentemente sintetizadas (cobre, zinc, titanio, magnesio, oro y plata) las nanopartículas de plata (AgNP) han sido ampliamente utilizadas como agente antimicrobiano (Jena *et al.*, 2015; Arooj *et al.*, 2014), Muchos factores como la capacidad de adaptación de las bacterias, el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos y la escasa velocidad de producción de nuevos antibióticos, ha generado que los microorganismos desarrollen mecanismos de adaptación para contrarrestar el efecto de antibióticos tradicionales, perfilando a las AgNP como una alternativa prometedora para combatir la resistencia microbiana debido a su efectividad al aplicarse a muy bajas concentraciones (Dhand *et al.*, 2016), y a la elevada toxicidad que presentan contra virus, bacterias y otros organismos eucariotes (Das *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2009).

En este proyecto de investigación, se propuso el uso de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), planta reconocida como maleza acuática en la síntesis de nanopartículas de plata a través del método de bio-reducción desarrollado por Rosano-Ortega *et al.*, 2006). Se determinaron las condiciones óptimas en la biosíntesis considerando el pH y sección de lirio (raíces, tallos y hojas). Las nanopartículas fueron caracterizadas utilizando microscopía electrónica de transmisión y por primera vez, se reportó el contenido de fenoles totales y taninos hidrolizables entre las secciones del lirio. Finalmente con las AgNP obtenidas, se realizaron estudios de actividad microbici-da frente a las cepas *Escherichia coli* ATCC 25992 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, comparando su efecto microbici-da contra el de un agente comercial a base de plata ionizada, nitrato de plata en solución y la suspensión de AgNP obtenida al finalizar el proceso de biosíntesis.

1. FUNDAMENTOS

1.1 AGUA

La mayoría de las formas de vida en la tierra dependen del agua. A pesar de ser un recurso abundante en el planeta, la fracción de agua dulce que puede utilizarse para el desarrollo de la humanidad es mínima. En la actualidad la disponibilidad de este recurso está siendo afectada y limitada por la presencia de contaminantes físicos, químicos o biológicos, donde la presencia de patógenos ha cobrado un interés especial ya que representa uno de los mayores riesgos a la salud por la creación de infecciones gastrointestinales y sistémicas que de acuerdo a la OMS, provocan más de 2.2 millones de muertes al año (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

Para la detección de agentes patógenos en el agua, se han utilizado microorganismos indicadores de enfermedades infecciosas como modelos en experimentos bactericidas, utilizando cepas Gram negativas (-) y Gram positivas (+) como *E. coli* y *S. aureus* (Flores, 2014; Morones *et al.*, 2005). Las diferencias estructurales entre ambos grupos de bacterias y la exposición a elevadas dosis de antibióticos convencionales, ha resultado en la mutación de algunos genes reguladores, lo que ha provocado resistencia hacia los desinfectantes convencionales (Celis y Yamile, 2012; Hongna *et al.*, 2011).

En el escenario actual, los materiales a nanoescala han emergido como agentes antimicrobianos alternativos, debido a su elevada área superficial y propiedades físicas únicas (Dhand *et al.*, 2016; Rai *et al.* 2009), presentando un enfoque moderno e innovador para desarrollar y probar nuevas formulaciones basadas en nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas que eliminen los mecanismos de resistencia a los antibióticos tradicionales (Padalia *et al.*, 2015; Celis y Yamile, 2012).

1.2 NANOTECNOLOGÍA

Durante las últimas dos décadas, términos como nanotecnología, nanociencia, nanopartículas, nanomateriales entre otros, han cobrado más que nunca una notable relevancia. Esto se debe a que la nanotecnología, junto con la biotecnología, se han convertido en áreas prioritarias en el desarrollo científico y tecnológico actual por su influencia en la calidad de vida de la sociedad moderna (López-Lorente y Valcárcel, 2016).

La nanotecnología es la ciencia que implica la manipulación de átomos, electrones, protones y neutrones para desarrollar materiales alternativos, los cuales presentan propiedades distintas en comparación con su estado original (Ahmed *et al.*, 2016; Chudovoba *et al.*, 2013; Rodríguez-León *et al.*, 2013). La mayoría de sus aplicaciones se deben al hecho de que las propiedades de un material en escala nanométrica (1×10^{-9} m), difieren del material a nivel macro por dos principales razones:

- a) La elevada relación entre el área superficial/volumen de los nanomateriales, potencializa su reactividad, modificando sus propiedades mecánicas y eléctricas.
- b) En escala nanométrica, los efectos cuánticos dominan el comportamiento de la materia, provocando cambios en sus propiedades electromagnéticas y ópticas (Tan *et al.*, 2015).

Una de las más importantes áreas que se han desarrollado a través de la nanotecnología es la producción de nanopartículas metálicas. Las nanopartículas son materiales que se encuentran en el rango de 1-100 nm, las cuales no representan compuestos químicos con un enlace metal-metal bien definido y con una determinada nuclearidad, sino son racimos de átomos que se encuentran estabilizados para evitar su aglomeración (Rosano-Ortega, 2009; Khloud *et al.*, 2010). Al encontrarse en dimensiones próximas al átomo, las nanopartículas

desarrollan propiedades diferentes y de gran potencialidad, distintas a la forma iónica y en macroescala del metal (Devi y Joshi, 2015). La reactividad que presentan se puede atribuir a su número de bordes, esquinas, y defectos de la superficie (Devi y Joshi, 2015). Sus propiedades fisicoquímicas y óptico electrónicas también son influenciadas por su cristalinidad, forma, estructura y composición (Jena *et al.*, 2015) lo cual a su vez depende del tipo de método utilizado para la síntesis (Gaillet y Rouanet, 2015).

En la actualidad, existen diversos procedimientos para la síntesis de nanopartículas que en general se agrupan en físicos, químicos y biológicos (Prusty y Parida, 2014). Los métodos físicos han ganado terreno por ser factibles para la producción de grandes cantidades de nanopartículas. Sin embargo, para su obtención, son necesarias condiciones muy específicas y equipos complejos, además presentan cierta dificultad para controlar completamente la distribución del tamaño obtenido (Dong *et al.*, 2014). Los métodos químicos, ofrecen la capacidad de sintetizar nanopartículas con tamaños de partícula uniformes y deseados, empleando equipos relativamente simples. Entre los métodos químicos, la reducción química es el proceso más popular y utiliza agentes reductores como borohidruro de sodio o hidrazina. La desventaja de este método es que los agentes reductores y estabilizadores, se convierten en residuos altamente tóxicos al finalizar el proceso de síntesis (Padalia *et al.*, 2015).

El tercer método de síntesis de nanopartículas a gran escala, son las técnicas “verdes” o biológicas, que han resultado ser las más viables, económicas y amigables con el ambiente ya que no se utilizan agentes físicos o químicos durante la síntesis, mismos que son sustituidos por extractos de plantas (Paul *et al.*, 2015; Goswami *et al.*, 2015). La reducción de iones metálicos utilizando plantas, es posible cuando éstas contienen dentro de su estructura fitoquímicos tales como antioxidantes, flavonoides, flavonas y polifenoles, los cuales participan en la biosíntesis de nanopartículas metálicas (Banala *et al.*, 2015; Murugan *et al.*, 2014; Prusty y Parida, 2014; Rehab y Abuelmagd 2014;

Logeswari *et al.*, 2013), además, favorecen la formación de una capa que cubre las nanopartículas para evitar su aglomeración y estabilización en el medio (Devi y Joshi, 2015).

1.3 TANINOS

Los compuestos polifenólicos (CPF), son un grupo diverso de fitoquímicos que son considerados metabolitos secundarios y se encuentran distribuidos en todas las secciones de las plantas. Son sintetizados en el retículo endoplásmico y almacenados en las vacuolas en el interior de la célula (Martínez-Ramírez *et al.*, 2010). Comprenden una amplia gama de sustancias que poseen al menos un grupo hidroxilo (-OH) en uno o más anillos fenólicos, lo cual los convierte en compuestos ricos en antioxidantes con una elevada capacidad para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015; Panimathy 2011). La estructura de los CPF varía desde los compuestos más simples (monómeros y oligómeros) hasta polímeros complejos donde se encuentran incluidos los taninos, que resultan ser el subgrupo de CPF posiblemente de mayor tamaño (Vázquez *et al.*, 2012).

Los taninos son metabolitos polifenólicos de masa molecular relativamente alta (500-20000 Da) y de complejidad elevada (12-16 hidroxilos en 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 Da) que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015). En los tejidos leñosos, cortezas y raíces se acumulan taninos macromoleculares con estructuras complejas, mientras que en los órganos vegetales con intensa actividad fisiológica, se encuentran en forma de moléculas más pequeñas (Palici *et al.*, 2005). Los taninos se presentan en mayor cantidad en las secciones más valiosas a la planta como son las hojas nuevas y flores, sin embargo su contenido y composición también se ve influenciado por ciertos factores tales como altas temperaturas, estrés hídrico, intensidades de luz extremas, la calidad del suelo, especie, edad y la sección de la planta (Falção y Araujo, 2011; Frutos *et al.*, 2004).

En las especies vegetales, los taninos participan en funciones tales como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, de aceites esenciales, resinas, ligninas (Álvarez y Lock de Ugaz, 1992); en el proceso de fotosíntesis, actividad enzimática, formación de componentes estructurales, aleopatía y como mecanismo de defensa ante los factores adversos del ambiente (Kasay *et al.*, 2013). También tienen la capacidad de precipitar proteínas solubles, polisacáridos y alcaloides, además de inhibir la oxidación de sustratos, moléculas simples o polímeros (Frutos *et al.*, 2004), actúan como captadores de radicales libres y en algunas ocasiones en la quelación de metales (Martínez-Ramírez *et al.*, 2010; Okuda y Ito, 2011). Estas propiedades, se basan primordialmente en su estructura química la cual permite clasificarlos en taninos hidrolizables y condensados (Okuda y Ito, 2011), de acuerdo a los grupos polifenólicos que cada uno presenta y son descritos a continuación:

- a) Taninos Hidrolizables (TH): su constitución está conformada por un núcleo de hidratos de carbono (glucosa) cuyos grupos hidroxilo están esterificados con ácidos fenólicos principalmente, gálico y hexahidroxidifénico (Frutos *et al.*, 2004; Hourdebaiht *et al.*, 2007). Son clasificados como hidrolizables debido a que por la acción de los ácidos, bases o enzimas, forman como subproductos un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico (Álvarez y Lock de Ugaz, 1992). Aquellos que en la hidrólisis forman ácido gálico y glucosa se conocen como galotaninos, y los que forman ácido elágico y glucosa se conocen como elagitaninos (Figura 1.1).

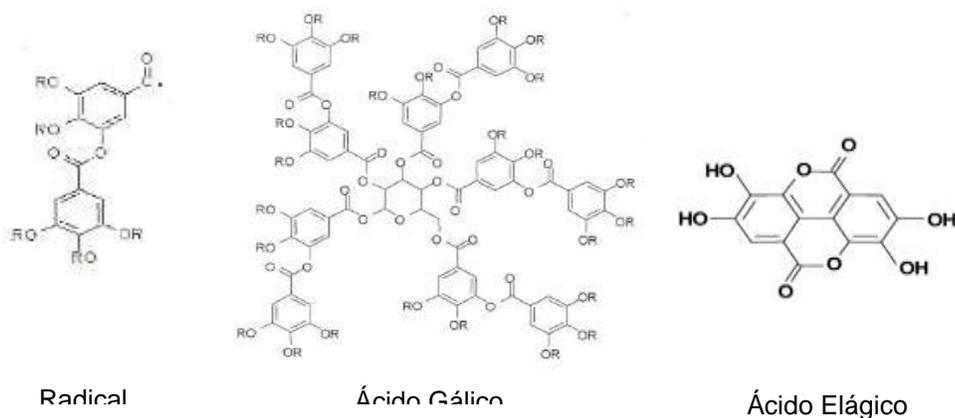


Figura 1.1 Estructura química que constituye a los taninos (Rosano-Ortega, 2009). 7

Los galotaninos (GT) son considerados como las formas más simples de los taninos hidrolizables. Son ésteres de los ácidos gálicos y di gálico, unidos entre sí por enlaces ésteres entre el carboxilo (COOH) de uno de ellos y el -OH del otro y a su vez unidos a hexosas como la glucosa. Los elagitaninos (ET) están estructurados como moléculas lineales de glucosa enlazadas a las funciones carboxilo de los grupos hexahidroxidifénicos (HHDP), del ácido elágico. Los elagitaninos son constituyentes típicos en muchas familias de plantas, en contraste los galotaninos no son ampliamente encontrados en la naturaleza (Arapitsas, 2012). La estructura de un ET puede presentar diversos puntos de polimerización por esterificación al igual que los GT, tanto en la molécula glucídica como en los grupos HHDP disponibles lo que le da la posibilidad de formar estructuras de mayor peso molecular en comparación a los GT. Los taninos de alto peso molecular son mejores para precipitar proteínas que los taninos más pequeños. Además, el pH ácido favorece la formación de complejos proteína-tanino, mientras que un pH básico (por encima del pKa de los grupos hidroxilo fenólicos; por ejemplo, $\text{pH} > 9$), ioniza los grupos hidroxilo; por tanto, disminuye considerablemente la formación de puentes de hidrógeno, y la precipitación de proteínas no se producen fácilmente. En cualquier caso, las interacciones covalentes entre TH y proteínas son mucho más complejas que las interacciones no covalentes (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015).

b) Taninos no hidrolizables ó condensados: Los taninos condensados o proantocianidinas, son polímeros no ramificados de flavonoides unidades (flavan-3-ol, flavan-3,4-diol), y por lo general tienen un peso molecular más alto de 1000-20000 Da, en comparación con el de los taninos hidrolizables que se encuentra en el rango de 500-3000 Da (Frutos *et al.*, 2004). Estas sustancias no son hidrolizables por los ácidos ni por las enzimas. Son poco solubles en agua y en lugar de hidrolizarse cuando se hacen hervir en ácido diluido, se transforman en producto de condensación. También son llamados catequínicos porque sometidos a destilación seca, casi todos, dan pirocatequina (Hourdebaigt *et al.*, 2007).

Una de las aplicaciones novedosas en la que se han utilizado los taninos hidrolizables, fue la desarrollada por Rosano-Ortega (2009), que utilizó los TH del lirio acuático durante el proceso de síntesis de nanopartículas metálicas. Los TH fueron acondicionados a través de un lavado ácido que favoreció la formación de radicales de compuestos orgánicos. La carga negativa recayó sobre los átomos de carbono que interaccionan con los iones metálicos presentes en las soluciones acuosas reduciéndolas a su estado cerovalente. La estabilización de las nanopartículas obtenidas, se realizó a través de fuerzas de Van der Waals en donde las moléculas orgánicas de los TH quedaron adsorbidas en la superficie de las nanopartículas y proporcionaron una barrera esférica de manera que los centros metálicos quedaron separados uno del otro previniendo la aglomeración.

Esta metodología ha sido aplicada exitosamente en la síntesis de nanopartículas de plata de acuerdo a lo reportado por Munive-Olarte (2014), sin embargo la cuantificación de TH en las plantas utilizadas aún no ha sido reportada. La cantidad de TH en el lirio acuático puede influir directamente en la producción de AgNP por su participación activa durante la conversión de iones Ag^+ a Ag^0 y tener un impacto en las propiedades antimicrobianas de las partículas obtenidas.

1.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)

Entre las nanopartículas metálicas frecuentemente sintetizadas (cobre, zinc, titanio, magnesio, oro y plata) las nanopartículas de plata (AgNP) han sido preferidas como agente antimicrobiano (Jena *et al.*, 2015; Arooj *et al.*, 2014), debido a su efectividad al aplicarse a muy bajas concentraciones (Dhand *et al.*, 2016), y a la elevada toxicidad que presentan contra virus, bacterias y otros organismos eucariotes (Das *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2009), además de tener una baja toxicidad hacia las células de los mamíferos en comparación con los otros metales (Devi y Joshi, 2015), convirtiéndose en una alternativa prometedora para combatir la resistencia microbiana hacia los antibióticos tradicionales.

La plata, es un agente inorgánico ampliamente reconocido por sus propiedades antibacteriales contra las 16 principales especies de bacterias (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Prabhu y Poulouse 2012; Ibrahim, 2015). Sus propiedades médicas han sido conocidas desde hace más de 2000 años y desde inicios del siglo XIX se ha utilizado comercialmente (Khalil *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2013). Cuando la era de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina, los antisépticos a base de plata fueron sustituidos (In-sok *et al.*, 2012). Sin embargo el final del siglo XX, trajo consigo un incremento en la resistencia bacteriana hacia los medicamentos convencionales, por lo que la plata y sus propiedades bactericidas nuevamente cobraron importancia (Kvitek *et al.*, 2008). La plata ha sido utilizada en el campo médico para el tratamiento de quemaduras, fabricación de prendas textiles, desinfección de agua y prevención de biofilms, sin embargo la aplicación en forma de nanopartículas no se han desarrollado completamente (Maiti *et al.*, 2014). Con el auge de la Nanotecnología se han desarrollado nanomateriales a base de sales de plata, en los cuales el incremento del área superficial disponible para estar en contacto con los microorganismos (Padalia *et al.*, 2015; Salomoni *et al.*, 2015; Prabhu y Poulouse, 2012), puede maximizar la efectividad de la aplicación.

La necesidad de protocolos de obtención de nanopartículas amigables con el medio ambiente y no tóxicos, ha conducido a una demanda creciente de nanotecnología, incrementando el interés hacia la biosíntesis de nanopartículas metálicas a través de compuestos que se encuentran en extractos de plantas (Prusty y Parida, 2014; Li *et al.*, 2015). En la biosíntesis de AgNP, se ha utilizado el extracto de plantas tales como *Carica papaya* (Banala *et al.*, 2015), *Ocimum gratissium* (Das *et al.*, 2016), *Azadirachta indica* (Ahmed *et al.*, 2016; Velusamy *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2013), *Lycopersicon esculentum* (Maiti *et al.*, 2014), *Punica granatum* (Rehab y Abuelmagd, 2014), *Acacia leucophloea* (Murugan *et al.*, 2014), Bamboo (Yasin *et al.*, 2013), *Rumex Hymenosepalus* (Rodríguez-León *et al.*, 2013), *Juglans regia* (Koberkandi *et al.*, 2012), *Ananas comosus* (Ahmad y Sharma, 2012), *Euphorbia hirta* (Elumalai *et al.*, 2010), Black tea (Begum *et al.*,

2009), Geranium (Shankar *et al.*, 2003) y *Eichhornia crassipes* (Rosano-Ortega, 2009; Prusty y Parida, 2014; Kiruba *et al.*, 2012; Thombre *et al.*, 2014; Jannathul y Lalitha, 2013; Munive-Olarte 2014). Particularmente en el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), se ha identificado que la presencia de compuestos polifenólicos (taninos) favorece el proceso de bio-reducción durante la síntesis de AgNP por los numerosos grupos OH que contiene su estructura (Medini *et al.*, 2014; Rodríguez-León *et al.*, 2013; Chantirakul *et al.*, 2009; Rosano-Ortega, 2009).

1.5 EFECTOS MICROBICIDAS DE LA PLATA

Los efectos tóxicos que ejercen los compuestos de plata en las bacterias han sido estudiados por más de 60 años (Wen-Ru *et al.*, 2010), sin embargo el mecanismo exacto aún es parcialmente conocido. Los mecanismos de acción de los compuestos a base de plata, son sugeridos de acuerdo a los cambios morfológicos y estructurales encontrados en las células bacterianas (Wang *et al.*, 2015; Paredes *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2009).

1.5.1 Plata iónica /AgNO₃

Se ha reportado que la potencia biocida de un aditivo de plata, se relaciona directamente con la cantidad de plata y la velocidad en que los iones son liberados al medio (Nowack *et al.*, 2011). La plata en su estado sólido es inerte, pero al ionizarse se vuelve altamente reactiva. Su mecanismo de acción frente a las bacterias, se encuentra ligado a la interacción con los grupos tiol encontrados en las enzimas respiratorias (Rai *et al.*, 2009). Los iones Ag⁺ pueden llevar a la inactivación de las enzimas por la formación de complejos de plata con donadores de electrones que contienen azufre, oxígeno o nitrógeno (contenidos en grupos tiol, carboxilatos, fosfatos, hidroxilos y aminas constituyentes de las biomoléculas que conforman la célula) desplazando los cationes de sus sitios originales en las enzimas y llevando a cabo la desnaturalización de las proteínas (Velusamy *et al.*,

2015; Wen-Ru *et al.*, 2010; Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Este fenómeno provoca cambios estructurales que afectan el proceso de respiración, produciendo la muerte de las células bacterianas.

La interacción de los iones plata con las bacterias, también puede tener inferencia en los mecanismos de replicación del ADN. Cuando los iones Ag^+ ingresan al interior de la bacteria, perturban el estado de reposo en que se lleva a cabo la replicación del ADN y provocan apoptosis en la célula (Raffi *et al.*, 2008; Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Rai *et al.*, 2009). Por otra parte, la carga positiva que contienen los iones Ag^+ , también ha sido considerada como un posible mecanismo de actividad antibacteriana, ya que por fuerzas electrostáticas, éstos pueden ser atraídos a la membrana celular que se encuentra cargada negativamente (Maiti *et al.*, 2014).

A pesar de que los antibióticos a base de sales de plata no generan resistencia en los microorganismos por su método de acción (Soo *et al.*, 2011), existen algunas limitaciones al utilizarlos como agentes antimicrobianos. Las razones principales incluyen efectos interferentes por las sales (NO_3^- , SO_4^-), la continuidad en la liberación iones Ag^+ a partir su forma metálica y principalmente por ser fácilmente inactivados por complejación o precipitación debido a su naturaleza reactiva (Maiti *et al.*, 2014; Yasin *et al.*, 2013; In-sok *et al.*, 2012). Estas limitaciones pueden excluirse al utilizar la plata en forma de nanopartículas ya que al ser compuestos cerivalentes actúan como “caballo de troya” permitiendo el transporte de iones metálicos al interior de la célula incrementando su actividad antibacteriana sin reaccionar con las sustancias presentes en el medio (Kim *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2009) por lo que actualmente son considerados la alternativa más adecuada para aplicaciones médicas (Maiti *et al.*, 2014)

1.5.2 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata muestran eficientes propiedades antimicrobianas en comparación con las sales debido a su área superficial extremadamente elevada que provee un mejor contacto con los microorganismos (Ibrahim, 2015), sin embargo aún no se ha definido claramente si la toxicidad que presentan hacia las bacterias es atribuida exclusivamente a sus propiedades o a la presencia de iones Ag^+ en su estructura (Velusamy *et al.*, 2015; Raffi *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008).

Los mecanismos a través de los cuales interactúan las AgNP con las bacterias muestran similitudes a los ejercidos por la plata iónica, sin embargo se han agrupado en 4 mecanismos principales:

1. Acción antimicrobiana por atracción electrostática: Se ha reportado que la atracción electrostática entre las células bacterianas cargadas negativamente y las nanopartículas que tiene carga positiva es crucial en su actividad bactericida. Al incorporarse en la membrana celular, afectan la permeabilidad y respiración por la formación de agujeros en la superficie (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Prahbu y Poulouse, 2012). Algunas nanopartículas también ingresan al interior de la bacteria liberando iones Ag^+ provocando cambios irreversibles en la estructura de la bacteria (Maiti *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2009; Raffi *et al.*, 2008).

2. Producción de radicales libres: uno de los efectos de los iones de plata es la inhibición de las enzimas que contienen un grupo tiol, por ejemplo la enzima NADH-deshidrogenasa II en el sistema respiratorio, la cual está implicada en la producción de especies reactivas de oxígeno. Las células a continuación, tienen necesidad de reducir la concentración de H_2O_2 , que es la fuente de radicales libres y aumentar a su vez, la producción de catalasa induciendo las vías de apoptosis en las bacterias (Kon y Rai, 2013).

3. Afectación en la síntesis capsular: la membrana exterior de las bacterias tiene como función proveer una efectiva barrera permeable, sin embargo al entrar en contacto con las AgNP la cápsula sufre una alteración en sus perfiles fosfotirosina, con lo que la permeabilidad de la bacteria se ve afectada liberando los lipopolisacáridos y proteínas (Velusamy *et al.*, 2015; Raffi *et al.*, 2008; Sondi y Salopek Sondi, 2004). Al quedar desestabilizada la membrana, también disminuyen los niveles de adenosín trifosfato (ATP) esenciales para subsistir. Lo cual resulta en la muerte celular bacteriana (Raffi *et al.*, 2008).

4. Reacción con aminoácidos y grupos fosfóricos de las moléculas del ADN: Cuando las nanopartículas entran en la célula bacteriana, se forma una región de bajo peso molecular en el centro de la bacteria, entonces ésta actúa protegiendo el ADN de los iones de plata, inhibiendo su capacidad replicativa. Las nanopartículas pueden perturbar las funciones de las proteínas que contienen azufre y fósforo tales como el ADN, lo que lleva a la inhibición de las funciones de la enzima (Devi y Joshi, 2015; Li *et al.*, 2015; Kon y Rai, 2013; Prabhu y Poulouse, 2012).

Los efectos microbicidas que presentan los compuestos a base de plata en los microorganismos, ha generado que sean producidos comercialmente con aplicaciones en la desinfección de agua, frutas y verduras, principalmente en forma de plata coloidal. En el mercado, estos desinfectantes compiten con productos elaborados a base de compuestos químicos o naturales tales como agentes los clorados (con sustancias como hipoclorito de sodio, clorito de sodio y/o dióxido de cloro), detergentes (lauril sulfato de sodio), ácidos orgánicos (como el ácido cítrico o el ascórbico) y/o extractos cítricos (como el de semilla de toronja).

En pruebas de eficiencia realizadas por la procuraduría federal del consumidor (PROFECO) en 2007, los compuestos a base de plata coloidal fueron los agentes más consistentes en la desinfección de al menos el 99.99% de coliformes totales en agua (Figura 1.2). De los 13 agentes probados el 84.16% aprobó el reto

microbiano, mientras que solamente 2 de los 4 derivados clorados fueron eficientes para eliminar las bacterias. Los productos a base de extractos cítricos fueron menos compatibles con la desinfección del agua ya que de 8 productos analizados, únicamente 3 (que representan el 37.5%) alcanzaron los resultados indicados en la norma.

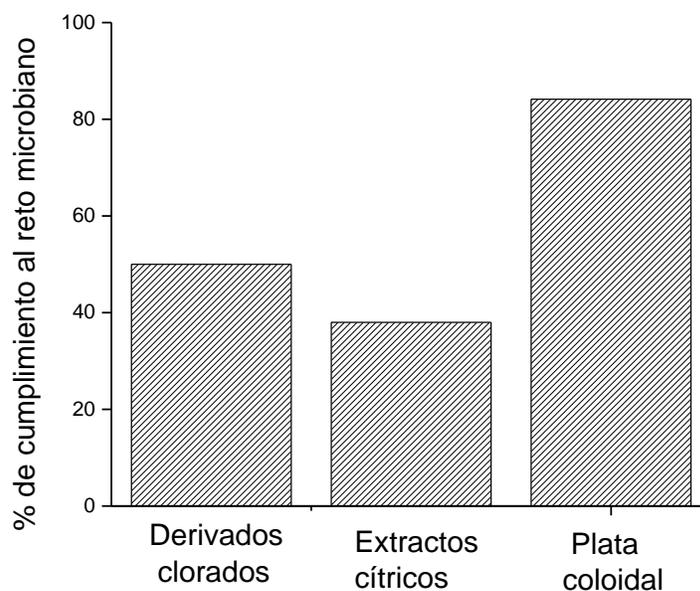


Figura 1.2 Cumplimiento al reto microbiano de derivados clorados, extractos cítricos y plata coloidal en base a la NOM-181-SSA1-1998.

La diferencia entre las eficiencias microbicidas alcanzadas entre los agentes de prueba se encuentra relacionada con los mecanismos de acción de cada uno. Los agentes a base de cloro actúan como agentes oxidantes atacando la pared celular de los microorganismos y su efectividad permanece hasta que el cloro residual se agota, mientras que los extractos cítricos pueden ocasionar la ruptura de la membrana citoplasmática además de la inactivación y/o inhibición de la síntesis de enzimas.

La eficiencia de los agentes comerciales a base de plata ya ha sido confirmada, sin embargo aún queda por explotar su aplicación utilizando la nanotecnología a través de materiales como las AgNP obtenidas por bioreducción durante este estudio.

1. MATERIALES Y MÉTODO

2.1 REACTIVOS

En la Tabla 2.1 se detallan los reactivos utilizados durante el proyecto:

Tabla 2.1 Reactivos.

NO	REACTIVO	MARCA
1	Nitrato de plata ACS reactivo, $\geq 99.0\%$	Sigma-Aldrich
2	Sol. Buffer pH 4 (Ácido cítrico/Hidróxido de sodio/Cloruro)	Fluka
3	Sol. Buffer pH 5 (Ácido cítrico/Hidróxido de sodio)	Fluka
4	Sol. Buffer pH 7 (Fosfato disódico/Fosfato monopotásico)	Fluka
5	Sol. Buffer pH 9 (Bórax/Ácido clorhídrico)	Fluka
6	Sol. Buffer pH 10 (Bórax/Hidróxido de sodio)	Fluka
7	Sol. Buffer pH 12 (Fosfato disódico/Hidróxido de sodio)	Fluka
8	Tripteina Soya Agar (<i>TSA</i>) para microbiología	Fluka
9	Caldo Tripton de Soya (<i>TSB</i>) para microbiología	Fluka
10	Fosfato disódico anhídrido ACS reactivo, $\geq 99.0\%$	Sigma- Aldrich
11	Fosfato monopotásico anhídrido ACS reactivo, $\geq 99.0\%$	Sigma Aldrich
12	Cloruro de magnesio anhídrido, $\geq 98\%$	Sigma
13	Hidróxido de sodio grado reactivo, anhídrido $\geq 98\%$,	Sigma- Aldrich
14	Ácido elágico, estándar analítico	Fluka
15	Alcohol isopropílico, $\geq 99.7\%$	Aldrich
16	Ácido clorhídrico ACS reactivo, 37%	Sigma- Aldrich
18	Fenol ACS reactivo	Sigma- Aldrich
19	4- aminoantipirina	Sigma Aldrich
20	Ferrocianuro de potasio ACS reactivo, $\geq 99.0\%$	Sigma- Aldrich
21	Cloruro de amonio	Sigma- Aldrich
22	Tartrato doble de sodio	Sigma- Aldrich

2.2 MUESTREO DE LIRIO ACUÁTICO Y PROCESAMIENTO

Se colectaron aproximadamente 2 m² de individuos de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) de la laguna Chignahuapan, ubicada en el municipio de Almoloya del Río en el Estado de México, en el sitio localizado a 19°09'34 N y 99°29'32 O. Los ejemplares fueron colocados en recipientes plásticos y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. El muestreo fue realizado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-014-1980: Muestreo en Cuerpos Receptores.

El lirio acuático colectado, fue lavado con agua corriente hasta que el agua de enjuague presentó un color claro. Los ejemplares se dejaron escurrir y secar a temperatura ambiente durante 15 días. Posteriormente, se seccionaron en raíces, tallos y hojas; se cortaron en trozos pequeños cercanos a 1 cm, para facilitar su secado en un horno bajo las condiciones mostradas en la Tabla 2.2:

Tabla 2.2. Condiciones de secado para *Eichhornia crassipes*.

SECCIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO DE SECADO
Raíces	60°C	8 hrs
Tallos	60°C	12 hrs
Hojas	60°C	3 hrs

Los trozos secos se trituraron en una licuadora industrial (OSTER) y se pulverizaron en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino que se tamizó utilizando una malla 20 y se colectaron las partículas menores a 0.84 mm.

El acondicionamiento de la biomasa, se realizó conforme a lo descrito por Rosano-Ortega *et al.* (2006) de la siguiente forma: la biomasa en polvo se lavó 2 veces con una solución de HCl 0.01N dejando reposar 30 minutos entre cada lavado. Posteriormente, se filtró con una tela de algodón y se deshidrató en un horno de secado Riossa H-33 a 50 °C durante 48 horas. La biomasa obtenida, se tamizó utilizando una malla 20 se almacenaron las partículas menores a 0.84 mm.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

2.3.1 Identificación de polifenoles presentes en las secciones de *Eichhornia crassipes*

Para detectar la presencia de polifenoles en las secciones analizadas de *Eichhornia crassipes*, se utilizó el método desarrollado por Rodríguez-León *et al.*, (2013):

Se pesaron 15 mg de muestra seca (raíces, tallos u hojas) de *Eichhornia crassipes* en un tubo de polietileno de 50 mL. Se preparó una solución de etanol/agua (70:30 v/v) y de ésta se adicionaron 30 mL a la biomasa. Se dejó correr la extracción durante 15 días a temperatura ambiente, realizando agitaciones diarias. Al finalizar el tiempo de extracción, las muestras se filtraron y se almacenaron a 4°C. Las soluciones resultantes fueron analizadas en el Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer lambda 35, a una longitud de onda comprendida de 200-800 nm, utilizando como blanco agua deionizada.

2.3.2 Cuantificación de fenoles totales en *Eichhornia crassipes*

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo a la NMX-AA-050-SCFI-2001. Se tomaron 0.25 mL de la extracción realizada en el apartado 2.3.1, y se mezclaron con 2.25 mL de solución etanol/agua (70:30 v/v) en un tubo de ensaye. La preparación se realizó por triplicado de los extractos obtenidos antes y después del lavado con HCl por cada sección de *Eichhornia crassipes*. Para preparar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de fenol a 100 mg/L, y a partir de ésta se prepararon soluciones de 0 a 10 mg/L en intervalos de 2 mg/L. Se adicionó a las muestras, blanco y estándares, 0.25 mL de solución tampón (1.7 g de cloruro de amonio y 10 mg de tartrato doble de sodio en 50 mL de agua deionizada), 0.1 mL de ferricianuro de potasio (2% P/V) y 0.05 mL 4-aminoantipirina (2% P/V), agitando uniformemente entre cada adición y se

realizó la lectura de absorbancia en el Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35, a una longitud de onda de 510 nm.

2.3.3 Cuantificación Espectrofotométrica de Taninos Hidrolizables

Los taninos hidrolizables en cada sección de la biomasa, se identificaron y cuantificaron de acuerdo al método establecido por Isaza *et al.* (2007):

2.3.3.1 Preparación de extractos: se pesaron 10 mg de biomasa seca de cada sección de *Eichhornia crassipes* (raíces, tallos y hojas) y se pusieron en contacto con 5 mL de solución *i*-PrOH-agua (65:35) agitando a 50 rpm por 20 minutos en un agitador orbital. La adición *i*-PrOH-agua (65:35) se repitió en tres ocasiones más para lograr una concentración final de 500 mg/L. Las soluciones resultantes se filtraron y se almacenaron en frascos herméticos cerrados a 4 °C.

2.3.3.2 Hidrólisis de Taninos Hidrolizables: la hidrólisis se realizó por triplicado para cada sección de *Eichhornia crassipes* (raíces, tallos y hojas). En un tubo de polietileno de 50 mL, se colocaron 5 mg de biomasa seca y se adicionaron 10 mL de solución *i*-PrOH-HCl (65:35). La mezcla se dejó reposar durante 24 horas y la solución se filtró. En un tubo de ensaye, se colocaron 1.5 mL de la solución anterior, y se mezclaron con 1.55 mL de HCl 12 N y 1.45 mL de *i*-PrOH; la solución se calentó en un baño maría a 90°C durante 180 min y se analizó en el Espectrofotómetro UV-Vis (la formación de un pico de absorción a 368 nm asegura la correcta hidrólisis de las muestras). El blanco utilizado fue *i*-PrOH-HCl (65:35).

2.3.3.3 Curva de calibración de Taninos Hidrolizables: se utilizó una solución de ácido elágico a 50 mg/L, disolviendo 1 mg de ácido elágico en 20 mL de *i*-PrOH-HCl (65:35). A partir de ésta solución, se prepararon diluciones a 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Las lecturas fueron realizadas en el Espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 368 nm utilizando como blanco *i*-PrOH-HCl (65:35).

2.2.3.4 Cuantificación de Taninos Hidrolizables: se mezclaron 0.25 mL de la solución hidrolizada de taninos (sección 2.3.3.2) con 2.25 mL *i*-PrOH-HCl (65:35). Las soluciones se analizaron en el Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer, Lambda 35 a una longitud de onda de 368 nm. Para eliminar interferencias (flavonoides y clorofilas) se utilizó como blanco el extracto original, mezclando 0.25 mL del extracto de la sección 2.2.3.1 con 2.5 mL de *i*-PrOH-agua (65:35). Los valores se interpolaron en la curva de calibración de ácido elágico y se multiplicaron por un factor gravimétrico de 2.9 para estimación como taninos hidrolizables. Este factor se estableció tomando como base la masa molecular promedio (M_R 1867 g/mol) entre casuarictin (monómero), nobotanin B (dímero) y nobotanin E (trímero). Cada uno de estos elagitaninos libera dos unidades de ácido elágico con (M_R 322 g/mol). Con estos datos se calculó el factor gravimétrico según la siguiente ecuación (Isaza *et al.*, 2007):

$$\text{Factor Gravimétrico} = \frac{1867 \text{ g/mol}}{2 \times 322 \text{ g/mol}} = 2.9$$

2.4 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)

Se pesaron 0.125 g de la biomasa lavada de raíces, tallos u hojas de *Eichhornia crassipes*, y se colocaron en un tubo de polietileno de 50 mL con tapa roscada. Inmediatamente, se adicionaron 25 mL de agua deionizada y los tubos se agitaron en un baño ultrasónico (Branson® CPX3800H) por 15 minutos; 5 minutos después, se centrifugaron a 3000 rpm durante media hora. A continuación, se adicionaron 5 mL de solución buffer (pH 12, 10, 9, 7, 5 y 4) en cada uno de los tubos, y éstos se agitaron 15 minutos más en el baño ultrasónico, 5 minutos después, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 30 minutos. Finalmente, a cada muestra se le adicionaron 25 mL de solución metálica de AgNO₃ 0.003 M y se agitaron de nuevo en el baño ultrasónico por 15 minutos más; las muestras reposaron 5 minutos y se centrifugaron nuevamente 30 minutos a 3000 rpm. La biomasa fue separada del sobrenadante por filtración.

Para identificar la presencia de nanopartículas de plata en solución, cada muestra se midió en el Espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda comprendida de 200-800 nm. El blanco utilizado fue agua deionizada.

2.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

NANOPARTÍCULAS

2.5.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y espectrometría de dispersión de energía de rayos (EDS)

Se colocó una gota de la suspensión de nanopartículas de plata en una microrejilla de cobre recubierta con carbón tipo 30-A, y se secó bajo condiciones de alto vacío. Una vez preparada la rejilla, se colocó en un vial para ser analizada por TEM. Esta operación fue realizada para cada muestra analizada. Para el análisis por TEM y HRTEM, se utilizó el equipo JEOL JEM-2010F FasTem con una resolución de 2.3 Å, en el Instituto de Física de la UNAM. El equipo cuenta con un detector de rayos X acoplado, a través del cual, se realizó la espectroscopía de dispersión de energía (EDS) para evaluar la composición elemental de las muestras.

BIOMASA

2.5.2 Análisis Termogravimétrico

La termogravimetría de la biomasa seca de *Eichhornia crassipes*, se llevó a cabo utilizando un analizador térmico LINSEIS modelo STA PT1600 TG-DSC/DTA, con una rampa de calentamiento constante de 1°C/s. Para obtener el termograma se registró la pérdida de peso de la muestra en el intervalo de 17 a 1000°C.

2.7.3 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Se analizaron por espectrofotometría FT-IR cada una de las secciones de *Eichhornia crassipes* antes y después del proceso de biosíntesis de AgNP, en un equipo Varian 640 con ATR de diamante, generando los espectros en el intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} .

2.7.4 Área superficial

El área superficial y porosidad se determinaron en un equipo *BELSORP-max* analizando las isotermas de adsorción de N_2 mediante la ecuación BET (Brunauer-Emmett-Teller) usando el intervalo de linealidad dado por los valores de presión relativa (P/P_0) de 0.05 a 0.5. Las muestras se sometieron a un tratamiento previo de desgasificación en bajo vacío por 5 horas a 60°C.

2.7.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La biomasa de *Eichhornia crassipes* después del lavado con HCl, fue caracterizada por MEB utilizando un equipo JEOL 6610LV, para asegurar que no contenía metales pesados que pudieran influir durante el proceso de síntesis.

2.8 CUANTIFICACIÓN DE PLATA EN LAS SUSPENSIONES DE AgNP

Para determinar la influencia en la concentración total de plata que presentan las nanopartículas disueltas y los iones metálicos “libres” en las suspensiones de AgNP, se aplicó la metodología desarrollada por Galazzi *et al.* (2015), cuantificando la concentración de plata en las siguientes fracciones:

- a) plata en la suspensión de AgNP después de la síntesis (Ag-total).
- b) plata iónica obtenida del sobrenadante después de centrifugar la suspensión original (Ag-ion).

La metodología para separar las fases de Ag⁺ y Ag⁰ se describe a continuación:

Se colocaron 10 mL de cada suspensión obtenida con raíces, tallos y hojas de acuerdo a la sección 2.4, en tubos de teflón y se centrifugaron a 10000 rpm durante 40 minutos. El sobrenadante (Ag-ion), se retiró utilizando una micropipeta para evitar que las nanopartículas sedimentadas se re-suspendieran y las concentraciones de Ag-total y Ag-ion se analizaron por duplicado en absorción atómica utilizando un equipo Thermo Scientific ICE 3000 series a una longitud de onda de 328.1 nm. La concentración de plata en forma de nanopartículas (Ag-NP), se determinó restando las concentraciones obtenidas de Ag-total y Ag-ion

2.9 PRUEBAS DE ACTIVIDAD MICROBICIDA

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas con lirio acuático se evaluó utilizando *E. coli* ATCC 25992 (Bacteria Gram negativa) y *S. aureus* ATCC 6538 (Bacteria Gram positiva), las cuales han sido ampliamente utilizadas como modelo en experimentos bactericidas (Soo-Hwan *et al.*, 2011). Las etapas de la prueba se describen a continuación:

2.7.7 *Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas:* se utilizó el método de cuenta en placa, para determinar el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonias, UFC) disponibles por cada cepa. El experimento se realizó por triplicado de acuerdo a la siguiente metodología:

2.7.7.1 *Siembra de cepas de control:* por separado se sembró en TSA (Agar Soya triptecaseína) por estría una asada de cada microorganismo y las placas se incubaron 24 horas a 36 ± 1 °C. Posteriormente, se tomó una asada de las cepas y se colocó en caldo TSB estéril contenido en un tubo de ensaye, el cual nuevamente se incubó 24 horas a 36 ± 1 °C.

2.7.7.2 *Preparación del inóculo*: una vez contando con la suspensión bacteriana, se efectuaron diluciones de las cepas, tomando un mililitro de la suspensión incubada en TSB, el cual se transfirió a un tubo de ensaye con 9 mL de disolución amortiguadora de fosfato-cloruro de magnesio estéril hasta llegar a la dilución de 1×10^{-7} para *E. coli* y 1×10^{-3} para *S. aureus*. Entre cada dilución, las suspensiones fueron homogenizadas en un agitador de tubos vortex.

2.7.7.3 *Siembra del inóculo*: se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-2} a 10^{-7} (*E. coli*) y 10^{-1} a 10^{-3} (*S. aureus*) y se colocó en cajas petri estériles. Enseguida se adicionó el medio de cultivo (TSA) homogenizando perfectamente y una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron de 18-24 horas a 36 ± 1 °C. Al término de este periodo, se contó el número de colonias y se calculó la concentración de las suspensiones microbianas.

2.7.8 *Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable*. Para poder determinar la dilución bacteriana en que el efecto microbicida de las AgNP es detectable, las nanopartículas sedimentadas obtenidas en la sección 2.6, se secaron a 40°C durante 96 horas y con las AgNP en polvo, se prepararon soluciones con concentraciones en el rango de 2-100mg/L. Posteriormente, se preparó el inóculo de cada bacteria de acuerdo a la sección 2.7.1.2, y se sembró la batería completa de diluciones 1×10^{-1} - 1×10^{-7} para *E. coli* y 1×10^{-1} - 1×10^{-3} para *S. aureus* adicionando un mL de solución de AgNP probando diferentes concentraciones

2.7.9 *Mínima concentración bactericida (MIB)*: esta concentración se definió como la mínima cantidad de AgNP en mg/L requerida para inhibir el 100% de los microorganismos presentes en la cuenta inicial del inóculo y se utilizó el método de cuenta en placa. Se colocó 1 mL del inóculo determinado en 2.7.2 en cajas petri y se les adicionó 1 mL de las soluciones de AgNP preparadas en 2.7.3 probando concentraciones en el rango de 2 a 100 mg/L

dejando reposar 20 minutos antes de adicionar el medio de cultivo. Las placas se incubaron 24 horas a 36 ± 1 °C y se realizó la cuenta en placa.

2.7.10 *Comparación entre agentes antimicrobianos:* se evaluó la actividad microbicida de las nanopartículas de plata comparando su eficiencia contra tres sustancias a base de plata: a) solución comercial de plata ionizada, b) solución de AgNO₃ y c) la suspensión de AgNP obtenida por bio-reducción. Las concentraciones de prueba fueron determinadas de acuerdo a los resultados obtenidos en la sección 2.7.3.

2.7.11 *Crecimiento bacteriano en presencia de AgNP:* para examinar la velocidad de crecimiento bacteriano a través de diferentes concentraciones de AgNP, se colocaron 150 mL de caldo de TSB en botellas de vidrio y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, a cada botella se adicionó el inóculo bacteriano y las diferentes concentraciones de AgNP. Las botellas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ °C y cada hora, se extrajeron 10 mL de cada una para cuantificar la concentración bacteriana en el tiempo bajo la influencia de las AgNP midiendo su densidad óptica en espectrofotometría UV-Vis a 600 nm.

2.7.12 *Influencia del extracto de E. crassipes como agente microbicida:* Se replicó la metodología indicada en la sección 2.4 para la biosíntesis de AgNP, modificando la adición de AgNO₃ por agua. A continuación se cuantificó el contenido de fenoles totales en los extractos de acuerdo a la sección 2.3.2 y se colocó 1 mL de ésta solución con 1 mL de los inóculos de *E. coli* y *S. aureus*. Adicionalmente se sembraron dos placas sin la adición del extracto para comprar el número de colonias antes y después de la adición. Las cajas se incubaron de 18-24 horas a 36 ± 1 °C, y se contabilizó el número de colonias obtenidas.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

3.1.1 Identificación de polifenoles presentes en las secciones de *Eichhornia crassipes*

Las extracciones realizadas en las raíces, tallos y hojas del lirio después del lavado ácido, se analizaron utilizando espectroscopía UV-Vis y los resultados obtenidos se presentan a continuación en la Figura 3.1. Todas las muestras presentaron picos de absorción claramente definidos en el rango de 277-280 nm que son característicos entre moléculas que contienen polifenoles en su estructura (Rodríguez-León *et al.*, 2013). Los picos más definidos se presentaron en las hojas, indicando de forma preliminar que en esta sección existe un mayor contenido de polifenoles en comparación con los tallos y raíces.

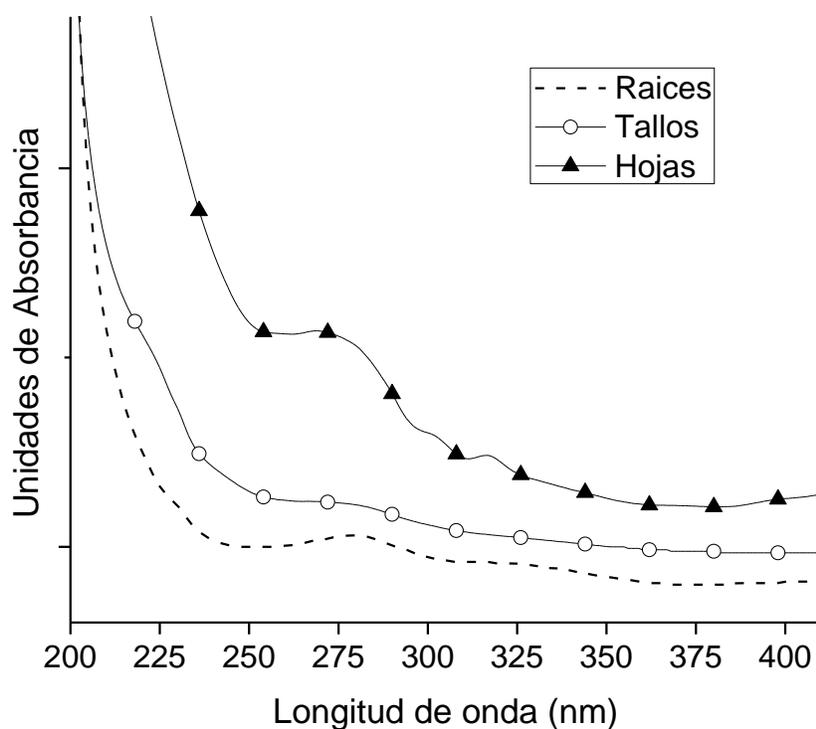


Figura 3.1 Espectro UV de polifenoles presentes en raíces, tallos y hojas de *Eichhornia crassipes*.

Los polifenoles identificados en todas las secciones del lirio acuático, son responsables de la actividad antioxidante que presenta la planta, por ello actúan como potenciales agentes reductores debido a los grupos OH que tiene su estructura (Medini *et al.*, 2014; Rodríguez-León *et al.*, 2013). Este comportamiento es similar al reportado para otras plantas verdes (Vilchis *et al.*, 2008; Yasin *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Latitha *et al.*, 2013).

En general, las plantas acumulan una mayor cantidad de polifenoles como una estrategia de defensa y adaptación debido al estrés al cual suelen estar expuestas (Borker *et al.*, 2013). El modo de vida acuático y los factores fisicoquímicos de los cuerpos de agua donde habita *Eichhornia crassipes*, pueden explicar la presencia de metabolitos secundarios en su estructura.

3.1.2 Cuantificación de fenoles totales en *Eichhornia crassipes*

Para la determinación de fenoles de acuerdo a la NMX-AA-050-SCFI-2001, se construyó una curva de calibración de 0 a 10 mg/L de fenol, en intervalos de 2 en 2 mg/L presentada en la Figura 3.2:

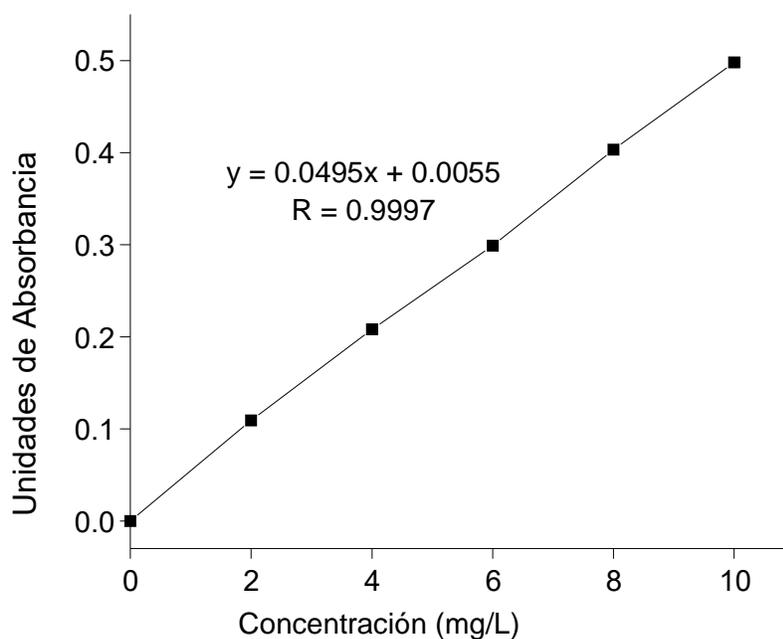


Figura 3.2 Curva de calibración fenoles totales.

A continuación, se analizaron los extractos de raíces (R), tallos (T) y hojas (H) antes y después del lavado con HCl para determinar si el contenido de fenoles totales entre secciones se ve influenciado por éste. Los valores se interpolaron en la curva de calibración y los resultados se presentan en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1 Concentración de fenol en mg/L para las secciones de *Eichhornia crassipes* antes y después del lavado con HCl.

Tratamiento	Sección	mg/L
SIN LAVADO ÁCIDO	R	7.4 ± 0.53
	T	5.6 ± 0.20
	H	8.2 ± 0.95
LAVADO ÁCIDO	R	3.9 ± 0.51
	T	4.2 ± 0.42
	H	6.6 ± 1.17

Después del lavado ácido, el extracto obtenido de las raíces, disminuyó su concentración de fenoles totales en un 47%, los tallos en 25% y las hojas en un 19%, condición que puede asociarse con la ubicación espacial de las secciones de la planta respecto al medio acuático. Las raíces que están en contacto directo con el agua, son la primer barrera para la captación y translocación de sustancias, por lo que incorporan una mayor cantidad de contaminantes del medio (Rosano-Ortega, 2009). De acuerdo al estudio realizado por González *et al.* (2007), la DBO₅ en la laguna Chignahuapan se encontró en el rango de 23-45 mg/L y de acuerdo a la interpretación que proporciona la subdirección general técnica de la CONAGUA (Comisión Nacional del Agua), el estado del agua puede clasificarse entre aceptable y contaminada, lo cual es consistente con las mayores concentraciones de fenoles en las raíces del lirio, por lo que el lavado ácido retira una mayor proporción en esta sección de la planta (Carrión *et al.*, 2012; Borker *et al.*, 2013).

Las hojas y tallos presentaron la mayor concentración de fenoles después del lavado ácido, lo cual puede atribuirse a que la presencia de clorofila en estas

secciones, favoreció la síntesis de metabolitos secundarios que no son retirados por la acción del HCl. Este fenómeno fue consistente con la detección de polifenoles en la Figura 3.1, donde los picos en 278 nm asociados a compuestos fenólicos, fueron más intensos en las secciones verdes del lirio.

La detección y cuantificación de fenoles totales, demuestra que el lirio contiene en su estructura compuestos fenólicos incluyendo fenoles simples, cumarinas, ligninas, lignanos, taninos condensados e hidrolizables, ácidos fenólicos y flavonoides (Khoddami *et al.*, 2013), asociados a la actividad antioxidante de la planta que funciona como un mecanismo natural de defensa.

3.1.3 Cuantificación Espectrofotométrica de Taninos Hidrolizables

El tratamiento aplicado con iPrOH/HCl en las muestras del lirio, generó la hidrólisis del nobotanino B, responsable de la formación del ácido elágico que conforma los taninos hidrolizables y se identifica en el espectrofotómetro UV-Vis a 368 nm (Isaza *et al.*, 2007). Los espectros obtenidos para todas las secciones del lirio (Figura 3.3), presentaron dos picos de absorbancia: el primero confirmando la presencia de ácido elágico a 368 nm y el segundo indicando la presencia de polifenoles en el hidrolizado en 280 nm.

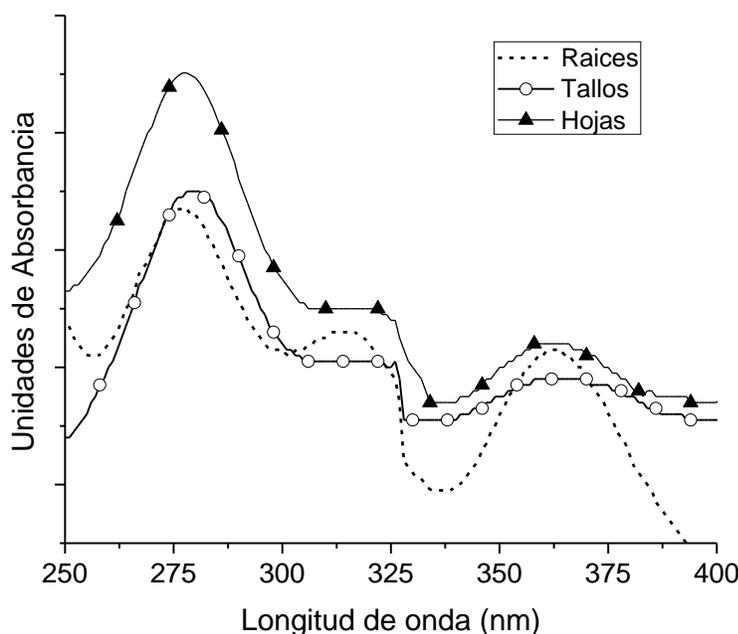


Figura 3.3 Espectro UV de la hidrólisis de taninos hidrolizables.

Para cuantificar el contenido de taninos hidrolizables en las secciones de *Eichhornia crassipes*, se construyó una curva de calibración con ácido elágico en el rango de 1 a 50 mg/L (Figura 3.4), y las lecturas registradas por cada sección se interpolaron en ésta para obtener las concentraciones promedio.

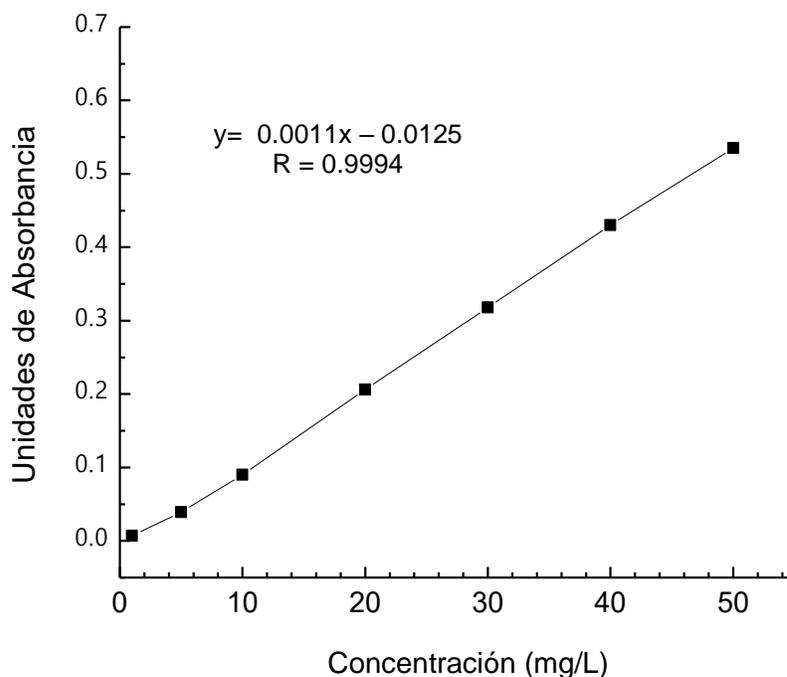


Figura 3.4 Curva de calibración para ácido elágico.

El contenido de taninos hidrolizables (TH) en las secciones estudiadas de *Eichhornia crassipes* se muestra en la Tabla 3.2. Se evidencia que la concentración disminuyó en el siguiente orden: hojas > tallos > raíces, de forma consistente con la determinación de fenoles totales en la sección 3.1.2.

Tabla 3.2 Porcentaje de taninos hidrolizables estimados como ácido elágico (AE) y taninos hidrolizables (TH).

Sección de <i>E. crassipes</i>	AE (mg/L)	% AE	% TH
Raíces	40.45 ± 5.6	8.1	23.5
Tallos	50.76 ± 10.1	10.2	29.4
Hojas	61.97 ± 10.1	12.4	35.9

La presencia de taninos hidrolizables en los tallos y raíces, fue 3% y 17% menor al contenido en las hojas. Cheng *et al.* (2010), reportó que en las hojas del lirio se encuentra el menor contenido de lignina en la planta, condición que favorece la separación de los subproductos durante la hidrólisis ácida produciendo una mayor cantidad de ácido elágico detectada en el espectrofotómetro UV-Vis, además, los compuestos fenólicos forman parte del mecanismo de defensa de la planta, y al ser las hojas la sección más apetecible por los herbívoros, la producción de taninos aumenta (Doll *et al.*, 2012).

3.2 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)

Al entrar en contacto la biomasa del lirio (con un previo ajuste del pH) con la solución de AgNO_3 , el color de las soluciones cambio de café amarillento a café oscuro por la formación de nanopartículas de plata (Devi y Joshi, 2015; Koberkandi *et al.*, 2012; Prusty y Parida, 2014). Sin embargo, este fenómeno fue confirmado utilizando espectroscopía UV-Vis para detectar el plasmón de superficie (SPR) característico. La Figura 3.5 muestra los resultados obtenidos durante la síntesis utilizando solución buffer pH 12.

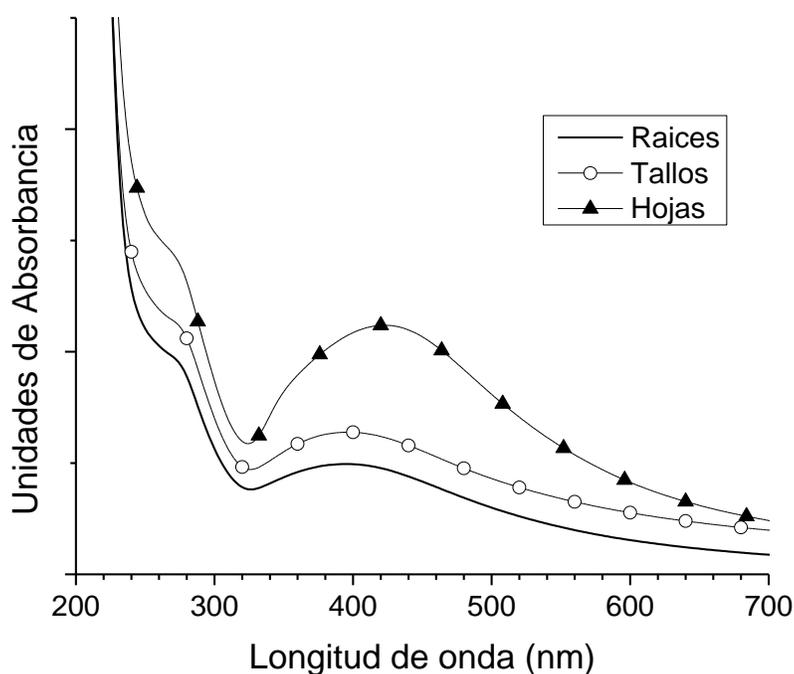


Figura 3.5 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 12.

Para todas las secciones del lirio, se presentaron los picos del SPR asociados a la presencia de AgNP; para las suspensiones de raíces y tallos se identificaron en 401 nm, mientras que en las hojas se presentó a los 420 nm. La diferencia en las longitudes de onda a la cual es detectado el SPR, se ha asociado con las características propias del material obtenido particularmente por la morfología y dispersión de tamaños de las nanopartículas, que se estudiará a continuación a través del TEM.

La Figura 3.6, muestra el espectro obtenido en las suspensiones de nanopartículas utilizando solución buffer pH 10. De forma consistente con el pH 12, en raíces y tallos el pico del SPR se presentó en la misma longitud de onda para ambas secciones esta vez en 432 nm. Para las hojas se presentó en 428 nm, además, se identificó que en las suspensiones con mayor contenido de TH se presentaron los picos de AgNP más definidos, comportamiento consistente con el intenso color café que presentaron las suspensiones al finalizar proceso de síntesis.

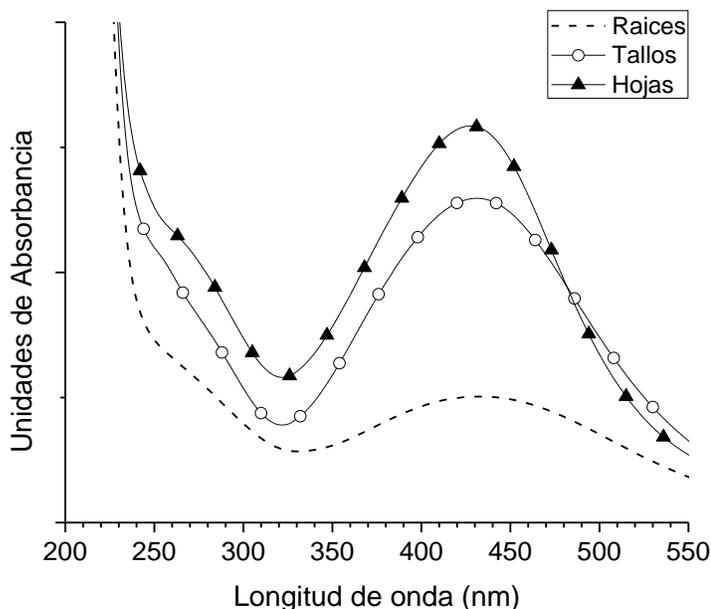


Figura 3.6 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 10

Al ajustar con pH 9 la preparación de las suspensiones, los picos de absorbancia se localizaron a 424 nm para raíces y tallos y en 436 nm utilizando las hojas (Figura 3.7). La presencia de protuberancias a 278 nm por la presencia de

compuestos fenólicos fue evidente para todas las suspensiones.

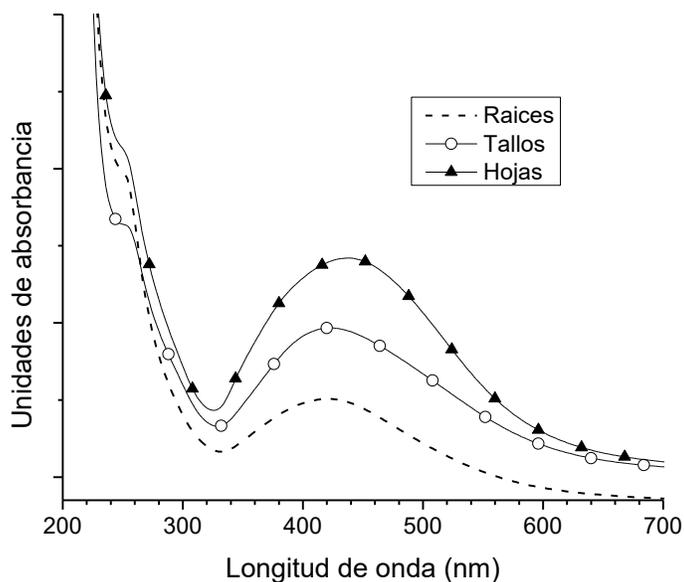


Figura 3.7 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 9.

La Figura 3.8, muestra el espectro obtenido al utilizar la solución buffer pH 7 durante la síntesis. Los picos del SPR se localizaron en 370 nm para todas las secciones del lirio, indicando la presencia de AgNP (Sadowski *et al.*, 2008; Harmami *et al.*, 2007), tentativamente por la similitud entre las características de las nanopartículas, además, se presentaron los picos asociados a los polifenoles claramente definidos en 278 nm.

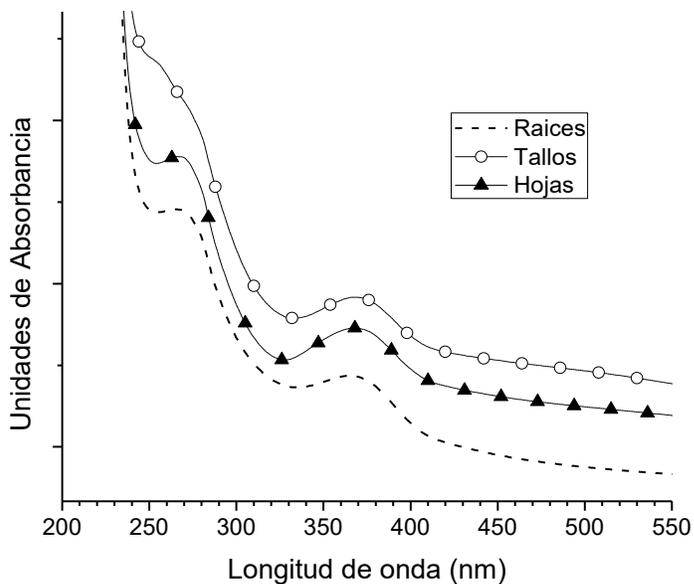


Figura 3.8 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 7.

Al analizar las suspensiones preparadas con el buffer pH 4, se produjo el espectro de la Figura 3.9. Con raíces y hojas no se evidenció ningún pico de absorción asociado a la formación de AgNP a pesar de que las soluciones mostraron una tonalidad café apenas perceptible y este mismo comportamiento se presentó durante la síntesis a pH 5. Por otra parte, las suspensiones con tallos si presentaron el pico del SPR en 430 nm y 432 nm ajustando a pH 5.

Para todas las secciones de la planta, al utilizar el pH 4 se formó con más intensidad el pico asociado a los compuestos fenólicos, probablemente por la disponibilidad de moléculas que no reaccionaron reflejado en la ausencia de los picos del SPR para hojas y raíces.

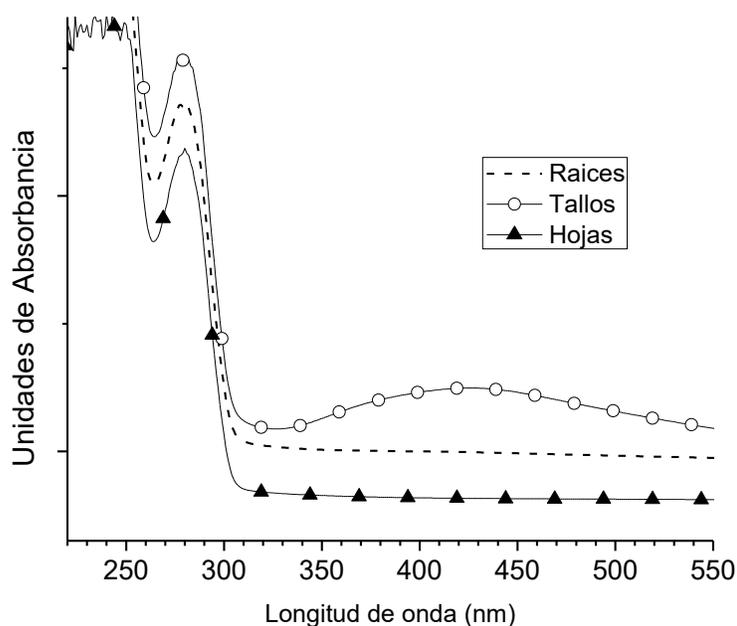


Figura 3.9 Espectro UV-Vis de AgNP producidas con solución buffer pH 4.

A continuación, en la Tabla 3.3, se muestra el resumen de los picos de absorción que presentaron las soluciones de AgNP a diferentes pH. Al utilizar los pH básicos, se identificó que con todas las secciones del lirio se formaron nanopartículas, sin embargo los picos del SPR se presentaron a la misma longitud de onda en cada pH para tallos y raíces, sugiriendo una similitud entre las nanopartículas obtenidas. Este comportamiento fue consistente al utilizar el pH

neutro, sin embargo ocurrió para todas las secciones del lirio en 370 nm. En los pH ácidos se observó que la sección utilizada durante la síntesis influyó en la formación de nanopartículas, ya que únicamente se detectó el SPR al utilizar los tallos, mientras que en las hojas y raíces este pico estuvo ausente y se evidenció claramente la presencia de los polifenoles que aparentemente quedaron sin reaccionar por completo para lograr la formación de AgNP.

Tabla 3.3 Picos de absorbancia de las muestras (nm).

	pH	RAÍCES pico (nm)	TALLOS pico (nm)	HOJAS pico (nm)
básico	12	401/ 278	401 / 278	420/ 278
	10	432 / 278	432 / 278	428 / 278
	9	424 /278	424 / 278	436 / 278
neutro	7	370 / 278	370 / 278	370 / 278
ácido	5	278	432 / 278	278
	4	278	430 / 278	278

Particularmente, al utilizar pH básicos se presentó una tendencia específica relacionada con la sección de la planta utilizada. En éstas suspensiones los picos de los plasmones fueron más intensos al utilizar las hojas, seguido de los tallos y finalmente las raíces, comportamiento que puede relacionarse directamente con el contenido de taninos hidrolizables entre las secciones del lirio (Tabla 3.2), indicando que entre mayor es la cantidad de TH mayor es la disponibilidad de biomoléculas para llevar a cabo la reducción de los iones Ag^+ y la producción de AgNP se incrementa reflejando una mayor absorbancia en espectroscopía UV-Vis.

Finalmente, en todas las suspensiones obtenidas independientemente del pH y la sección del lirio utilizada, se presentaron protuberancias características de las moléculas polifenólicas (incluyendo los TH) alrededor de 277-280 nm. Se ha reportado que la presencia de estos compuestos en las suspensiones de AgNP favorece el proceso de reducción y estabilización de las nanopartículas, ya que

como reductores logran la reducción de los iones de plata hacia Ag^0 , y como estabilizantes, logran la producción de moléculas orgánicas que son adsorbidas en la superficie de las nanopartículas, para evitar que éstas se aglomeren (Li *et al.*, 2015; Ahmad y Sharma, 2012; Rosano-Ortega, 2009).

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

3.3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y alta resolución (HRTEM)

El análisis por HRTEM, permitió identificar la morfología y obtener las distancias interplanares para conocer la estructura y composición de las partículas. El análisis, se muestra a continuación:

a) pH 12

Hojas

En las nanopartículas se identificaron partículas con forma icosaédrica y octaédrica (Figura 3.10 a y b). Algunas de las nanopartículas tuvieron la presencia de maclas (Figura 3.10 c) que aparecen por la influencia del contenido porcentual de átomos metálicos en las superficies, que a su vez impactan en las propiedades electromagnéticas de las partículas (Hernando-Granade, 2007).

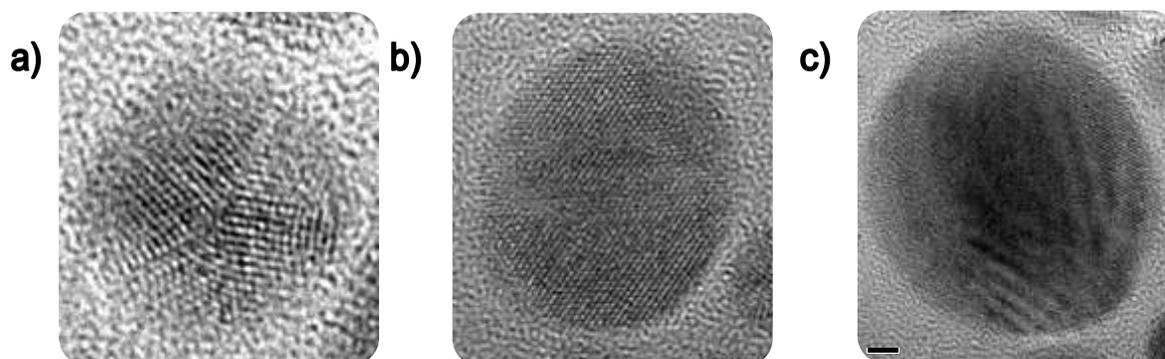


Figura 3.10. HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 12: a) partícula icosaédrica, b) romboédrica y c) AgNP con presencia de maclas.

La distribución de tamaños observada con TEM se presenta en la Figura 3.11 con una gran producción de partículas claramente definidas. A pesar de que algunas formaron agregados de hasta 25 nm, el 92% de las partículas se encontró en la escala de puntos cuánticos y el diámetro promedio del conjunto de partículas fue de 4.18 ± 3.9 nm.

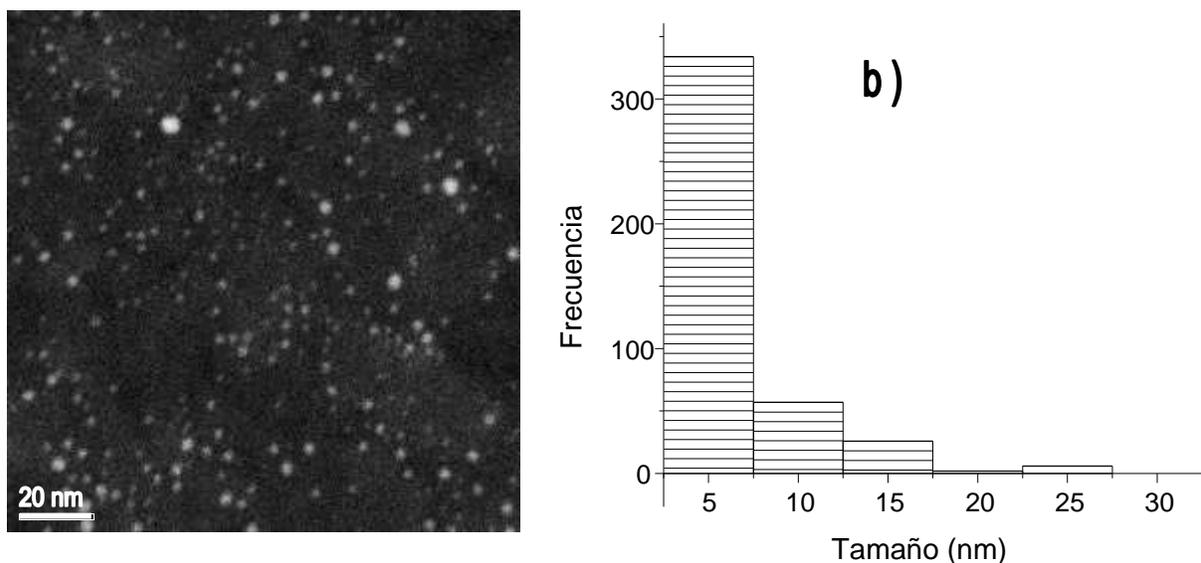


Figura 3.11 AgNP a pH 12 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

Con las distancias interplanares obtenidas de las transformadas de Fourier con HRTEM, se confirmó la presencia de partículas en fase Ag y AgO con estructuras cúbicas, trigonal y hexagonal respectivamente representadas en la Figura 3.12

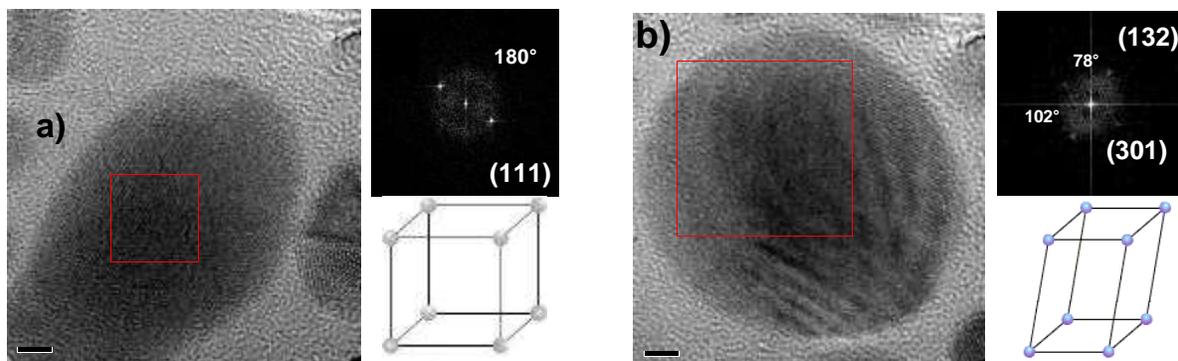


Figura 3.12 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 12 con su respectivo patrón de FFT a) nanopartícula de Ag con estructura cúbica y b) nanopartícula de AgO con estructura trigonal.

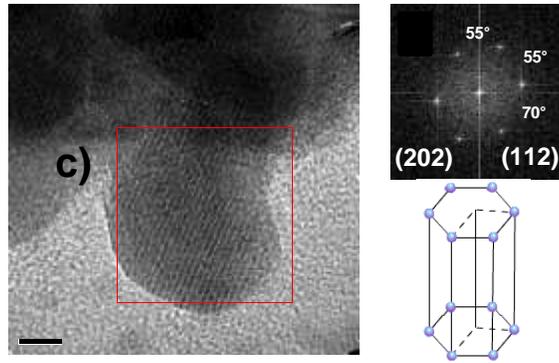


Figura 3.12 cont, Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 12 con su respectivo patrón de FFT c) nanopartícula de AgO y estructura hexagonal.

En el análisis EDS que se presenta en la Figura 3.13, confirmó que las partículas observadas están compuestas fundamentalmente por plata, además, se identificaron componentes de la biomasa tales como carbono, oxígeno y fósforo. La presencia de Cu en el análisis reflejó el material de la rejilla utilizada para el análisis en TEM.

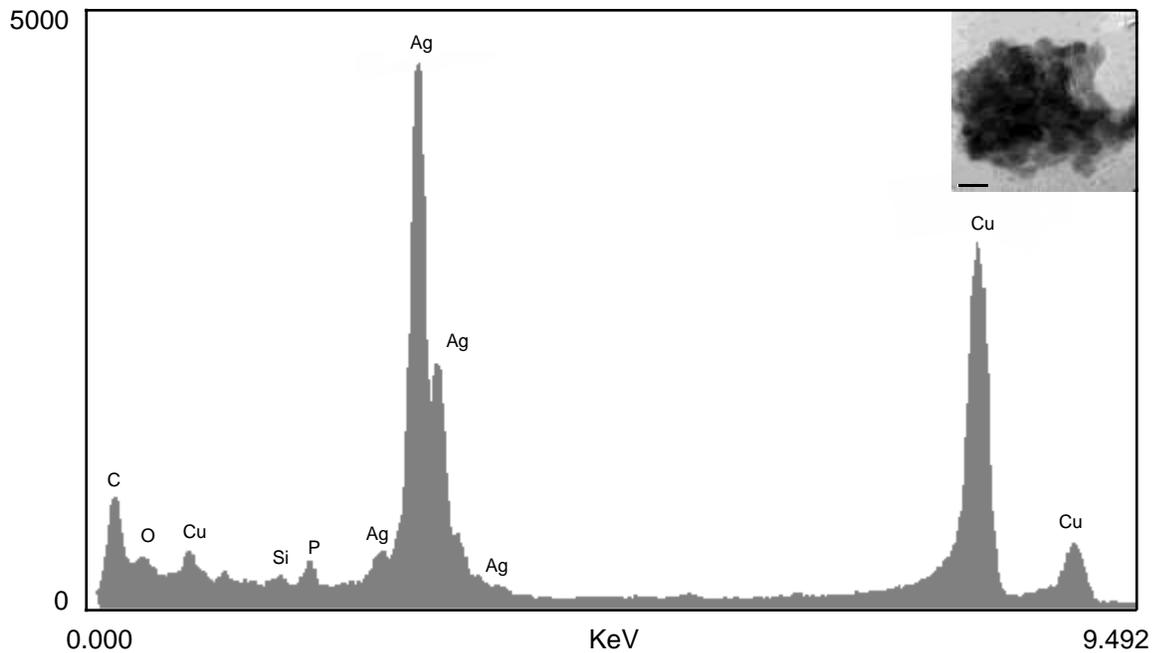


Figura 3.13 Análisis EDS de AgNP sintetizadas con hojas y pH 12.

Tallos

En las nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 12, se identificaron partículas esféricas (con presencia de maclas) y cúbicas (Figura 3.14).

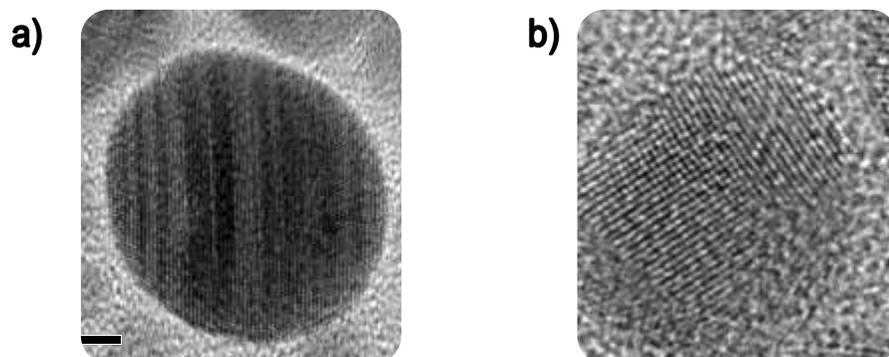


Figura 3.14 HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 12: partícula a) esférica y b) cúbica.

La distribución de tamaños de las nanopartículas obtenidas se presenta en la Figura 3.15. De manera general, se observa la formación de partículas menores a 10 nm (88 % del total), sin embargo la presencia de agregados mayores a 15 nm se hizo evidente en el histograma. Su tamaño promedio en conjunto fue de 5.41 ± 4.4 nm.

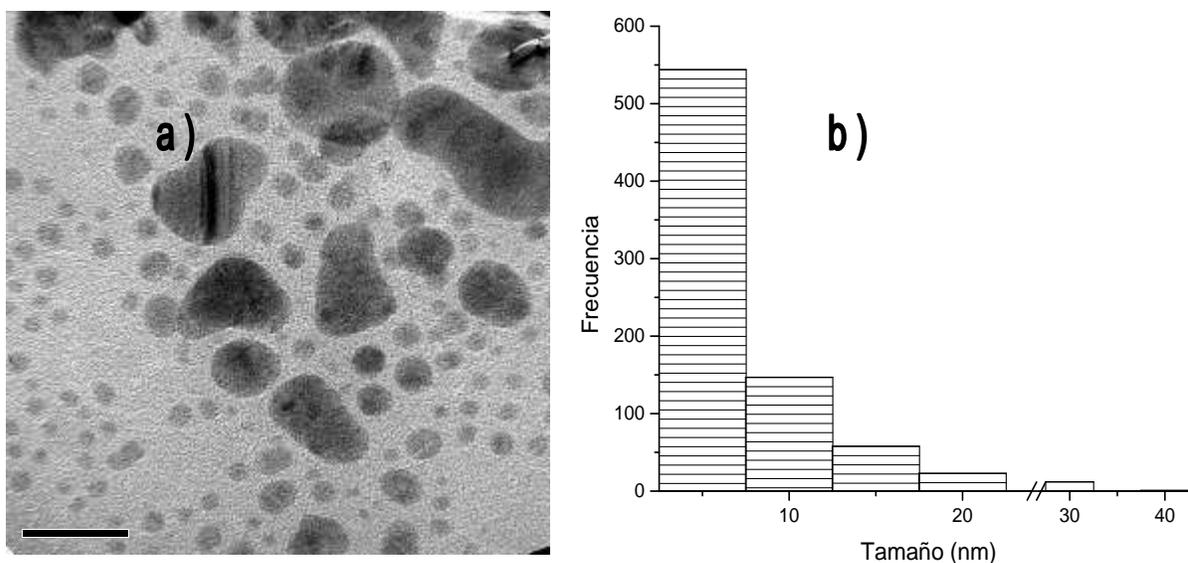


Figura 3.15 AgNP a pH 12 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

De acuerdo a las tablas cristalográficas *Solid State Chem*, 65, 225 (1986), las nanopartículas se encontraron en forma de AgO con dos diferentes estructuras: triclinica y cúbica (Figura 3.16):

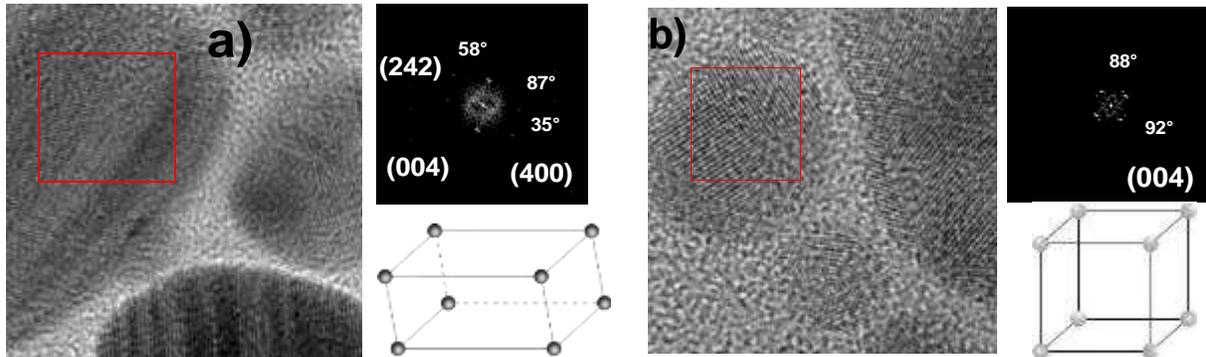


Figura 3.16 Imagen HRTEM de nanopartículas de AgO sintetizadas con tallos y pH 12: a) estructura triclinica y b) cúbica.

b) pH 10

Hojas

Las AgNP sintetizadas con hojas ajustando a pH 10 mostraron morfología del tipo dodecaedro-rómbica e icosaedro. Las partículas presentaron múltiples gemelamientos (MTP) y una compleja configuración con regiones de contrastes diferentes como se muestra en la Figura 3.17.

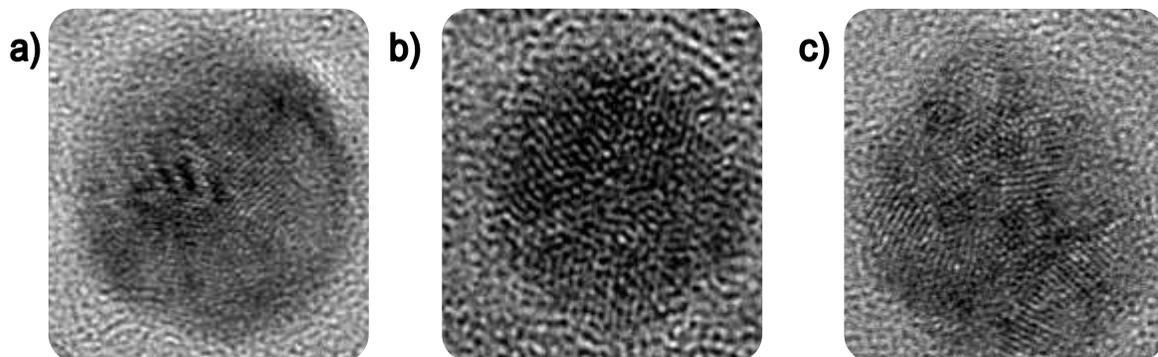


Figura 3.17 HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 10: a) Forma dodecaedro-rómbica truncada, b) dodecaedro-rómbica, c) icosaedro.

Las nanopartículas presentaron diámetros homogéneos y sin agregación entre partículas. De las 165 nanopartículas analizadas, el 93% presentó un diámetro menor o igual a 10 nm con un promedio de 5.7 ± 2.6 nm (Figura 3.18).

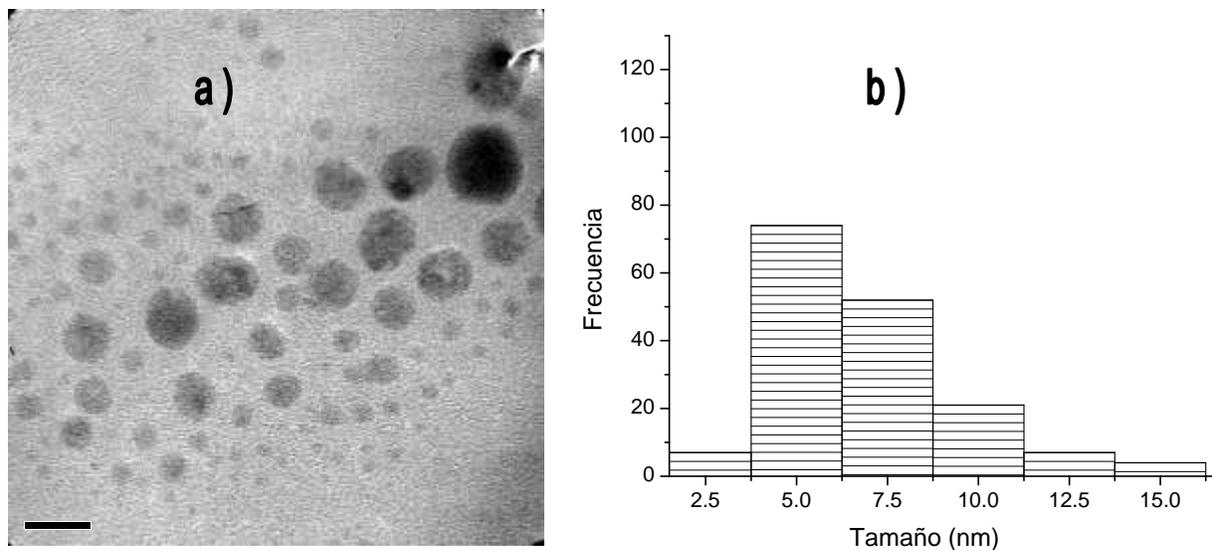


Figura 3.18 AgNP a pH 10 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

De acuerdo a sus planos cristalinos, las nanopartículas se presentaron en fase AgO con arreglo cúbico y trigonal (Figura 3.19).

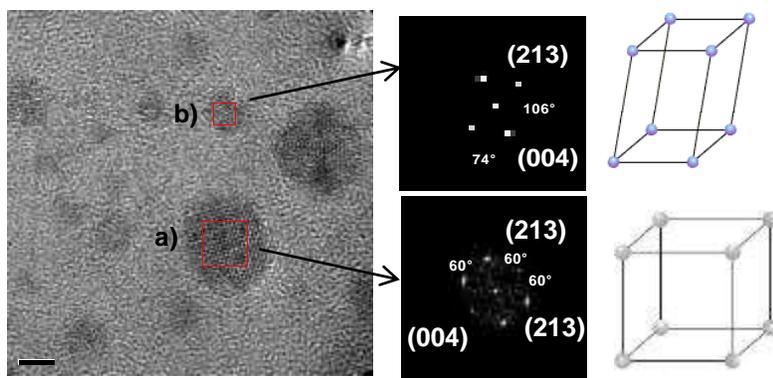


Figura 3.19 Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas a pH 10 a una orientación $[4, -8, 0]$ con arreglo a) cúbico y b) trigonal.

La composición elemental de las AgNP evaluada con EDS (Figura 3.20), permitió confirmar la presencia de plata en las nanopartículas analizadas, además de los elementos propios de la biomasa de la planta.

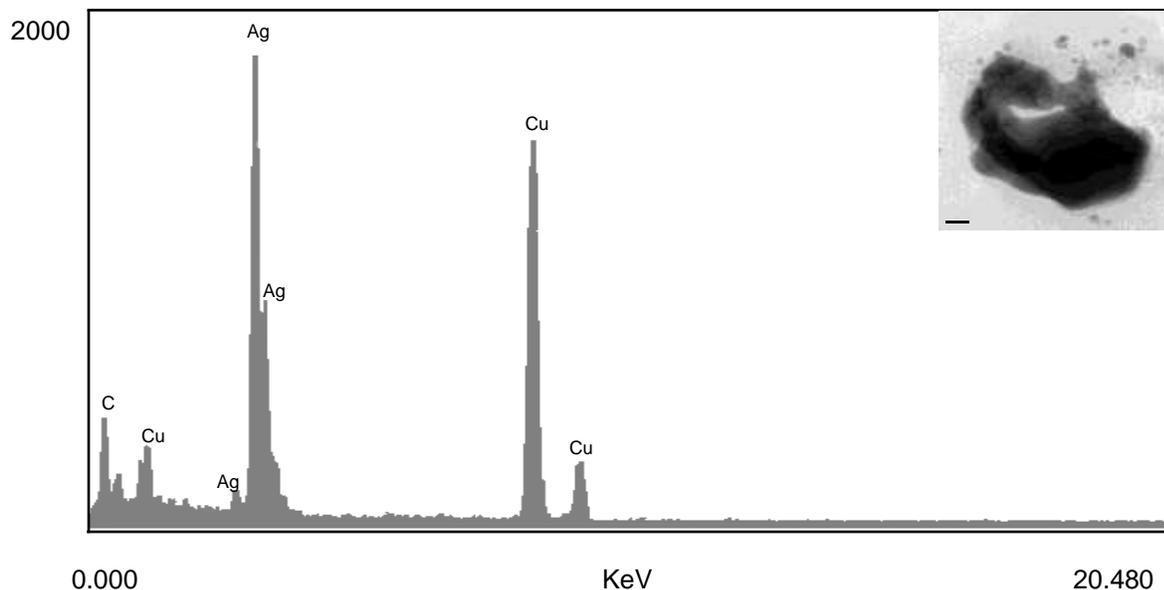


Figura 3.20 Análisis EDS de AgNP sintetizadas con hojas y pH 10.

Tallos

El análisis por HRTEM de las nanopartículas sintetizadas con la biomasa de tallos (Figura 3.21), permitió identificar partículas con forma cúbica truncada en las esquinas y dodecaédrica.

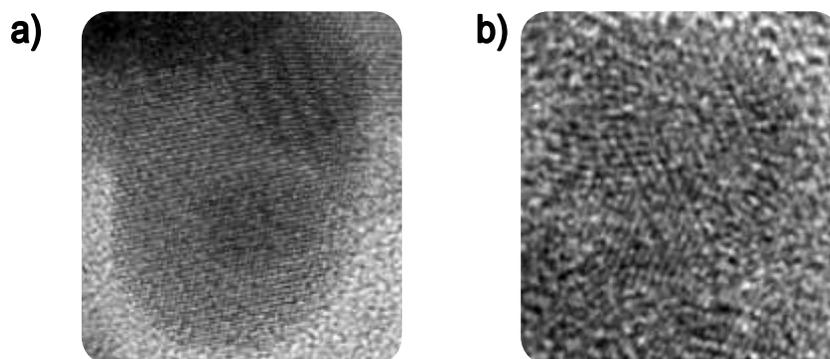


Figura 3.21 HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 10:
a) Forma cubica truncada en las esquinas y b) dodecaédrica.

De las 269 nanopartículas analizadas, el 81% contó con un diámetro menor o igual a 10 nm que en conjunto fue 7.2 ± 5.3 nm, sin embargo se evidenció la fusión de pequeñas partículas formando agregados de hasta 30 nm (Figura 3.22).

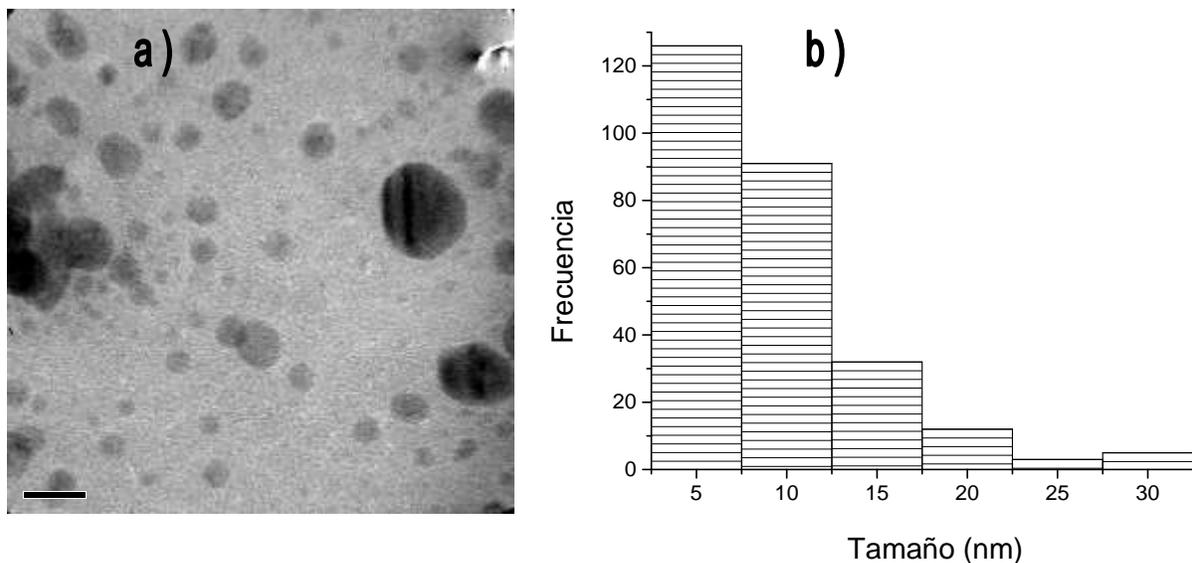


Figura 3.22 AgNP a pH 10 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

En la Figura 3.23, se muestran las micrografías de AgNP obtenidas con tallos. Se identificaron dos fases de plata: AgO con estructura cúbica y Ag con estructura hexagonal.

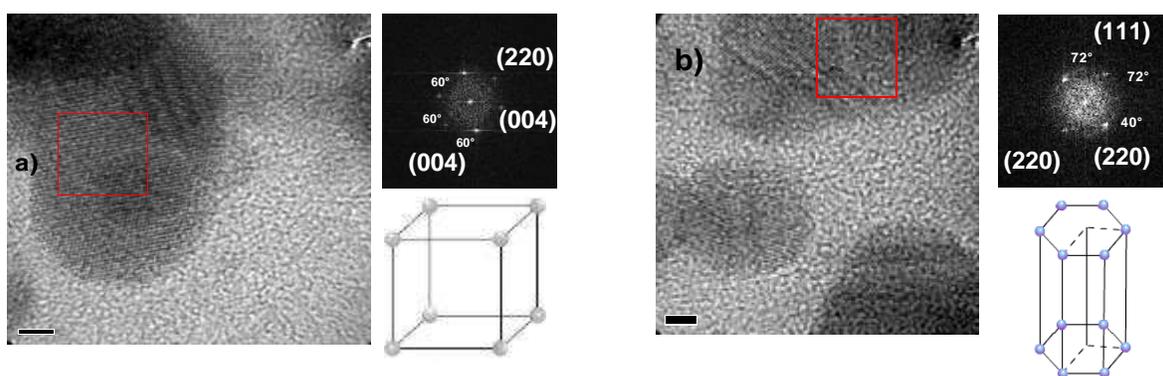


Figura 3.23 Imagen HRTEM de partículas producidas con tallos a pH 10 a) AgO con arreglo cúbico eje de zona $[8, -8, 0]$ y b) Ag con arreglo hexagonal y eje de zona $[2, -2, 0]$.

Raíces

En la Figura 3.24, se observa la imagen obtenida por HRTEM de las AgNP obtenidas de las raíces de *Eichhornia crassipes*. Las partículas presentaron morfología cúbica.

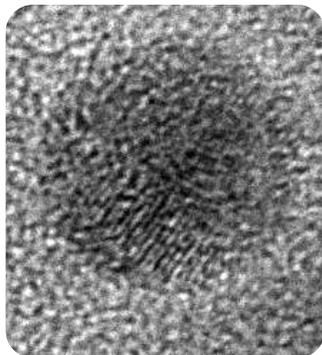


Figura 3.24 Imagen HRTEM de nanopartícula sintetizada con raíz y pH 10: forma cúbica.

En las micrografías obtenidas por TEM, se observaron partículas sin homogeneidad de tamaño debido a la agregación entre algunas de ellas, lo cual generó que de las 141 nanopartículas analizadas, únicamente el 74% tuviera tamaños menores a 10 nm (Figura 3.25). En esta suspensión se presentó el mayor diámetro promedio de las partículas (9.1 ± 9.8 nm) en comparación con lo obtenido en las distribuciones de partícula de hojas y tallos, que tuvieron 5.7 ± 2.6 nm y 7.2 ± 5.3 nm respectivamente.

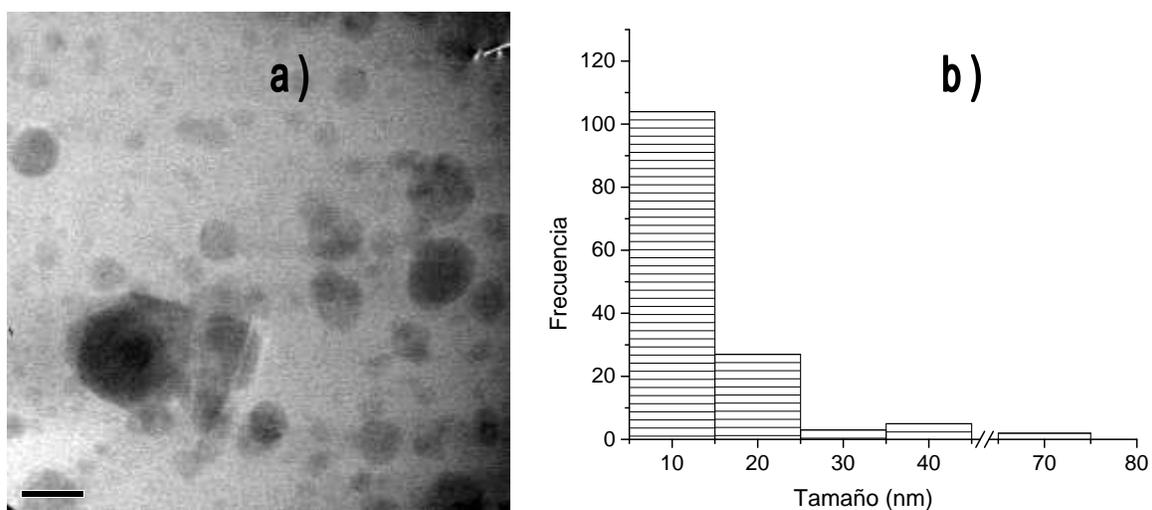


Figura 3.25 AgNP a pH 10 y raíces: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

En las AgNP analizadas por HRTEM, se identificó un perfil cúbico simple (Figura 3.26). La plata se encontró contenida en las nanopartículas en forma de AgO.

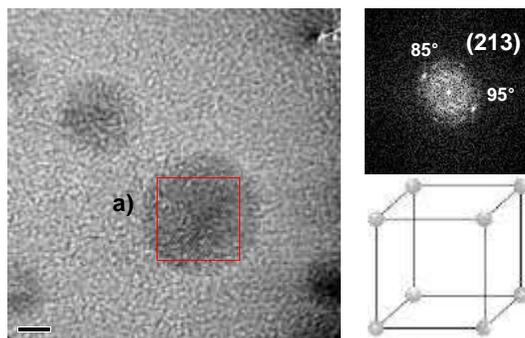


Figura 3.26 a) Imagen HRTEM de partícula de AgO con arreglo cúbico producida a pH 10.

A continuación, en la Tabla 3.4, se muestra el resumen de los parámetros obtenidos de las micrografías de AgNP sintetizadas en pH básico (10 y 12).

Tabla 3.4 Parámetros obtenidos en la síntesis de AgNP en pH básico para: hojas (H), tallos (T) y raíces (R).

	Sección biomasa	Promedio (nm)	% < a 10 nm	Morfología	Fase	Estructura
pH 12	H	4.18 ± 3.9	92%	Icosaedral, romboédrica	Ag AgO	cúbica trigonal hexagonal
	T	5.41 ± 4.4	88%	Esférica, cúbica	AgO	triclínica cúbica
pH 10	H	5.7 ± 2.6	93 %	Dodecaedral, icosaedral	AgO	cúbica trigonal
	T	7.2 ± 5.3	81 %	Dodecaedral, cúbica truncada en las esquinas	AgO Ag	cúbica hexagonal
	R	9.1 ± 9.8	74 %	cúbica	AgO	cúbica

Las micrografías para las AgNP obtenidas con TEM para hojas, tallos y raíces de lirio mostraron que la morfología entre las partículas obtenidas con las diferentes

secciones del lirio no es homogénea. Las hojas y tallos presentaron formas con un mayor número de caras en comparación con las raíces, lo cual es determinante en el área superficial disponible, condición que puede estar influenciada por la mayor disponibilidad de TH durante el proceso de bio-reducción. En su mayoría, las partículas se encontraron como AgO, lo cual fue consistente con lo reportado por Sifontes *et al.* (2010) quien indicó que al tener pH básico durante la síntesis predomina la producción de AgO. Además en las diferentes AgNP no se observó la formación de una capa superficial que cubra las partículas como lo refiere Devi y Joshi (2015).

En cuanto a los diámetros obtenidos, el análisis de las micrografías evidenció la influencia del pH durante la síntesis, ya que para todas las secciones del lirio los diámetros más pequeños se obtuvieron al utilizar el pH 12. La distribución de tamaños de partícula entre las secciones del lirio fue similar entre ambos pH, encontrando que los diámetros más pequeños se obtienen al utilizar las hojas, seguido de tallos y raíces. Esta condición se reflejó en los espectros UV-Vis de las Figuras 3.5 y 3.6, que para esta sección del lirio fue más intenso debido a que el camino óptico de la luz no es desviado por el tamaño de las nanopartículas, mientras que con raíces se forman las AgNP más grandes y el camino óptico de la luz es dispersado por las nanopartículas de tamaños mayores, disminuyendo la intensidad de la señal.

c) pH 7

Hojas

En las micrografías obtenidas por HRTEM mostradas en la Figura 3.27, se identificaron partículas con morfología icosaédrica, esférica con presencia de maclas (defectos) y octaédrica.

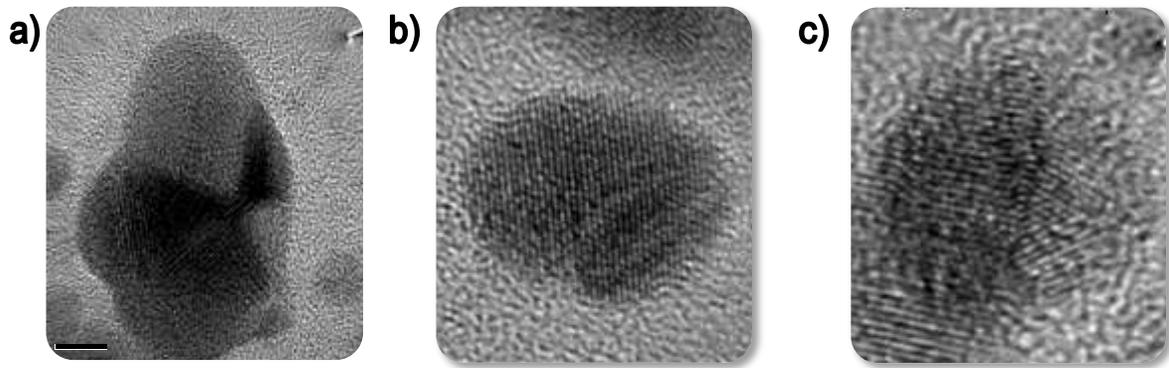


Figura 3.27 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 7 a) Forma icosaédrica, b) esférica y c) octaédrica.

Las nanopartículas en suspensión sintetizadas con las hojas de *Eichhornia crassipes* y analizadas en TEM, se presentan en la Figura 3.28. Se observa una gran producción de pequeñas partículas y minoritariamente se detectan agregados con diámetros mayores a 20 nm que presentaron maclas. En conjunto las partículas tuvieron un diámetro promedio de 6.9 ± 7.7 nm y el 82% de las 135 analizadas tuvieron un diámetro menor a 10 nm.

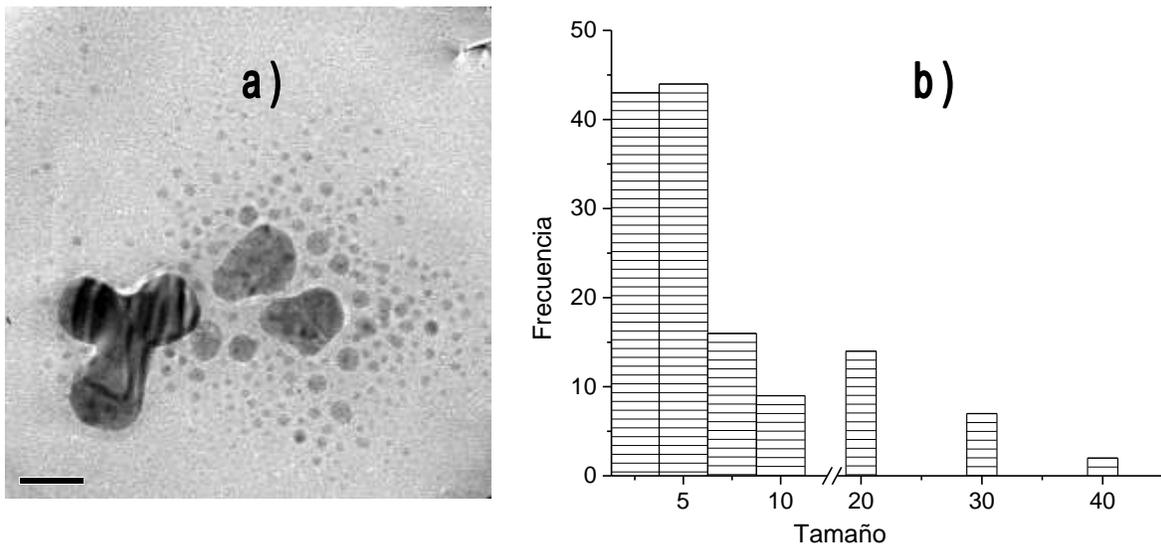


Figura 3.28 AgNP a pH 7 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

En la Figura 3.29 se muestran las imágenes con sus correspondientes transformadas de Fourier, que permitió identificar tres diferentes fases de plata en las nanopartículas obtenidas: a) Ag con estructura cúbica, b) Ag_2O_3 con estructura cúbica y AgO con arreglo hexagonal.

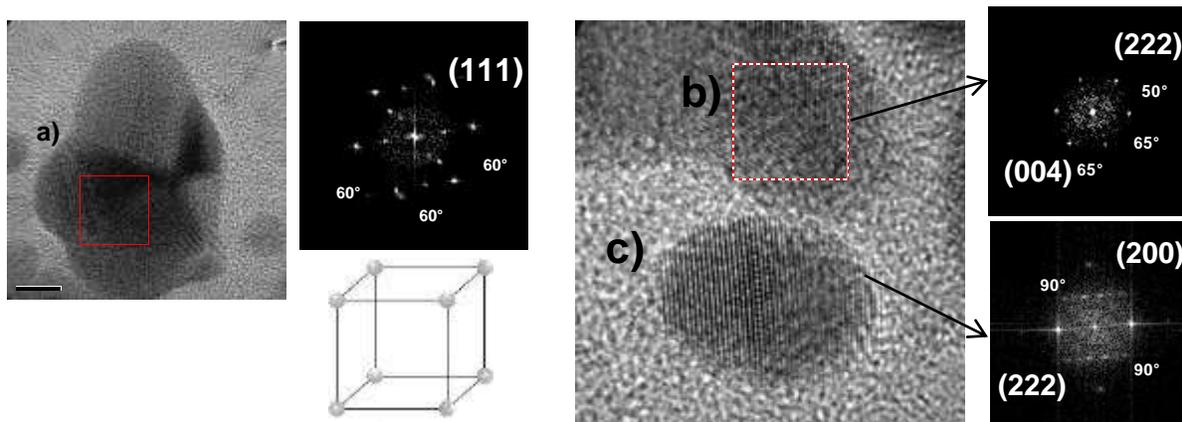


Figura 3.29 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 7 con su respectivo patrón de FFT a) nanopartícula de Ag, b) nanopartícula en fase Ag_2O_3 y c) nanopartícula de AgO.

Tallos

Se identificaron partículas aisladas con morfología cuboctaédrica, además, se evidencia la presencia de algunos nanocristales localizados en la superficie de las AgNP (Figura 3.30).

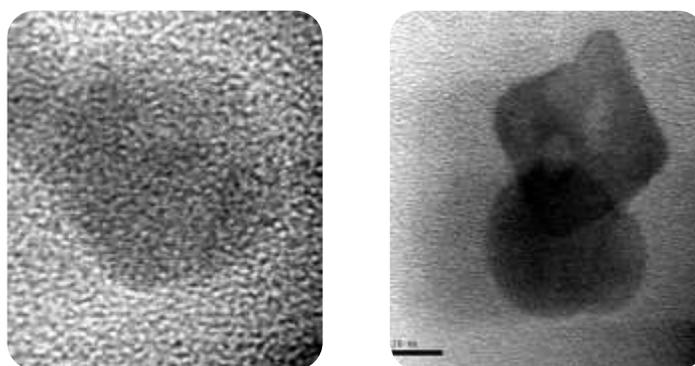


Figura 3.30 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 7 a) morfología cuboctaédrica, b) nanocristal superpuesto a AgNP.

Las AgNP formadas al utilizar tallos tuvieron una elevada dispersión de tamaños como se presenta en la Figura 3.31, donde únicamente el 38.8% de las nanopartículas tuvieron un diámetro menor a 10 nm. Por la presencia de partículas que alcanzaron hasta 70 nm, en conjunto las AgNP sintetizadas tuvieron un diámetro promedio de 15.3 ± 12.4 nm.

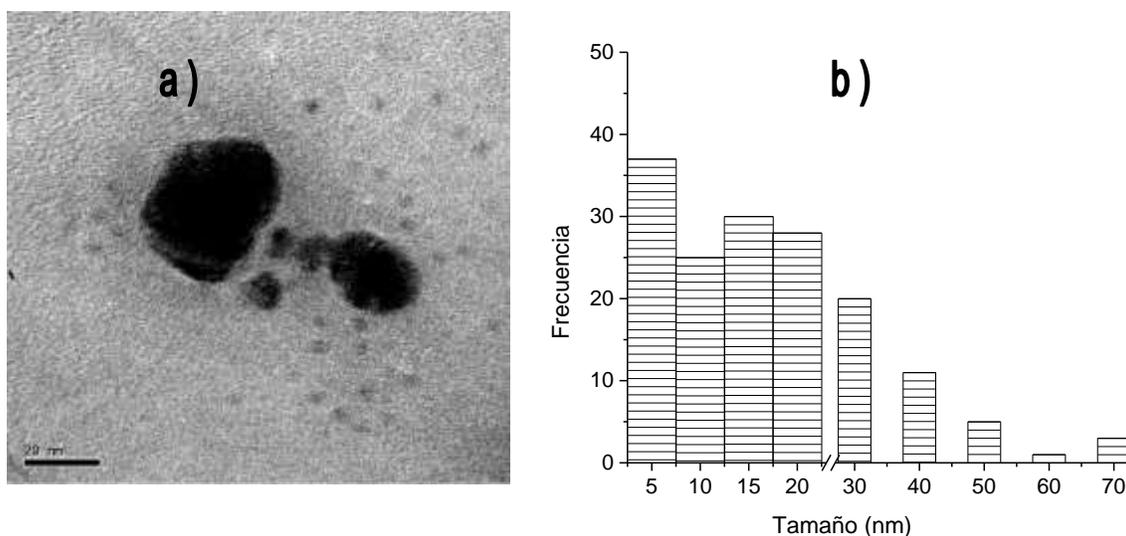


Figura 3.31 AgNP a pH 7 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

A partir de las transformadas de Fourier obtenidas de las micrografías de HRTEM, se identificaron dos fases y estructuras distintas: a) AgO con estructura cúbica y orientación (111), b) Ag₂O₃ con estructura hexagonal (Figura 3.32).

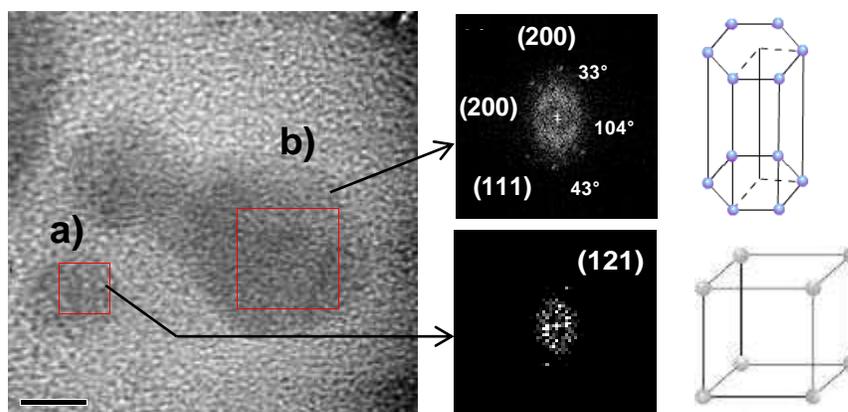


Figura 3.32 Imagen HRTEM y FFT de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 7

a) nanopartícula de AgO y estructura cúbica y b) nanopartícula de Ag₂O₃ y estructura hexagonal.

Raíces

En las micrografías obtenidas por HRTEM para las muestras de raíces (Figura 3.33), se observó la presencia de partículas superpuestas en su mayoría. Se detectaron partículas con morfología octaédrica y cuboctaédrica.

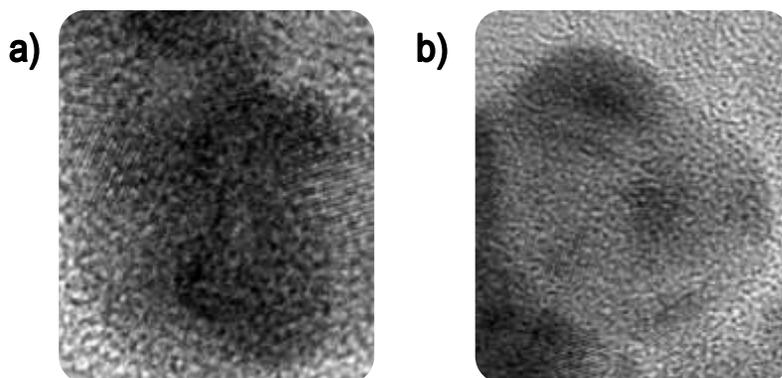


Figura 3.33 Imágenes HRTEM que muestran la morfología de nanopartículas sintetizadas con raíces y pH 7 a) morfología octaédrica b) cuboctaédrica.

Las nanopartículas producidas con raíces a comparación de las obtenidas con hojas y tallos a pH 7, fueron alargadas con un alto grado de agregación entre partículas inestables como se observa en la Figura 3.34. El diámetro promedio de éstas nanopartículas fue de 11 ± 9.9 nm. Las micrografías muestran la fusión de pequeñas partículas que formaron nanopartículas con diámetros entre 30 y 50 nm.

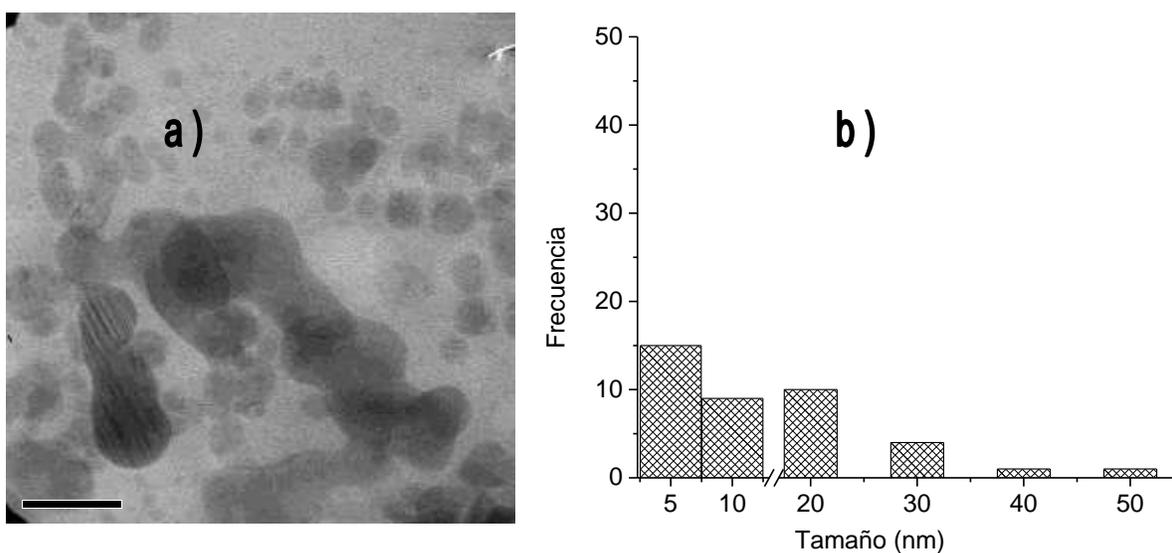


Figura 3.34 AgNP a pH 7 y raíces: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

Con las distancias interplanares obtenidas de la Figura 3.35, se identificó la presencia de plata en las nanopartículas en fase AgO y Ag₂O₃ con estructuras hexagonal, triclínica y cúbica.

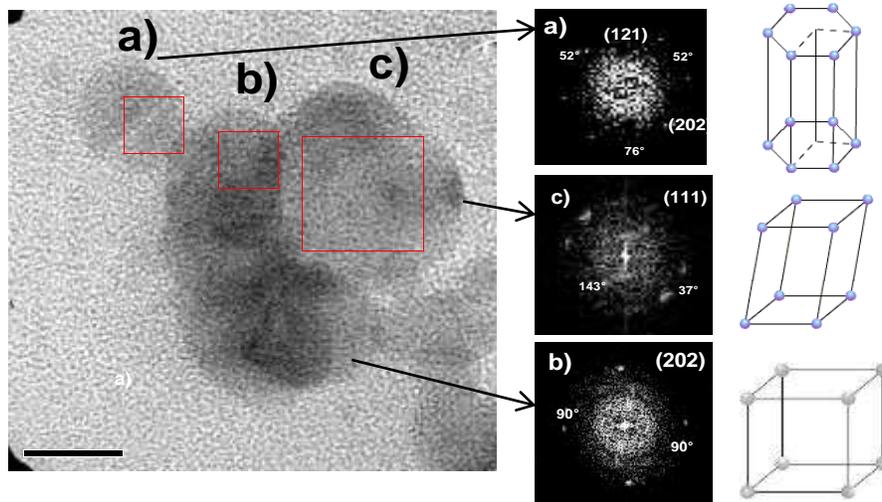


Figura 3.35 Imagen HRTEM y FFT de nanopartículas sintetizadas con raíces y pH 7 nanopartículas de AgO y a) estructura hexagonal, b) estructura cúbica y c) nanopartícula de Ag₂O₃ y estructura trigonal.

A través del resultado del espectro EDS en la Figura 3.36, se verificó la composición de plata en las partículas obtenidas que fue consistente con la analizada en las Figuras 3.13 y 3.20.

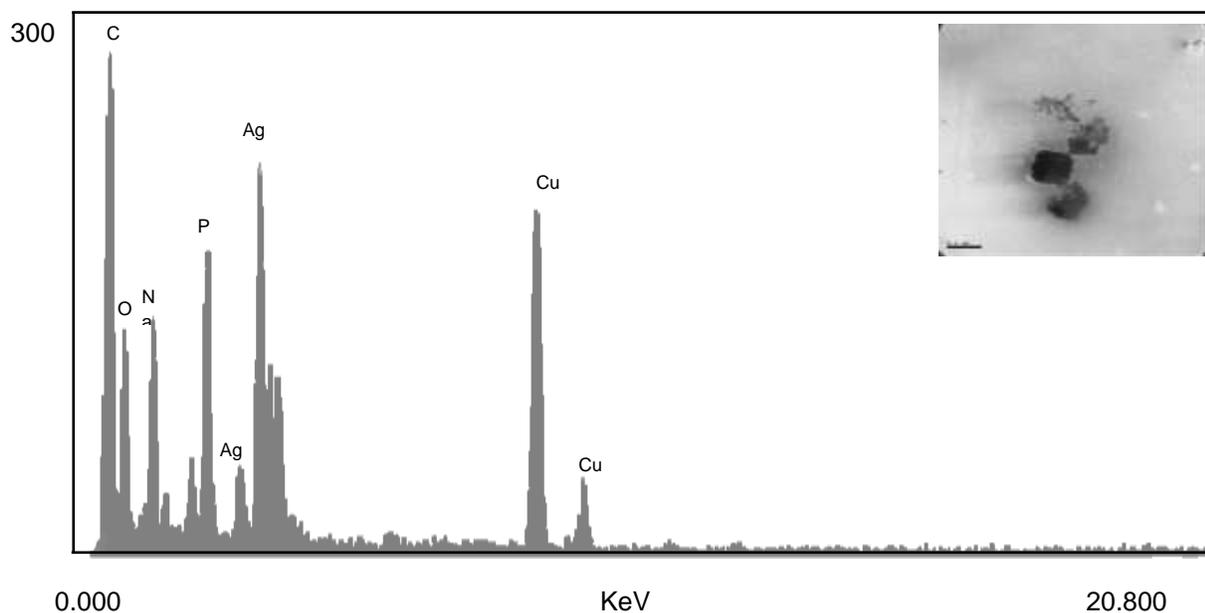


Figura 3.36 Análisis EDS de AgNP sintetizadas con raíces y pH 7.

Los datos obtenidos de las micrografías de AgNP ajustadas a pH 7 utilizando hojas, tallos y raíces, se resumen en la Tabla 3.5:

Tabla 3.5 Parámetros obtenidos en la síntesis de AgNP a pH 7 para hojas (H), tallos (T) y raíces (R).

	Sección	Promedio (nm)	% < a 10 nm	Morfología	Fase	Estructura
pH 7	H	6.9 ± 7.7	82%	icosaedrica/ esférica/ octaedrica	Ag AgO Ag ₂ O ₃	cúbica cúbica hexagonal
	T	15.3 ± 12.4	39%	cuboctaedrica/ nanocristales	AgO Ag ₂ O ₃	cúbica hexagonal
	R	11 ± 9.9	60%	octaédrica/ cuboctaedrica	AgO Ag ₂ O ₃	hexagonal/ cúbica

La distribución de tamaños y formación de AgNP no fue homogénea entre las secciones del lirio y este comportamiento nuevamente fue influenciado por la presencia de TH. Al utilizar las raíces con menor cantidad de taninos (Figura 3.34), se observa que existe una mayor agregación entre partículas de diámetros que van de 5 y hasta 50 nm, sin embargo, en la suspensión donde se utilizaron los tallos, las AgNP producidas tuvieron el mayor diámetro promedio por la presencia de nanocristales mayores a 30 nm que se formaron por la interacción de las sales de sodio que integran la solución buffer pH 7 y que son detectadas en el EDS de las suspensiones (Figura 3.36). Al utilizar las hojas con mayor contenido de TH, las AgNP producidas tuvieron el menor diámetro en la síntesis y mostraron el pico de absorción de AgNP más intenso en comparación con tallos y raíces, que tuvieron menor absorción detectada en UV-Vis. An *et al.* (2008), asoció que el pico de absorción disminuye conforme incrementa el tamaño de las nanopartículas producidas lo cual fue consistente con los resultados obtenidos durante esta síntesis.

Las AgNP obtenidas con las diferentes secciones de la planta tuvieron en común las fases de plata AgO y Ag₂O₃ con estructuras cúbicas y hexagonales sin embargo, al utilizar las hojas también se identificaron nanopartículas de Ag,

evidenciando la influencia asociada a la sección del lirio utilizada en el proceso de síntesis

d) pH 4

Hojas

Las AgNP sintetizadas ajustando con disolución pH 4, tuvieron múltiples gemelamientos presentando morfología cuboctaédrica e icosaedrales como se observa en la Figura 3.37, además se observaron efectos de Moiré, los cuales ocurren por la coexistencia de dos sistemas cristalinos sobrepuestos produciendo franjas oscuras y claras.

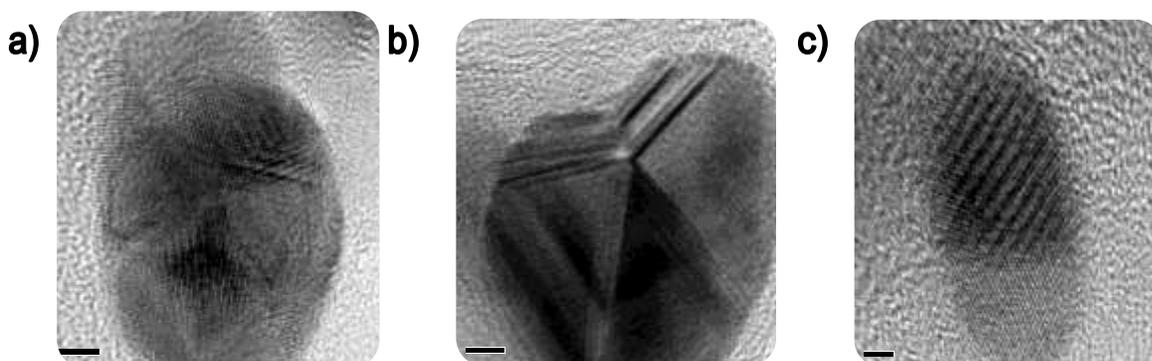


Figura 3.37 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con hojas y pH 4 a) morfología cuboctaédrica, b) icosaédrica, c) partícula esférica con efecto moiré.

La distribución de tamaños para las AgNP sintetizadas se muestra a continuación en la Figura 3.38. Se observa la formación de una gran cantidad de nanopartículas con diámetros inferiores a 10 nm las cuales representaron el 88.9% del total, las cuales coexistieron con agregados de hasta 60 nm, condición por la cual el diámetro medio de las partículas fue de 7.8 ± 9.6 nm.

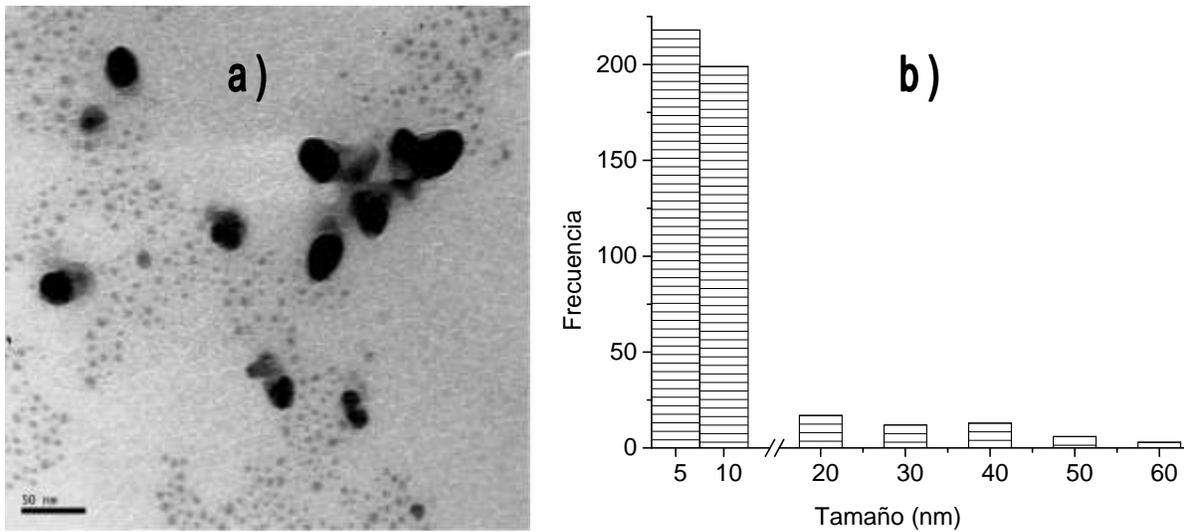


Figura 3.38 AgNP a pH 4 y hojas: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

Las distancias interplanares obtenidas de las micrografías con HRTEM (Figura 3.39), revelaron la formación de nanopartículas de AgO, con dos tipos de estructura: hexagonal y triclínico.

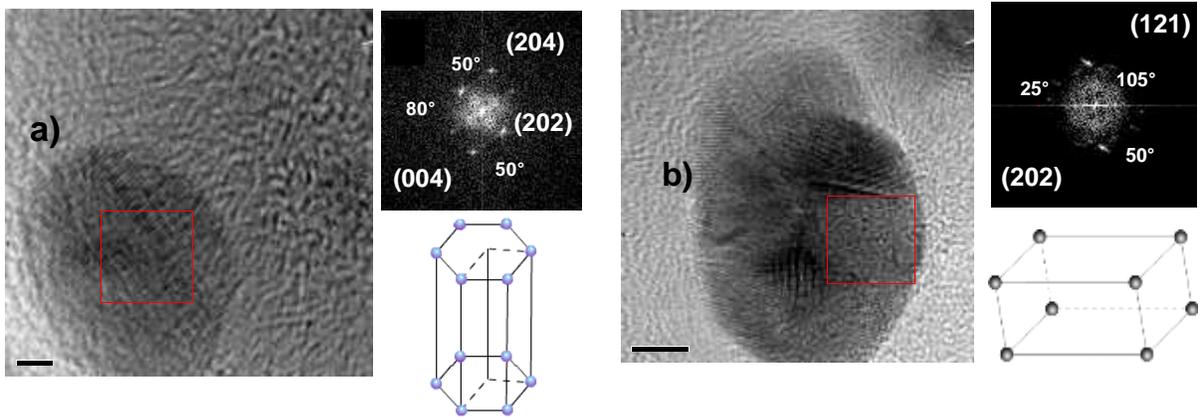


Figura 3.39 Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas con hojas a pH 4 a) con arreglo hexagonal y

Tallos

A través de HRTEM (Figura 3.40), se identificaron las nanopartículas sintetizadas con los tallos, y presentaron morfología cuboctaédrica y cúbica.

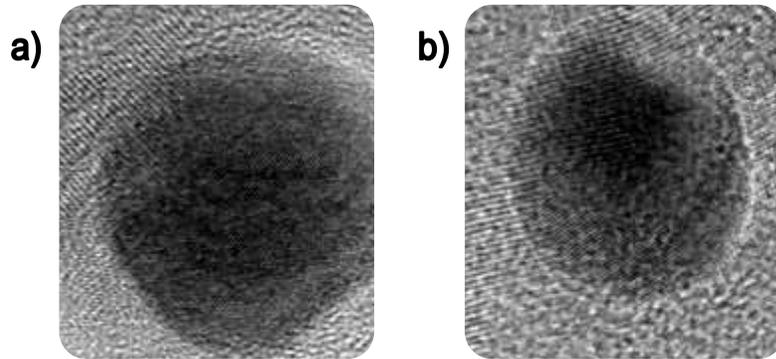


Figura 3.40 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con tallos y pH 4 a) morfología cuboctaédrica y b) cúbica.

Las nanopartículas formadas en la suspensión se encontraron estabilizadas ya que no se observó agregación entre ellas, su diámetro promedio fue 13.9 ± 10.8 nm (Figura 3.41). La formación de AgNP no presentó homogeneidad entre diámetros, sin embargo predominaron las menores a 20 nm, con lo cual, la producción de partículas con dimensiones en el rango de puntos cuánticos fue menor en comparación con las obtenidas con hojas (88.9% vs 48.8%).

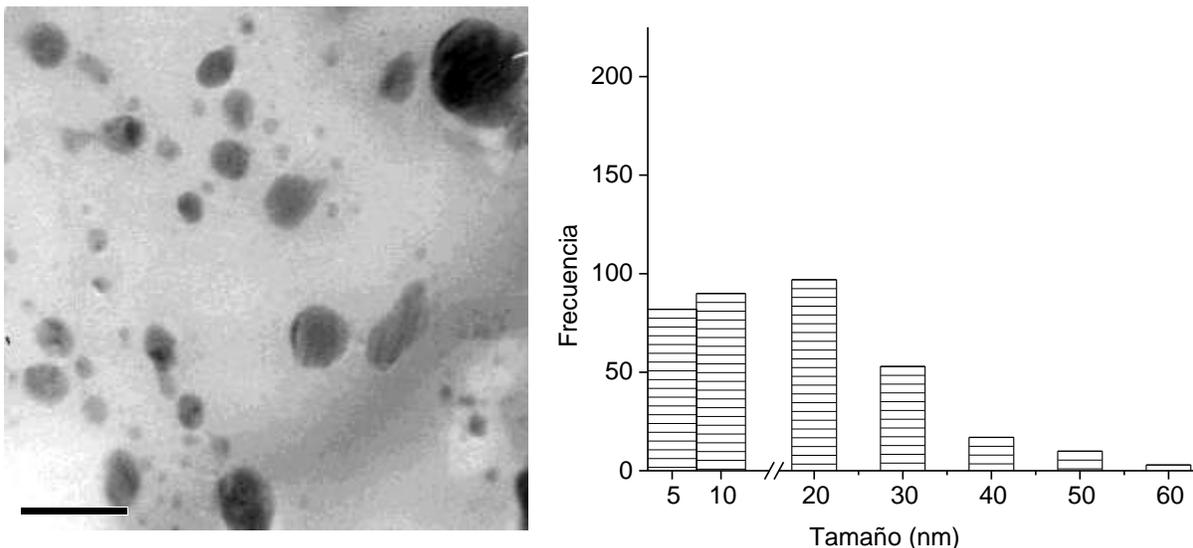


Figura 3.41 AgNP a pH 4 y tallos: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

En la Figura 3.42, se muestran las distancias interplanares obtenidas en dos micrografías de las AgNP sintetizadas. Se aprecian nanopartículas de plata con estructura cúbica y trigonal que marcan una fase de AgO de acuerdo a las tablas cristalográficas.

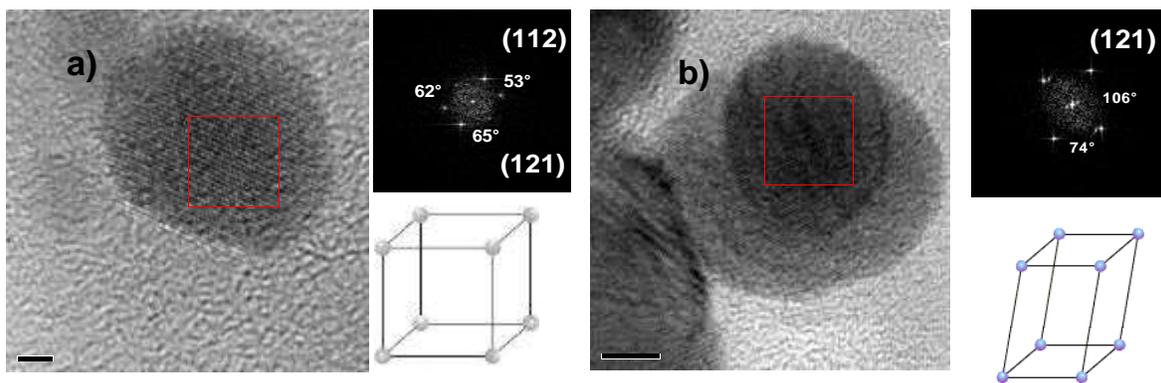


Figura 3.42 Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas a pH 4 con tallos y arreglo a) cúbico y b) trigonal.

Raíces

En las AgNP sintetizadas con raíces utilizando buffer pH 4, se identificaron partículas en forma de cubo truncado en las esquinas e icosaedro, las cuales se presentan en la Figura 3.43.

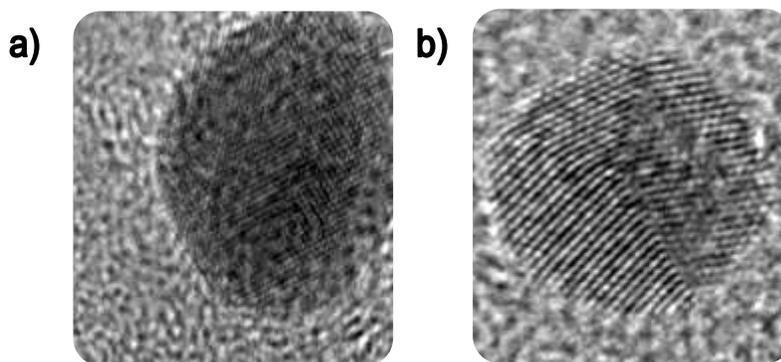


Figura 3.43 Imagen HRTEM de nanopartículas sintetizadas con raíces y pH 4 a) morfología cubica truncada y b) icosaedro.

La distribución de tamaños de las nanopartículas sintetizadas, fue obtenida con imágenes de HRTEM en campo oscuro (Figura 3.44). El 51.7% de las partículas analizadas contó con diámetros menores a 10 nm en promedio 14.1 ± 11.6 nm y su distribución fue consistente con la de las AgNP obtenidas con tallos, donde alrededor del 50% de las partículas se encontraron en el rango de 20 a 60 nm.

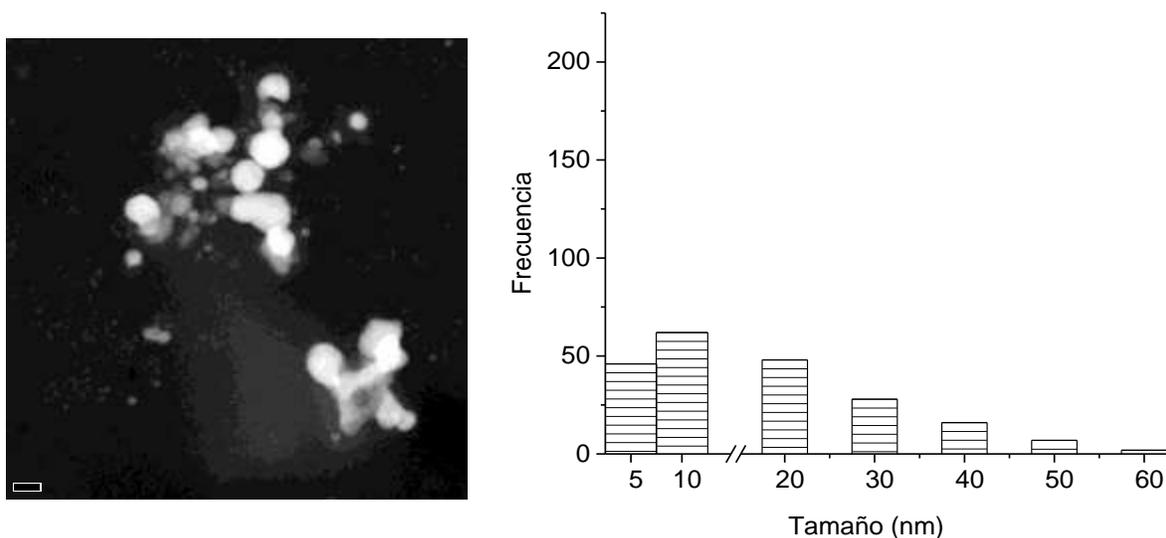


Figura 3.44 AgNP a pH 4 y raíces: a) micrografía, b) distribución de tamaños de partícula.

De forma consistente con las AgNP que se obtuvieron con hojas y tallos, únicamente se detectaron nanopartículas en forma de AgO, con sistemas cristalinos hexagonales y trigonales respectivamente (Figura 3.45).

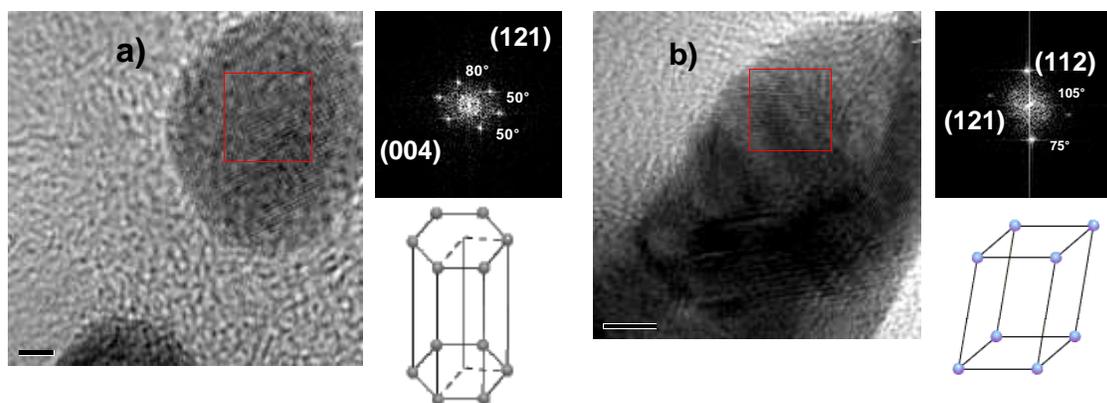


Figura 3.45 Imagen HRTEM de partículas de AgO producidas a pH 4 con raíces y arreglo a) hexagonal y b) trigonal.

Los datos obtenidos de las micrografías de AgNP ajustadas a pH 4, se resumen en la Tabla 3.6:

Tabla 3.6 Parámetros obtenidos en la síntesis de AgNP a pH 4 para: hojas (H), tallos (T) y raíces (R).

	Sección biomasa	Promedio (nm)	% < a 10 nm	Morfología	Fase	Estructura
pH 4	H	7.8 ± 9.6 nm	88.8%	cuboctaédrica, icosaedral	AgO	hexagonal triclinica
	T	13.9 ± 10.8 nm	48.8%	cuboctaédrica cubica	AgO	cubica trigonal
	R	14.1 ± 11.6 nm	51.7%	cuboctaédrica icosaedral	AgO	hexagonal trigonal

La obtención de un mayor porcentaje de partículas de tamaños de punto cuántico se presentó al utilizar las hojas y fue consistente con las síntesis de AgNP a pH 7 y 10. Al emplear raíces a pH 4 se presentó el mayor diámetro de partícula; sin embargo, su distribución de tamaños fue similar a la obtenida con tallos con una elevada formación de partículas de 20 nm.

El cambio de coloración en las suspensiones indicativo de la presencia de AgNP, no fue instantáneo como ocurrió durante la síntesis utilizando pH básicos. Sondi *et al.*, (2003), explicó que al utilizar pH ácidos ocurre un incremento en la concentración de protones, lo cual reduce la habilidad de oxidar especies para sustituir electrones causando una velocidad lenta de reacción, generando un crecimiento en el tamaño de las partículas por la colisión que ocurre entre las más pequeñas, y este fenómeno se refleja en que el pico del plasmón de superficie de AgNP no se presente de forma claramente definida (Figura 3.9). Por otra parte el pico asociado a compuestos fenólicos fue el más intenso en comparación los espectros UV-Vis de las síntesis a pH básico y neutro, y este fenómeno es atribuido a la presencia en exceso de polifenoles (Sankar *et al.*, 2009) originando una elevada producción de nanopartículas, pero al tener una velocidad de nucleación lenta, provoca que estas se aglomeren (Figuras 3.37, 3.40 y 3.43).

El análisis por HRTEM reveló que la fase de las nanopartículas obtenidas no muestra una influencia debida a la sección de lirio utilizado, ya a pH ácido se garantiza que las AgNP se obtengan como AgO.

3.3.2 Análisis Termogravimétrico (TG)

La Figura 3.46 corresponde a la descomposición térmica de la biomasa triturada de las hojas de *Eichhornia crassipes*. Se observan tres pérdidas significativas: la primera de 40 a 150°C atribuida a la evaporación del agua residual, una segunda pérdida ocurre entre 200-350°C atribuida a la degradación de celulosa y hemicelulosa y la tercera entre 420-650°C en una reacción endotérmica, atribuida a la descomposición de lignina que es el compuesto más recalcitrante presente en la estructura de *Eichhornia crassipes* (Harun *et al.*, 2011; Girisuta *et al.*, 2008; Atehortua y Gartner 2013; Subhabrata *et al.*, 2014).

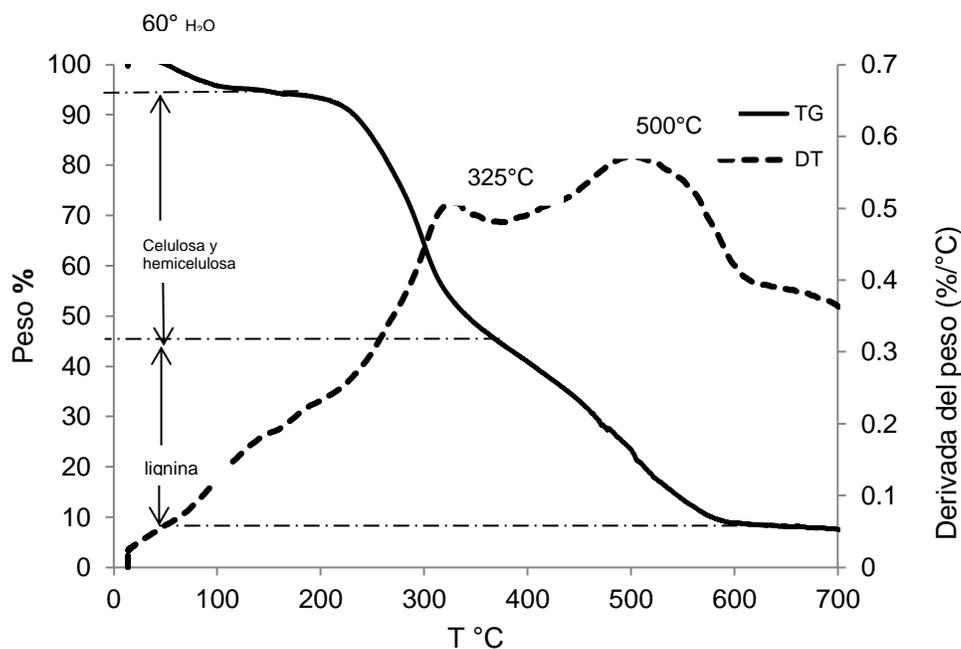


Figura 3.46. Termograma de las hojas de *Eichhornia crassipes*.

La Figura 3.47 corresponde a la descomposición térmica de la biomasa triturada de los tallos de *Eichhornia crassipes*. Se observan tres pérdidas significativas: la

primera de 40 a 150°C atribuida a la evaporación del agua residual, la segunda ocurre entre 200-350°C atribuida a la degradación de celulosa y hemicelulosa y la tercera entre 420-580°C atribuida a la descomposición de lignina.

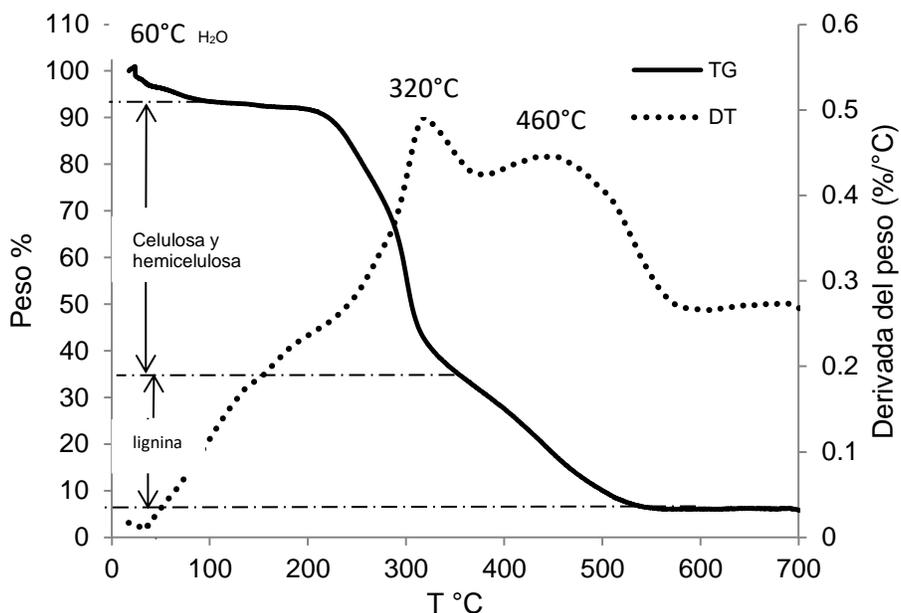


Figura 3.47. Termograma de los tallos de *Eichhornia crassipes*.

En las hojas, la degradación de celulosa y hemicelulosa fue menor (46%) en comparación con los tallos (58%). Este fenómeno puede explicar que el mayor contenido de TH, se detecta en las hojas, pues al degradarse en menor proporción las moléculas de glucosa que componen los taninos, existe una mayor disponibilidad de TH para llevar a cabo el proceso de bio-reducción.

De acuerdo a lo reportado por Cheng *et al.* (2010), en las hojas del lirio el contenido de celulosa y hemicelulosa es el mayor de la planta (59.71%), mientras el porcentaje de lignina es el menor (4.16%). En el proceso de síntesis de AgNP, esta relación entre polisacáridos favoreció la formación de partículas de tamaño uniforme < a 10 nm.

El porcentaje de lignina contenido en los tallos de acuerdo a Cheng *et al.* (2010) es el mayor de la planta con 17.44%, lo cual fue consistente con la menor

degradación en TG. En las plantas, la lignina actúa como un polímero que protege a la celulosa y hemicelulosa de la degradación química (Bhattacharya y Kumar, 2010), y esto puede explicar la detección en UV-Vis de los picos asociados a AgNP con tallos en la escala ácida, básica y neutra.

3.3.3 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis por FT-IR se llevó a cabo para identificar las biomoléculas responsables de la estabilización de las AgNP sintetizadas. En el espectro representado por la Figura 3.48, se muestra la biomasa de *Eichhornia crassipes* antes de la síntesis de AgNP.

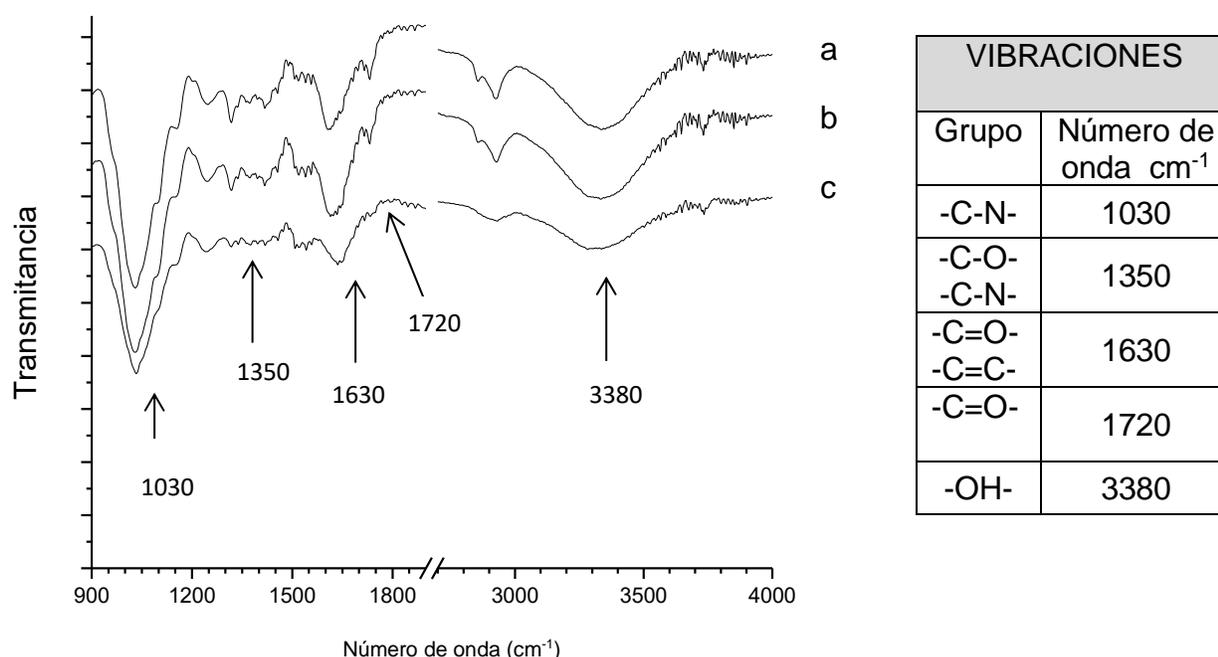


Figura 3.48. FT-IR de la biomasa de a) tallos, b) hojas y c) raíces previo a la síntesis de AgNP.

Se observan las vibraciones -C-N localizadas a 1030 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} que indican la presencia grupos amino, atribuidos a la presencia de los péptidos en la planta (Thombre *et al.*, 2014). Los picos más intensos se detectaron en hojas y tallos, lo cual se asocia al porcentaje en peso de proteínas reportado por Cheng *et al.* (2010) de 20.97% para hojas, 6.80% en tallos y 2.6% en raíces.

La banda observada a 1630 cm^{-1} en raíces, tallos y hojas es característica de la presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina como estiramientos C=O por sus anillos aromáticos (Atehortua y Gartner, 2013; Saad *et al.*, 2014), y de estiramientos C=C por amidas primarias que se encuentran asociadas a la presencia de compuestos fenólicos en *Eichhornia crassipes* (Kiruba *et al.*, 2012),

Las bandas de absorción a 1720 cm^{-1} se encuentran asociadas al enlace C=O por la presencia de taninos hidrolizables (Tondi y Petutschnigg, 2014), las cuales son más intensas en hojas y tallos, consistente con la cuantificación de TH realizada en la sección 3.1.3. Las vibraciones localizadas a 3380 cm^{-1} , se atribuyen a los estiramientos provocados por los grupos OH de las moléculas lignocelulósicas y moléculas de agua enlazadas (Atehortua y Gartner, 2013).

La biomasa después de ser utilizada en el proceso de síntesis presentó el espectro representado en la Figura 3.49:

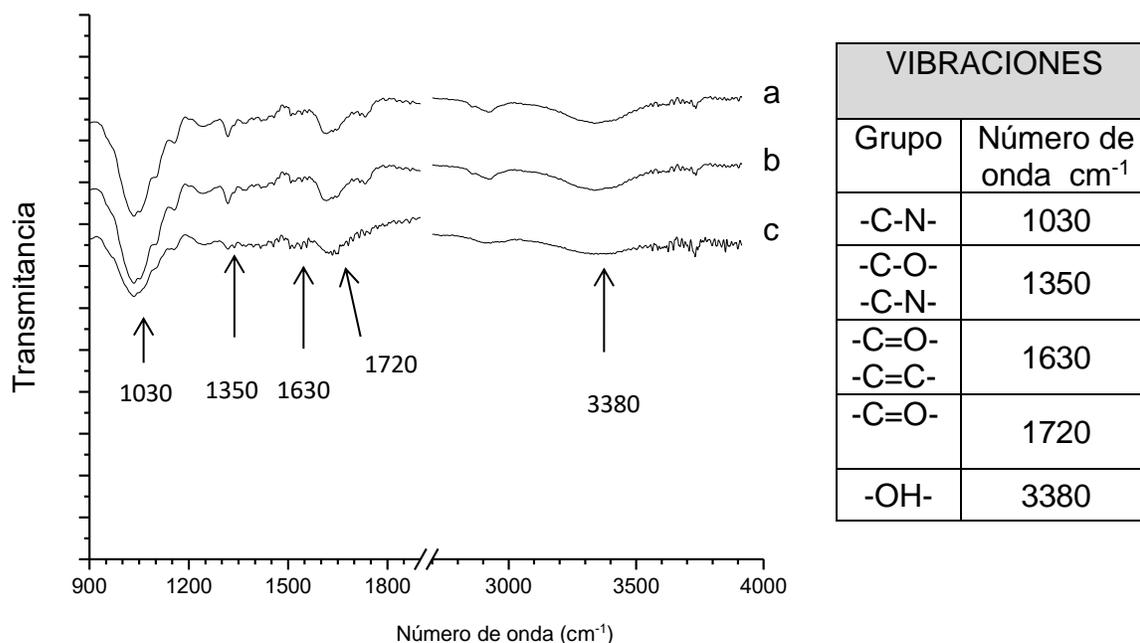


Figura 3.49 FT-IR de la biomasa de a) tallos, b) hojas y c) raíces posterior a la síntesis de AgNP

Se observa una disminución general en la intensidad de los picos ya identificados en todas las secciones del lirio después de la síntesis de AgNP. Al comparar las bandas localizadas a 1630 cm^{-1} y 3380 cm^{-1} atribuidas a la presencia de

compuestos fenólicos, las hojas y tallos presentaron una mayor disminución en la intensidad de absorción, lo cual puede explicar que estas secciones se favorecieron la reducción de los iones metálicos (Kiruba *et al.*, 2012), generando en mayor cantidad nanopartículas estabilizadas con diámetros menores a 10 nm.

La disminución de intensidad en las bandas asociadas a los grupos amino en 1030 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} para hojas y tallos, sugiere que la elevada cantidad de proteínas en estas secciones, tiene un rol clave en la síntesis y estabilización de las AgNP, mediante la adsorción de residuos proteicos en su superficie que evitan la aglomeración entre partículas (Thombre *et al.*, 2014; Devi y Joshi, 2015). Este comportamiento se observó en las Figuras 3.10, 3.11 y 3.13. Al utilizar hojas y tallos, las nanopartículas presentaron menor aglomeración, en comparación con las raíces (Figura 3.12 y 3.14), en donde el porcentaje de proteínas es menor (Cheng *et al.*, 2010).

3.3.4 Área superficial

El área superficial y porosidad cuantificada para raíces, tallos y hojas, se muestra en la Tabla 3.7. Por el tamaño de poro comprendido < a 25 nm, *Eichhornia crassipes* se encuentra conformada por estructuras de tipo mesoporoso.

Tabla 3.7 Área superficial y porosidad en *Eichhornia crassipes*.

Sección de <i>Eichhornia crassipes</i>	Área superficial ($\frac{m^2}{g}$)	Tamaño de poro (nm)
Raíces	0.85	3.29
Tallos	1.93	5.28
Hojas	0.85	5.48

El área superficial cuantificada para los tallos, fue superior al doble de la presentada por hojas y raíces (1.93 vs 0.85 m^2/g) lo cual se asocia a su

distribución conformada por celdas dando lugar a una estructura porosa, la cual le sirve a la planta para acumular agua y aire en su interior.

La mayor producción de nanopartículas < a 10 nm ajustando a pH básico, se generó al utilizar los tallos durante el proceso de síntesis, y puede atribuirse a que el área de contacto de la biomasa con los iones Ag^+ es mayor, favoreciendo la producción de nanopartículas que son estabilizadas por la adsorción física de los compuestos fenólicos presentes en *Eichhornia crassipes*.

El área superficial de las hojas y tallos fue de $0.85 \text{ m}^2/\text{g}$, sin embargo el tamaño de poro menor en las raíces, no favoreció la interacción de la biomasa en el proceso de bio-reducción.

3.3.5 Microscopía electrónica de Barrido (MEB)

Por microscopía electrónica de barrido, se observó que todas las secciones de la biomasa después de ser acondicionada, presentan estructuras entrecruzadas en tipo espiral y laminar (Figura 3.50 a-c), similares a las observadas en celulosa (Figura 3.50-d). El contenido en *Eichhornia crassipes* de este polisacárido, oscila entre 46.8% y 66.9% (Mishima *et al.*, 2008; Nigam, 2002) y al observarse estructuras similares en la biomasa después de ser acondicionada, puede asociarse a que el tratamiento con HCl no afecta la estructura o arreglo original de las hojas.

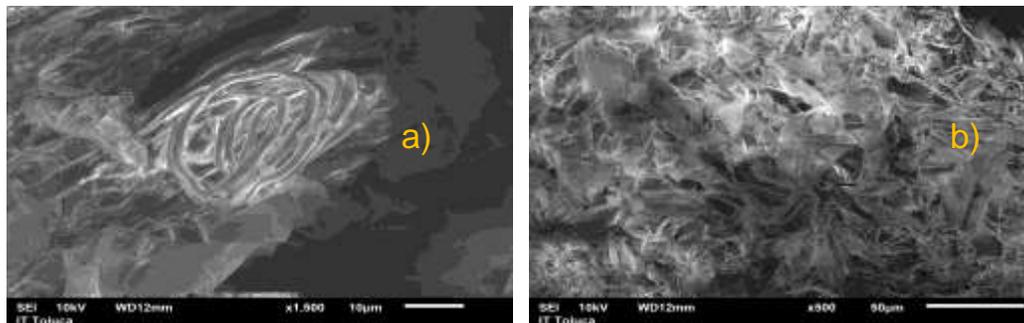


Figura 3.50 Micrografía de la estructura de: a) hojas y b) tallos de *Eichhornia crassipes* después de ser acondicionada con HCl.

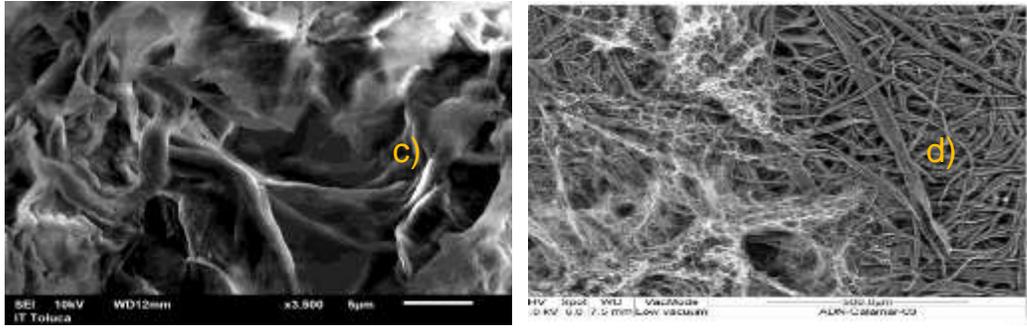


Figura 3.50 cont. Micrografía de la estructura de: c) raíces de *Eichhornia crassipes* después de ser acondicionada con HCl y d) estructura de celulosa y hemicelulosa reportada por Rey-Fraile (2012).

Los espectros EDS de todas las secciones analizadas (raíces, tallos y hojas) fueron consistentes con el presentado en la Figura 3.51 para las hojas, indicando que la biomasa acondicionada contiene en su estructura oxígeno, carbono y calcio, asociados a la naturaleza de las moléculas orgánicas que forman la estructura de la planta, y que no contiene elementos que pudieran interferir en el proceso de bio-reducción con los iones de plata.

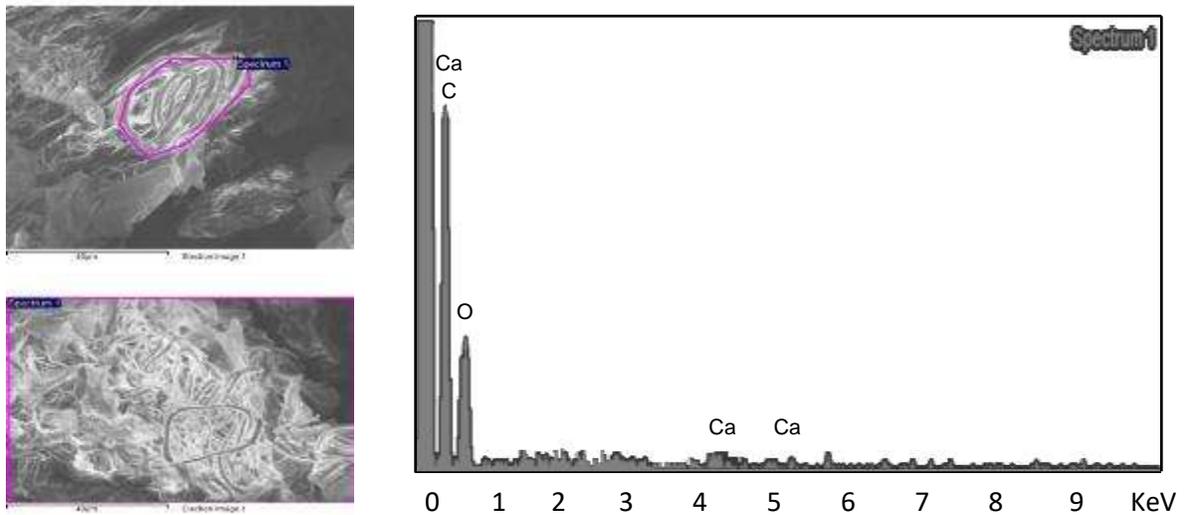


Figura 3.51 Espectro EDS de la biomasa hojas de *Eichhornia crassipes*

3.4 RECUPERACIÓN DE AgNP EN LAS SUSPENSIONES

Antes de comenzar las pruebas de actividad microbiciada, se efectuó la separación de las AgNP producidas en las suspensiones de los diferentes pH y secciones del lirio por centrifugación a 10000 rpm. Ambos factores influyeron en la recuperación de material en polvo como se presenta en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Recuperación de AgNP en polvo de las suspensiones después del proceso de ultracentrifugación

	pH 12	pH 10	pH 7	pH 4
Hojas	36.4 mg/L	4.9 mg/L	-	-
Tallos	58.2 mg/L	4.9 mg/L	4.9 mg/L	-
Raíces	60.6 mg/L	7.3 mg/L	-	-

En la escala de pH básico para todas las secciones de la planta se recuperaron entre 4.9 y 60.59 mg/L, sin embargo al disminuir el pH utilizado en el ajuste, la cantidad de material en polvo disminuyó hasta que en pH 4 no fue posible la recuperación de AgNP. En los histogramas de las Figuras 3.11, 3.15, 3.18, 3.22 y 3.25 se observa que al utilizar pH básicos la producción de AgNP se incrementó sugiriendo que por esta razón el rendimiento en mg/L es superior al utilizar estos pH, sin embargo también se observa una influencia al utilizar las diferentes secciones de la planta. Con las raíces se recuperó una cantidad mayor de AgNP en comparación con las hojas y tallos donde se formaron los diámetros de partícula más pequeños, comportamiento que sugiere que entre mayor sea el diámetro de partícula, la separación por centrifugación será más eficiente y que las AgNP más pequeñas en la suspensión (en escala de puntos cuánticos) no son extraídas completamente.

Bajo estos resultados, considerando que las AgNP más pequeñas se obtuvieron al utilizar las hojas y que ajustando a pH 12 la recuperación de material (36.4 mg/L) fue superior a la obtenida con el resto de pH para esta sección de la planta, a partir de esta etapa de la investigación se utilizó esta combinación de variables en

las pruebas de actividad microbicida que se describen a continuación. En los estudios de cuantificación de Ag^+ y Ag^+ se utilizaron las suspensiones ajustadas a pH 12 utilizando las tres secciones de la planta para identificar la influencia de los TH en la conversión de iones en las suspensiones.

3.5 CUANTIFICACIÓN DE PLATA EN LAS SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)

Después de que las suspensiones de AgNP fueron sintetizadas, se separaron la fracción iónica (Ag-ion) y las nanopartículas (Ag-NP) de acuerdo a lo descrito por Galazzi *et al.* (2015). En la Figura 3.52, se observa que al incrementar el tiempo de centrifugación, la intensidad del plasmón de superficie en 420 nm característico de las AgNP disminuyó y esta condición puede atribuirse a la disminución en la cantidad de nanopartículas presentes en la suspensión debido a la precipitación de las mismas (Padalia *et al.*, 2015; Sondi *et al.*, 2003). En el periodo de 40 a 90 minutos este comportamiento dejó de ser evidente y el espectro UV-Vis de las suspensiones permaneció constante, indicando que la separación de AgNP se vuelve limitada, y que a partir de los 40 minutos las AgNP que se encuentran en la suspensión original son separadas exitosamente.

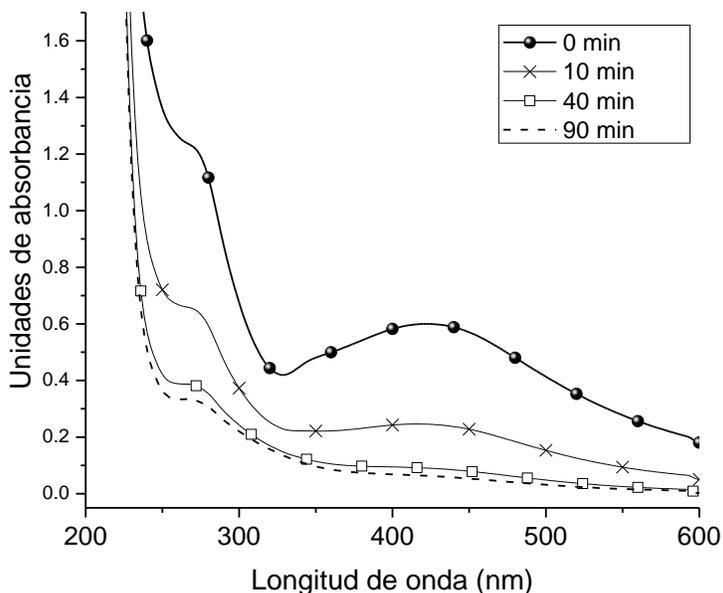


Figura 3.52 Espectro UV-Vis para la optimización del tiempo de centrifugación de las Suspensiones de AgNP a 10,000 rpm.

Una vez optimizadas las condiciones de separación entre las fracciones de plata, se analizaron las suspensiones obtenidas con las raíces, tallos y hojas del lirio determinando los aportes de Ag^+ y Ag^0 . En la Tabla 3.9, se presentan los resultados obtenidos con cada una de las secciones del lirio.

Tabla 3.9. Concentración en mg/L de plata para las fracciones obtenidas de las suspensiones con raíces, tallos y hojas a pH 12.

RAÍCES	FRACCIÓN	PROMEDIO mg/L	% EN LA SOLUCIÓN
	Ag-total	101.45 ± 1.67	
	Ag-ion	22.07 ± 0.31	21.75%
	Ag-NP	79.39 ± 1.63	78.25%

TALLOS	FRACCIÓN	PROMEDIO mg/L	% EN LA SOLUCIÓN
	Ag-total	118.97 ± 2.44	
	Ag-ion	19.58 ± 3.04	16.46%
	Ag-NP	99.39 ± 5.46	83.54%

HOJAS	FRACCIÓN	PROMEDIO mg/L	% EN LA SOLUCIÓN
	Ag-total	109.82 ± 3.59	
	Ag-ion	16.92 ± 1.41	15.41%
	Ag-NP	92.90 ± 4.48	84.59%

El contenido de plata total (Ag-total) se encontró en el rango de 101.45 ± 1.67 mg/L a 118.97 ± 2.44 , en los cuales la conversión de iones Ag^+ hacia Ag^0 se llevó a cabo al menos en 78.25% para todas las secciones de la planta. Por otra parte, al utilizar los tallos y hojas donde se encuentra el mayor contenido de taninos hidrolizables (TH), se alcanzaron los valores más altos de AgNP en mg/L (99.39 ± 5.46 y 92.90 ± 4.48 respectivamente) en comparación con las raíces (79.39 mg/L). Esta condición puede atribuirse a que el contenido de TH que intervienen durante el proceso de bioreducción, y que su presencia influye en la conversión de iones Ag^+ del AgNO_3 , ya que entre mayor es la cantidad de moléculas disponibles para interactuar con los iones, mayor es la producción de AgNP.

Al comparar la recuperación de AgNP en polvo después del proceso de centrifugación en la Tabla 3.8 contra la presencia total de AgNP en solución después del proceso de síntesis, se observa que la eficiencia en la recuperación del material no es 100% efectiva. Para las raíces, de los 79.39 mg/L de AgNP en contenidos en la suspensión, se recuperaron 60.6 mg/L (76.33%); en los tallos, de los 99.39 mg/L, se recuperaron 58.2 mg/L (58.55%) y finalmente con las hojas de los 92.9 mg/L de AgNP en la suspensión se recuperaron únicamente 36.4 mg/L equivalentes al 39.2% de las contenidas originalmente en la suspensión. Este comportamiento puede asociarse directamente con los diámetros de partícula obtenidos entre las secciones de la planta. Al utilizar los tallos y hojas, el 88% y 92% de las AgNP tuvieron diámetros < 10 nm, condición que sugiere que estas partículas no son capaces de precipitar a pesar de incrementar el tiempo de centrifugado hasta 90 minutos (Figura 3,52), mostrando que el 41.5% y 60.8% de las AgNP < 10 nm producidas al utilizar los tallos y hojas respectivamente, permanecen en la suspensión como puntos cuánticos, aun después del proceso de centrifugado.

La aplicación directa de estos materiales, requiere un proceso de purificación para no contar con la interferencia de la fracción iónica de Ag remanente de la síntesis, para lo cual se han considerado los procesos de centrifugación y secado en la

obtención de nanopartículas en polvo a partir de suspensiones con AgNP entre 1.3-158 nm (Galazzi *et al.*, 2015) y 5-300 nm (Tien *et al.*, 2008).

Para confirmar que éstos tratamientos no afectaron las propiedades de los materiales, se analizaron los espectros UV-Vis en la suspensión de hojas (AgNP-total) y en las AgNP separadas después de obtenerse en polvo, comparando el efecto entre los plasmones de superficie (Figura 3.53). Se observa que en la suspensión original y en las nanopartículas acondicionadas (Ag-NP), el pico representativo del plasmón de superficie permanece constante en 420 nm, indicando que después de los procesos de centrifugación, separación, secado y resuspensión, las AgNP conservan sus propiedades (tamaño, estructura, composición) y no sufren alteraciones respecto a las obtenidas originalmente en la suspensión.

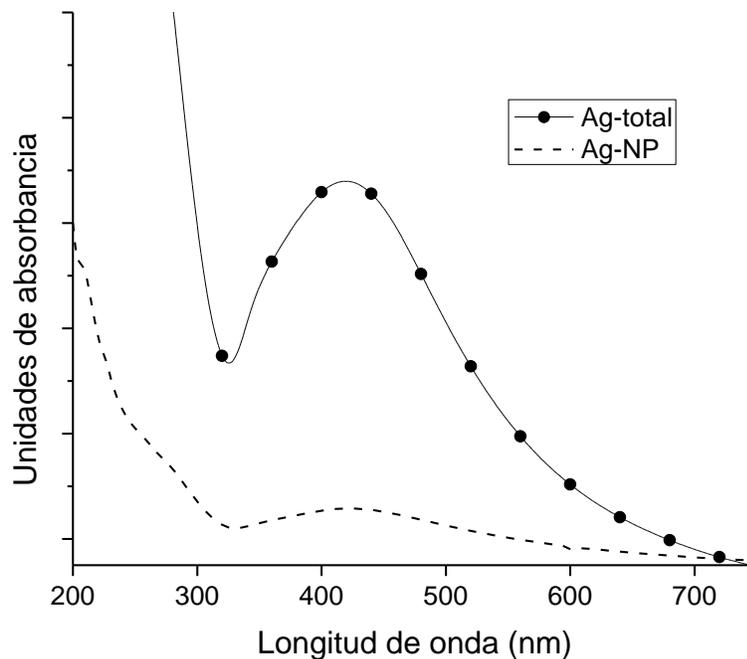


Figura 3.53 Espectro UV-Vis de AgNP-susp y AgNP-cen sintetizadas con hojas y buffer pH 12.

3.6 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BACTERICIDA

De acuerdo a la recuperación de AgNP reportada en la sección 3.4, en las pruebas de actividad microbicida para ambas cepas se utilizaron las nanopartículas en polvo separadas de la suspensión preparada con hojas y pH 12. Estas partículas tuvieron un diámetro promedio de 4.18 ± 3.9 nm, con morfologías poliedrales (romboédrica e icosaédrica) en fase Ag-AgO. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* (*E. coli*), que pertenece al grupo de los coliformes indicadores de contaminación microbiológica (NOM-003-SEMARNAT-1997) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) que es el principal responsable de infecciones en el ser humano (Rahim y Mohamed, 2015; Chudobova *et al.*, 2013). Los estudios utilizando AgNP se describen a continuación.

a) *Escherichia Coli* (*E. coli*)

3.6.1 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas

Se utilizó el método de las diluciones sucesivas para cuantificar el número de microorganismos viables en los inóculos de las cepas *E. Coli* ATCC 25992. Para el conteo de UFC/mL se consideraron únicamente las placas en que el número de colonias se encontró en el rango de 25 y 250 UFC/mL de acuerdo a lo indicado en NOM-092-SSA1-1994. La concentración de UFC/mL se realizó dividiendo el número de colonias en cada placa entre la dilución utilizada del inóculo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Cuenta en placa obtenida para cada una de las repeticiones del inóculo 1×10^{-7}

(Ec 1, Ec 2 y Ec 3).

Muestra	Dilución	UFC/mL
Ec 1	1×10^{-7}	3.65×10^8
Ec 2	1×10^{-7}	5.25×10^8
Ec 3	1×10^{-7}	4.45×10^8

De acuerdo a la cantidad de microorganismos que crecieron en las placas de cada experimento, las unidades formadoras de colonias que crecen a partir de *E. coli* ATCC 25992 se encuentran en el orden de 10^8 UFC/mL (3.65×10^8 , 5.25×10^8 y 4.45×10^8 respectivamente), indicando que ésta cepa es viable para obtener inóculos con hasta 100,000,000 de UFC/mL. Las concentraciones más utilizadas de *E. coli* en pruebas de actividad microbicida se encuentran en el rango de 10^4 a 10^8 UFC/mL (Banala *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2014; Maiti *et al.*, 2014; Yasin *et al.*, 2013; Soo-Hwan *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2007; Sondi y Salopek-Sondi 2004) mismas que dependen de las características propias de cada prueba.

3.6.2 Determinación de UFC/mL con efecto microbicida cuantificable

Durante este estudio, a partir de las UFC/mL obtenidas en la sección 3.6.1, se realizó un barrido entre diferentes concentraciones del inóculo para determinar la concentración óptima de microorganismos a partir de la cual el efecto microbicida de las AgNP obtenidas por bioreducción es evidente. En la etapa inicial, se aplicaron tres diferentes concentraciones: 10, 50 y 100 mg/L en las cuales se ha reportado la inhibición del crecimiento de *E. coli* (Sondi *et al.*, 2004; Maiti *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2011) y después del periodo de incubación de 24 horas, se obtuvieron los resultados de la Tabla 3.11:

Tabla 3.11 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones del inóculo y AgNP :Inc.-Incontable.

Dilución del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de AgNP aplicada		
		10 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
Sin diluir	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.

1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	1
1×10^{-5}	Inc.	562	107	1
1×10^{-6}	601	96	0	0
1×10^{-7}	51	Sin crecimiento		

Al hacer el conteo de colonias en las placas donde el inóculo no fue diluido y diluyendo 10 veces (dilución 1×10^{-1}), el crecimiento de bacterias fue tan elevado que no se distinguió separación entre ellas, si no que una homogénea capa bacteriana se extendió a través de la superficie de las cajas petri sin que las soluciones de AgNP adicionadas mostraran ningún efecto.

En las diluciones del inóculo de 1×10^{-2} a 1×10^{-5} el efecto microbicida de las diferentes concentraciones de AgNP fue evidente de forma visual con una menor densidad de microorganismos a medida que la concentración de AgNP aumentaba. Sin embargo, la cantidad de bacterias tampoco pudo ser contabilizada, por lo que estas diluciones no pudieron considerarse como modelo para medir el efecto bactericida de las AgNP preparadas.

La concentración óptima de microorganismos con la que es posible detectar y cuantificar el efecto microbicida de las AgNP según las condiciones experimentales de este trabajo, se obtuvo a partir de la dilución 1×10^{-6} la cual contiene entre 460 y 860 UFC/mL. Estudios previos de actividad microbicida con AgNP reportan concentraciones iniciales de UFC/mL de 1×10^4 (Banala *et al.*, 2015; Mater *et al.*, 2008; Sondi y Salopek-Sondi, 2004), 1×10^5 (Soo-Hwan *et al.*, 2011 y Banala *et al.*, 2015) y de 1×10^6 (Maiti *et al.*, 2014), superiores a la de este estudio. Sin embargo, la concentración inicial de células por mililitro influye en los mg/L de AgNP requeridos para inhibir por completo el crecimiento bacteriano.

3.6.3 Determinación de la mínima concentración bactericida (MIB)

Los datos obtenidos en la Tabla 3.11 mostraron que a partir de una concentración de AgNP de 50 mg/L, se elimina por completo la cuenta microbiana preparada a partir del inóculo de 1×10^{-6} UFC/mL. Con estos resultados, para detectar la MIB que inhibe por completo la cuenta inicial del inóculo, se prepararon soluciones de AgNP en el rango de 10 a 100 mg/L, y antes se colocar el medio de cultivo se dejaron en contacto con las suspensiones bacterianas durante 20 minutos. Después del periodo de incubación de 24 horas, el número de colonias contabilizado se presenta por duplicado en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 No. de colonias de *E. coli* en función de la concentración de AgNP. Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.

Concentración AgNP (mg/L)	UFC	UFC duplicado
0	460	860
10	3	13
20	0	0
30	0	0
40	0	0
50	0	0
60	0	0
70	0	0
80	0	0
90	0	0
100	0	0

En ambos experimentos, la inhibición en el crecimiento bacteriano se detectó a partir de la soluciones con 10 mg/L de AgNP, logrando una reducción de 99.2% y 98.5% en la cuenta inicial de células por mililitro de 460 y 860 UFC/mL respectivamente. A partir de la inhibición del crecimiento bacteriano la Figura 3.54 a) y b).

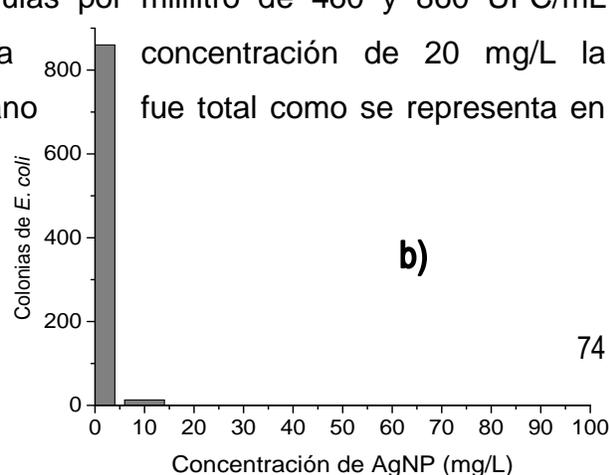
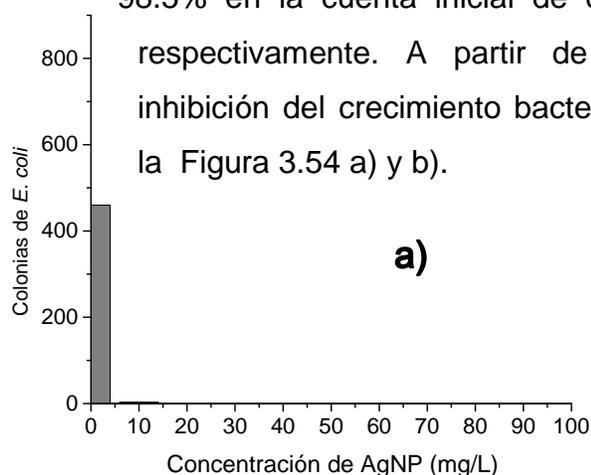


Figura 3.54 Número de colonias de *E. coli* en función de la concentración de AgNP a partir de concentración inicial de a) 460 UFC/mL y b) 860 UFC/mL.

La ir

encontraba entre 0 y 20 mg/L, sin embargo para comprobarlo se trabajó con soluciones de AgNP con 5, 10, 15 y 20 mg/L y se realizó el barrido con las diferentes concentraciones del inóculo de *E. coli* (1×10^{-1} - 1×10^{-7}). Los resultados del experimento se muestran a continuación en las Tablas 3.13 a) y su duplicado en b).

Tabla 3.13 a) UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB (Inc.-incontable).

Concentración del inóculo	UFC/mL	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	20 mg/L
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
Concentración del inóculo	UFC/mL	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	20 mg/L
1×10^{-5}	Inc.	9	41	26	18
1×10^{-6}	850	1	1	0	0
1×10^{-7}	85	1	0	0	0

Tabla 3.13 b) réplica del experimento UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB (Inc.-incontable).

1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-5}	Inc.	127	33	8	21
1×10^{-6}	710	1	2	0	0
1×10^{-7}	71	0	0	0	0

Los resultados obtenidos fueron consistentes con los obtenidos en la Tabla 3.11, en donde se observa que la inhibición en el crecimiento bacteriano depende del número de células aplicadas durante la experimentación (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Con las concentraciones de AgNP probadas en la dilución del inóculo de 1×10^{-5} , la inhibición en el crecimiento se presentó desde 5 mg/L, sin embargo en ninguna de las réplicas se logró inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*.

Con la población de UFC/mL obtenida en la dilución de 1×10^{-6} para ambos experimentos, la concentración de 5 mg/L eliminó en 99.88% y 99.85% respectivamente la cuenta inicial de bacterias, sin embargo la inhibición total del crecimiento se alcanzó utilizando 15 mg/L, indicando que ésta es la mínima cantidad requerida para inhibir el crecimiento total para inóculos de *E. coli* que se encuentren en el rango de 460 a 860 UFC/mL.

Se ha reportado que en muestras de agua de pozo de comunidades rurales expuestas a fuentes de contaminación por actividades productivas (ganadería y pesca) y fosas, el contenido de coliformes totales y fecales oscila entre 0 y 200 UFC/mL (Félix-Fuentes *et al.*, 2007), rango que es cubierto por las AgNP de este estudio asegurando para este tipo de agua una eliminación del 100% de las bacterias coliformes.

En trabajos previos sobre actividad antimicrobiana con AgNP (Tabla 3.14), las concentraciones necesarias para la MIB en *E. coli* se encontraron en el rango de 50-100 mg/L.

Se puede observar que las dosis aplicadas de AgNP fueron influenciadas por la cuenta inicial de células/mililitro utilizadas; sin embargo, también se ha demostrado que la modificación de la superficie de las de AgNP con estabilizadores tales PVP, BPEI y SDS mejoran la actividad antibacteriana de las nanopartículas debido a la habilidad que tienen para incrementar la permeabilidad de la pared celular de las bacterias (Ivask *et al.*, 2014; Maiti *et al.*, 2014; Kvittek *et al.*, 2008).

Tabla 3.14 Actividad antimicrobiana reportada para AgNP utilizando la cepa *E. coli*.

UFC/mL en el inóculo	MIB mg/L	Diámetro de partículas	Morfología	Referencia
1x10 ⁴	50-60	12 nm	SD	Sondi, 2004
1x10 ⁵	100	SD	esférica	Kim <i>et al.</i> , 2011
1x10 ⁶	50	10-40 nm	esférica	Maiti <i>et al.</i> , 2014
1x10 ⁵	100	5-50 nm	esférica	Banala <i>et al.</i> , 2015
1x10 ⁷	20	13 nm	esférica	Yasin <i>et al.</i> , 2013
400-850	15	4.18 ± 3.9 nm	Icosaedral romboédrica	Este trabajo

SD- sin definir

In-sok *et al.* (2012) reportaron que para *E. coli* ATCC 25992 (cepa utilizada durante este estudio), la inhibición del crecimiento bacteriano para un inóculo de 1x10⁶ UFC/mL comenzó a partir de 2 mg/L utilizando AgNP sintetizadas por vía química con 3 nm de diámetro y morfología esférica. En este estudio las AgNP tuvieron un diámetro promedio de 4.18 nm y morfología poliedral, sin embargo, las bacterias fueron eliminadas a partir de 5 mg/L a pesar de que la cuenta inicial fue inferior (460-860 UFC/mL). Este fenómeno puede atribuirse a que de acuerdo a la sección 3.5, únicamente el 39.2% del total de las AgNP

producidas son separadas por centrifugación incluyendo nanopartículas de hasta 25 nm de diámetro (Figura 3.11), y al permanecer la mayor proporción de AgNP consideradas puntos cuánticos en la suspensión (60.8%), el área superficial en contacto con las superficies bacterianas es menor dificultando la interacción y liberación de iones para maximizar el efecto bactericida.

3.6.4 Comparación entre agentes microbianos de plata

En este estudio de toxicidad, las AgNP en polvo se compararon contra dos agentes que contienen plata en forma iónica (AgNO₃ y solución comercial de plata ionizada) y contra la suspensión original después de la síntesis (donde se encontraron las AgNP que no fueron separadas por centrifugación). Considerando la MIB determinada en el apartado 3.6.3, se prepararon soluciones con 5, 10, 15, 20 y 30 mg/L de plata a partir de cada agente y se pusieron en contacto con el inóculo de la dilución 1x10⁻⁶ durante 20 minutos. Después del periodo de incubación, el número de colonias contabilizadas se presentan en la Tabla 3.15 a) y su duplicado en b), y los porcentajes de supervivencia en la Figura 3.55.

Tabla 3.15 UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB con solución comercial de plata ionizada-SCOM, nitrato de plata- AgNO₃, nanopartículas de plata-AgNP y la suspensión de AgNP -SUSP, para *E. coli* a partir de una concentración inicial de a) 510 y b) 740 UFC/mL.

a) Concentración (mg/L)						b) Concentración (mg/L)					
AGENTE	5	10	15	20	30	AGENTE	5	10	15	20	30
SCOM	50	0	0	0	0	SCOM	0	0	0	0	0
AgNO ₃	0	0	0	0	0	AgNO ₃	1	0	0	0	0

AgNP	30	9	0	0	0
SUSP	0	0	0	0	0

AgNP	0	0	0	0	0
SUSP	0	0	0	0	0

Los resultados obtenidos muestran que el efecto antimicrobiano en la SCOM, AgNO₃, AgNP y SUSP fue evidente desde 5 mg/L para todos los agentes de prueba a pesar de la especie de plata, sin embargo los porcentajes de inhibición no fueron equivalentes entre los tipos de plata aplicada. Al utilizar las soluciones con plata iónica (Figuras 3.55 a y b), la dosis de 5 mg/L redujo en 90% y 99.86% la cuenta inicial bacteriana, mientras que a partir de 10 mg/L la inhibición del crecimiento fue total, expresado con 0% de supervivencia de UFC/mL

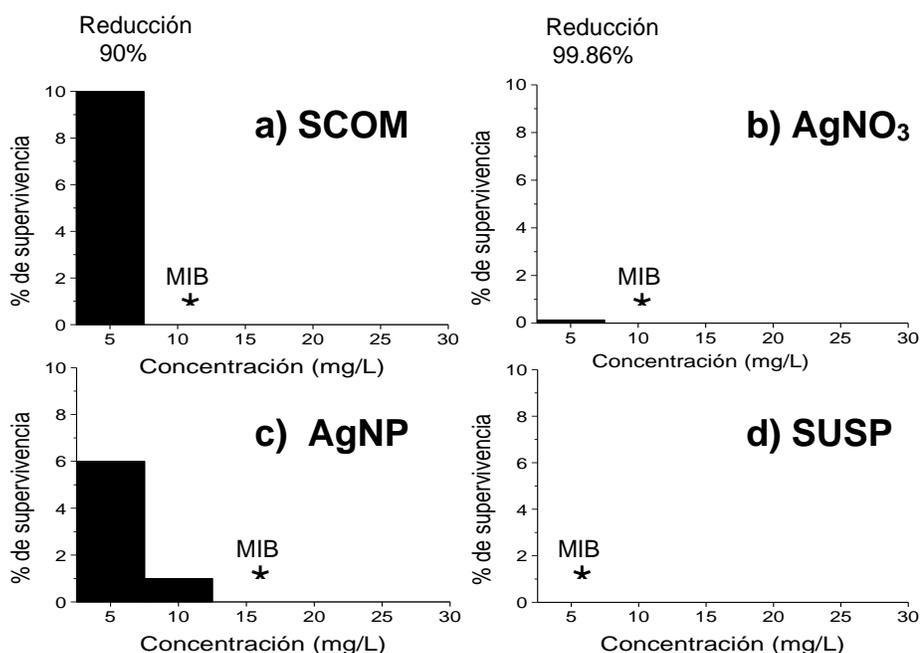


Figura 3.55 Porcentaje de supervivencia de *E. coli* al aplicando: a) solución comercial de plata ionizada-SCOM, b) nitrato de plata- AgNO₃, c) nanopartículas de plata-AgNP en polvo y d) suspensión de AgNP-SUSP, en el rango de 5 a 30 mg/L. Concentración del inóculo 1×10^{-6} UFC/mL.

Por otra parte, al utilizar las AgNP extraídas, los resultados fueron consistentes a los presentados en las Tablas 3.13 a y b, donde ocurre un decrecimiento gradual en el número de UFC/mL (Figura 3.55 c) donde a partir de 15 mg/L se registra la ausencia de bacterias. Finalmente, al utilizar la suspensión obtenida después de la

síntesis donde coexisten ambas fases de plata (Ag^+ y Ag^0), el poder bactericida se presentó desde 5 mg/L eliminando el total de las bacterias contenidas en el inóculo inicial de 1×10^6 UFC/mL (Figura 3.55 d), y presentando la MIB más baja entre los agentes probados.

Se ha reportado que el poder biocida de la plata se incrementa cuando se administra en forma AgNP en polvo, ya que estas ofrecen una mayor área superficial para interactuar con las bacterias (Devi y Joshi, 2015; Arooj *et al.*, 2014). Sin embargo en este estudio se observó lo contrario al utilizar las AgNP sintetizadas por bio-reducción, la cantidad de plata requerida para inhibir por completo el crecimiento bacteriano fue superior en comparación con los agentes que contenían plata en forma iónica (15 mg/L vs 10 mg/L), pero al utilizar la suspensión que contiene AgNP (donde el 92% de las partículas presentó un diámetro menor a 10 nm) y plata iónica, la dosis necesaria para eliminar el 100% de las bacterias fue 5 mg/L la cual es inferior a la requerida para los agentes a base de plata iónica (SCOM y AgNO_3) sugiriendo que el diámetro de las AgNP influye en su poder bactericida y que entre menor es su tamaño, se promueve una mayor interacción para maximizar el efecto microbicida, consistente con lo reportado por Paredes *et al.* (2014), Wady *et al.* (2014) y Kon *et al.* (2013).

Los resultados obtenidos mostraron que los iones Ag^+ (libres y contenidos en las AgNP) influyen en el proceso de actividad antimicrobiana contra *E. Coli* (Velusamy *et al.*, 2015; Ivask *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2008; Morones *et al.*, 2005), en conjunto con las AgNP < a 10 nm que no fueron separadas por centrifugación, por ello al utilizarse en conjunto el poder bactericida se incrementó y la dosis de plata requerida fue menor.

La plata en forma Ag^+ tiene como principal desventaja su alta reactividad frente a cloro, sodio, fosfatos y materia orgánica, ya que al combinarse con estos elementos es susceptible a inactivarse por mecanismos tales como complejación o precipitación (Maiti *et al.*, 2014 y In-sok *et al.*, 2012), es por ello que se ha

incrementado el interés en utilizar materiales que no reaccionen fácilmente con las sustancias presentes en el medio como los compuestos microbicidas cero-valentes utilizados en este estudio.

Morones *et al.* (2005) y Rai *et al.* (2009) reportaron en sus pruebas de actividad antimicrobiana, que al utilizar AgNP con diámetros menores a 10 nm con morfologías triangulares y poliedrales (Pal *et al.*, 2007), su poder bactericida superó ampliamente al de la plata iónica (AgNO_3) utilizando inóculos en el rango de 1×10^5 - 1×10^7 UFC/mL, evidenciando la influencia asociada a partículas < a 10 nm. Este comportamiento no pudo observarse claramente en este estudio debido a que la recuperación de las nanopartículas en la suspensión original fue del 30.8% (sección 3.5), el cual fue aportado principalmente por las partículas de hasta 25 nm de diámetro, con lo cual, los fenómenos de superficie y la liberaciones de iones Ag^+ en el interior de las bacterias no tuvieron la misma eficiencia en comparación con las nanopartículas consideradas puntos cuánticos.

3.6.5 Crecimiento bacteriano en presencia de AgNP en polvo

Para examinar la velocidad de crecimiento de *E. coli*, en presencia de diferentes concentraciones de AgNP, se prepararon tres suspensiones de caldo TSB (Caldo soya triptecaseina), se inocularon con el microorganismo y por botella se adicionaron 0, 15, 50 ó 100 mg/L de AgNP. Cada hora se retiraron 10 mL de cada botella y a estas soluciones se les midió la densidad óptica (OD) utilizando espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm para observar la velocidad de crecimiento del microorganismo a través del tiempo. Para convertir las unidades de absorbancia a células/mililitro, se consideró que 0.1 de OD corresponde a una concentración de 1×10^8 células/mililitro (Maiti *et al.*, 2014; Wen-Ru *et al.*, 2010; Sondi y Salopek-Sondi, 2004). El gráfico se presenta a continuación en la Figura 3.56 para las tres suspensiones de prueba.

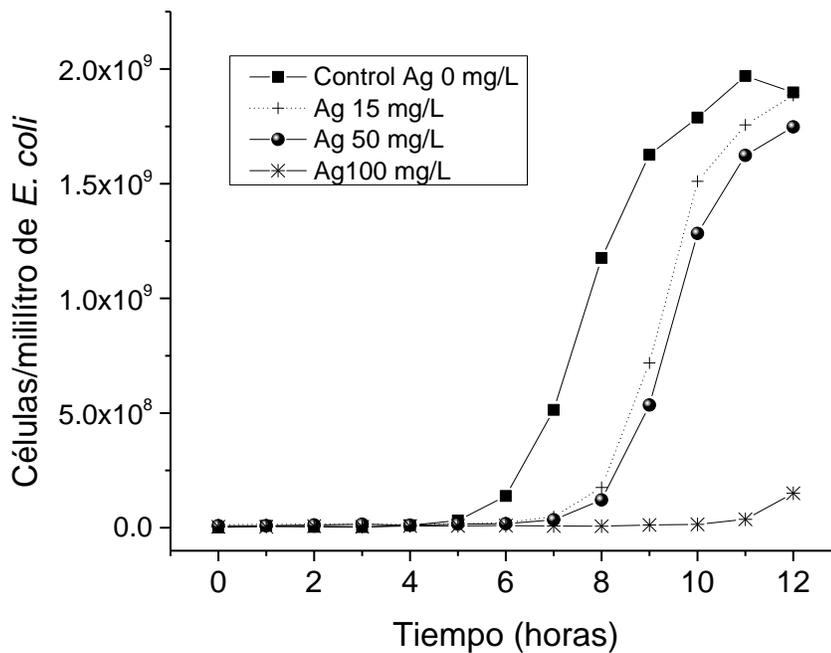


Figura 3.56 Curva de crecimiento de *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de AgNP

La cantidad de bacterias que se desarrollaron en el medio de cultivo con AgNP, incrementó a través del tiempo con una fase de latencia y adaptación al medio de aproximadamente 5 horas y a partir de este periodo creció exponencialmente hasta las 11 horas donde llegó a su máximo crecimiento.

En las soluciones adicionadas con AgNP, se observó que el número de bacterias disminuyó en comparación a la muestra control, ya que al incrementar la concentración de 15 a 100 mg/L en el medio, se observó la influencia de las AgNP en polvo sobre el crecimiento de *E. coli*, las cuales intervienen en la reducción de la velocidad de crecimiento de las bacterias (Raffi *et al.*, 2008).

A pesar de utilizar la concentración de AgNP de 100 mg/L en la cinética de crecimiento, en la Figura 3.56, se observa que no hay una inhibición total en el mismo, ya que a partir de 11 horas se observa un incremento en la pendiente asociada a la fase de crecimiento de las bacterias, indicando que las AgNP retardan el crecimiento bacteriano pero no eliminan por completo la presencia inicial en el medio.

b) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

3.6.6 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas

La cuenta de UFC/mL obtenida por el método de las diluciones sucesivas en los inóculos de *S. aureus* ATCC 6538 se presenta a continuación en la Tabla 3.16. En la dilución 1×10^{-1} la cantidad de microorganismos fue tan elevada que cubría por completo la placa y no fue posible cuantificar las UFC/mL. Únicamente en una de las réplicas se identificaron 8970 UFC/mL, indicando que éste es el número mínimo de colonias que crecen en esta dilución.

En la dilución 1×10^{-2} el crecimiento de colonias no fue uniforme, obteniendo cuentas desde 800 a 66900 UFC/mL, y este comportamiento fue consistente con los cuentas obtenidas en la dilución 1×10^{-3} donde se obtuvieron desde 0 UFC/mL hasta 44000 UFC/mL.

Tabla 3.16 Cuenta en placa obtenida para inóculos de *S. aureus*.
Inc.- Incontable.

Muestra	Dilución	UFC/mL
Sa 1	1×10^{-1}	Inc.
Sa 2	1×10^{-1}	Inc.
Sa 3	1×10^{-1}	8970
Sa 4	1×10^{-2}	800
Sa 5	1×10^{-2}	2900
Sa 6	1×10^{-2}	12100
Sa 7	1×10^{-2}	66900
Sa 8	1×10^{-3}	0
Sa 9	1×10^{-3}	2000
Sa 10	1×10^{-3}	10000

Sa 11	1×10^{-3}	44000
-------	--------------------	--------------

A diferencia de lo reportado en la sección 3.6.1 para *E. coli* ATCC 25992, se observa que los inóculos de *S. aureus* ATCC 6538 presentaron una elevada dispersión en el número de células viables que crecen en el medio líquido (TSB) por mililitro, a pesar de utilizar la misma dilución en la preparación de los inóculos alcanzando cuentas de hasta 1×10^4 UFC/mL. Debido a la naturaleza propia de la cepa y la variabilidad que presenta en su crecimiento, para las pruebas de actividad microbica utilizando *S. aureus* como cepa modelo, se han utilizado concentraciones iniciales desde 50 UFC/mL (Singhal *et al.*, 2011) hasta 1×10^5 UFC/mL (Goswami *et al.*, 2015; Rahim y Mohamed, 2015; Wady *et al.*, 2014; Soo-Hwan *et al.*, 2011) y también 1×10^6 UFC/mL (In-Sok *et al.*, 2012; Prusty y Parida, 2014), misma que es ajustada con las características propias de cada experimento, y que a continuación son descritas.

3.6.7 Determinación de UFC/mL con efecto microbica cuantificable

A partir de las UFC/mL obtenidas en la sección 3.6.6, se prepararon inóculos con las diluciones 1×10^{-1} - 1×10^{-4} a los cuales se adicionaron 10, 50 y 100 mg/L de

AgNP de acuerdo a lo reportado por Goswami *et al.*, 2015; Prusty y Parida, 2014; Singhal *et al.*, 2011 y Soo-Hwan *et al.*, 2011. Al finalizar el periodo de incubación, los resultados obtenidos del conteo de colonias se presentan en la Tabla 3.17:

Tabla 3.17 Cuenta en placa del crecimiento de *S. aureus* con diferentes concentraciones del inóculo y AgNP.

Dilución del inóculo	UFC/mL inicial	Concentración de AgNP aplicada		
		10 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
1×10^{-1}	incontable	627	0	0
1×10^{-2}	4	0	0	0
1×10^{-3}	0	0	0	0
1×10^{-4}	0	0	0	0

La disminución en el crecimiento de *S. aureus* a través de las diferentes diluciones no ocurrió en forma gradual, y a partir de la dilución 1×10^{-3} no existió crecimiento. En la dilución 1×10^{-2} , el efecto microbicida se presentó desde 10 mg/L, sin embargo la cuenta inicial de bacterias fue muy baja (4 UFC/mL). Este comportamiento se repitió en las réplicas del experimento (no incluidas en la Tabla 3.17), y al existir una cantidad tan reducida de bacterias, la concentración de éste inóculo no es idónea para utilizarse en las pruebas siguientes de esta investigación.

Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la concentración óptima de microorganismos detectables y cuantificables para evaluar el efecto microbicida de las AgNP en *S. aureus* se alcanzó en la dilución 1×10^{-1} a pesar de que la cuenta inicial fue incontable. El crecimiento bacteriano fue inhibido por completo al aplicar 50 mg/L de AgNP, sin embargo, la dosis mínima de nanopartículas para la concentración de microorganismos existente en esta dilución, se presentará a continuación.

3.6.8 Determinación de la mínima concentración bactericida (MIB)

El rango de concentraciones de prueba de AgNP se modificó preparando soluciones con 2, 5, 10 y 20 mg/L para determinar la MIB. Dada la discrepancia en las cuentas iniciales entre los inóculos (1×10^{-1} - 1×10^{-2}), se utilizaron ambos durante el experimento y los resultados se presentan en las Tablas 3.18 a) y b).

Tabla 3.18 a) UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB utilizando el inóculo preparado con la dilución 1×10^{-1} (Inc.-incontable).

No. prueba	UFC/mL	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
1	Inc.	Inc.	104	0	0.
2	Inc.	2	0	0	0
3	Inc.	Inc.	1041	0	0

Tabla 3. 18 b) UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB utilizando el inóculo preparado con la dilución 1×10^{-2} (Inc.-incontable).

No. prueba	UFC/mL	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
1	667	0	0	0	0.
2	262	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0

La variación en las cuentas iniciales entre inóculos de la misma dilución presentó el mismo comportamiento observado en la Tabla 3.16. Al utilizar la dilución de 1×10^{-1} (Tabla 3.18 a), la cuenta inicial en todos los experimentos fue incontable y sin separación entre colonias; sin embargo, la concentración de microorganismos se redujo al incrementar la dosis de AgNP y 10 mg/L fueron suficientes para eliminar por completo la presencia (incontable) de *S. aureus*. Por otra parte, la dilución 1×10^{-2} (Tabla 3.18 b) registró cuentas iniciales entre 0 y 667 UFC/mL, y con una menor cantidad de bacterias, la dosis requerida de nanopartículas también fue menor (2 mg/L).

El comportamiento de la cepa de *S. aureus* por la presencia de AgNP, ha mostrado variabilidad en estudios previos reportados en la literatura (Tabla 3.19). La concentración de AgNP requerida para inhibir por completo el crecimiento bacteriano ha oscilado entre 3.91 y 100 mg/L para partículas con morfología esférica y diámetros menores a 50 nm. La discrepancia entre las características de los materiales y UFC/mL entre pruebas, dificulta la atribución directa del poder bactericida de las AgNP hacia alguna variable en particular propia del material, requiriéndose estudios adicionales donde la concentración de bacterias en los inóculos permanezca constante.

Tabla 3.19 Actividad antimicrobiana reportada para AgNP utilizando la cepa *S. aureus*

UFC/mL en el inóculo	MIB mg/L	Diámetro de partículas	Morfología	Referencia
50	4	5-50 nm	esférica	Mirzajani <i>et al.</i> , 2011
1x10 ⁵	100	SD	SD	Soo-Hwan <i>et al.</i> , 2011
1x10 ⁵	15	< a 50 nm	esférica	Goswami <i>et al.</i> , 2015
2.5x10 ⁵	3.91	9 nm	SD	Waddy <i>et al.</i> , 2014
1x10 ⁶	20	18-20 nm	esférica	Prusty y Parida, 2014
1x10 ⁷	20	13 nm	esférica	Yasin <i>et al.</i> , 2013
1x10 ⁸	50	4-30 nm	esférica	Singhal <i>et al.</i> , 2011
< a 667	2	4.18 ± 3.9 nm	Icosaedral romboédrica	Este trabajo

A diferencia de lo reportado por Das *et al.* (2015); Ibrahim, (2015) y Singhal *et al.* (2011), *S. aureus* presentó una mayor sensibilidad hacia las AgNP a pesar de ser una bacteria de tipo Gram (+). Durante este estudio en la sección 3.6.3 para *E. coli* (Gram -) se requirieron 15 mg/L para inhibir una concentración bacteriana de entre 460 y 860 UFC/mL, mientras con *S. aureus*, 10 mg/L eliminaron el 100% de la cuenta inicial (notablemente superior incontable en placa) y 2 mg/L la presencia de al menos 667 UFC/mL.

La sensibilidad que presentan ambos grupos de bacterias hacia las AgNP, ha sido atribuida a las diferencias estructurales en su pared celular externa, por la presencia de lipopolisacáridos y por la composición peptidoglicano entre bacterias (Wang *et al.*, 2015; Paredes *et al.*, 2014). Ambos factores influyen directamente en la permeabilidad de la pared celular de acuerdo a los siguientes mecanismos:

a) en las bacterias Gram (-), los lipopolisacáridos son el principal componente de la membrana exterior, sin embargo la presencia de lípidos -por su carácter hidrofóbico- actúa como una barrera hacia muchos antibióticos y factores de defensa del huésped (Wang *et al.*, 2015); mientras que en las bacterias Gram (+) que carecen de este componente, se favorece el ingreso de las AgNP al interior de las células incrementando su efecto bactericida.

b) las AgNP se acumulan en la fracción peptidoglicano - un componente específico en la pared celular de las bacterias- y la liberación de iones es más eficiente entre capas subyacentes. El espesor de este componente en las bacterias Gram (+) llega a alcanzar los 30 nm, mientras en las Gram (-) oscila entre 2-3 nm y este fenómeno ocasiona que la liberación de iones sea más eficiente en bacterias como *S. aureus* (Ibrahim, 2015; Paredes *et al.*, 2014; Mirzajani *et al.*, 2011).

3.6.9 Comparación entre agentes microbianos de plata

Considerando la MIB determinada en 3.6.8, se prepararon soluciones con 1, 2, 5, 10 y 20 mg/L de plata a partir de los 4 agentes probados para *E. coli* y se pusieron en contacto con el inóculo de la dilución 1×10^{-1} durante 20 minutos. Después del periodo de incubación, el número de colonias contabilizadas se presentan en la Tabla 3.20 a) y su réplica en b).

Tabla 3.20 UFC/mL y concentraciones de AgNP en la determinación de MIB con solución comercial de plata ionizada-SCOM, nitrato de plata- AgNO_3 , nanopartículas de plata-AgNP y la suspensión de AgNP -SUSP, para *S.aureus* a partir de una cuenta inicial de UFC/mL incontable

a) Concentración (mg/L)						b) Concentración (mg/L)					
AGENTE	1	2	5	10	20	AGENTE	1	2	5	10	20
SCOM	27	15	0	0	0	SCOM	363	206	0	0	0
AgNO ₃	323	0	0	0	0	AgNO ₃	327	0	0	0	0
AgNP	221	65	0	0	0	AgNP	522	2	2	0	0
SUSP	1	0	0	0	0	SUSP	16	0	0	0	0

La inhibición en el crecimiento de *S. aureus*, fue evidente desde 1 mg/L (Figura 3.57). A esta concentración, todos los agentes lograron reducir al menos el 90% de la cuenta inicial en las placas. Sin embargo, el efecto fue más evidente en la suspensión de AgNP que redujo en 99.79% la cuenta inicial, además, la especie de plata presente en los agentes antimicrobianos influyó directamente con su poder bactericida.

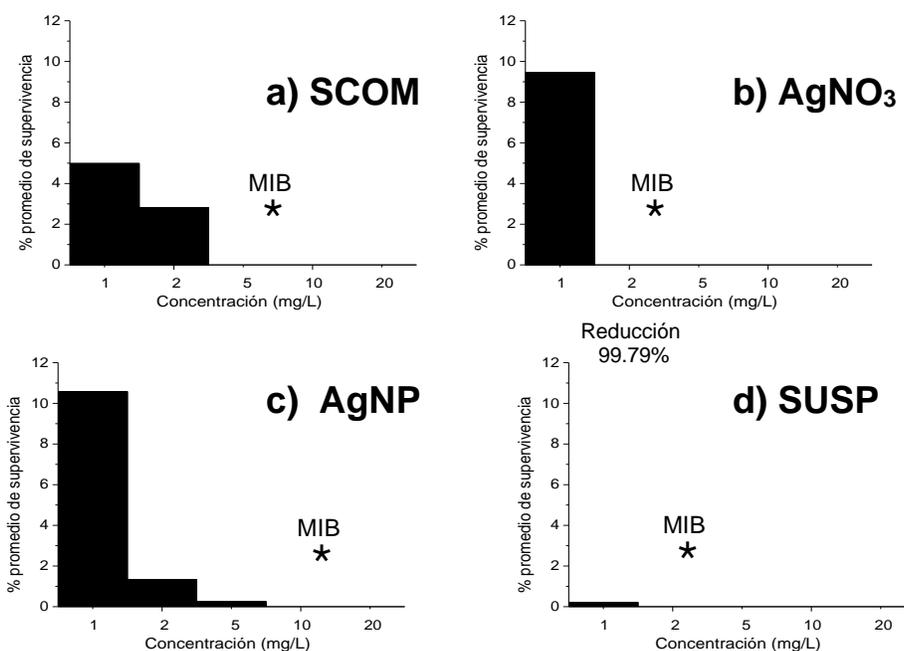


Figura 3.57 Porcentaje de supervivencia de *S. aureus* al aplicando: a) solución comercial de plata ionizada-SCOM, b) nitrato de plata- AgNO₃, c) nanopartículas de plata-AgNP en polvo y d) suspensión de AgNP-SUSP, en el rango de 1 a 20 mg/L.. Concentración del inóculo 1×10^{-1} UFC/mL.

a), inhibiendo por completo al dosificar 5mg/L, mientras que con la solución de AgNO_3 (Figura 3.57 b) se requirieron únicamente 2 mg/L para lograr el mismo efecto. Al aplicar las AgNP (Figura 3.57 c), se observa que el porcentaje de supervivencia disminuyó al incrementar la concentración hasta 10 mg/L, donde se eliminó por completo la presencia de *S. aureus* y este valor fue consistente con lo reportado en la sección 3.6.8 a pesar de la diferencia en las cuentas iniciales.

Los mejores resultados durante la prueba se obtuvieron al utilizar la suspensión de nanopartículas (Figura 3.57 d) que de acuerdo a la Tabla 3.8, contiene 15.41% de Ag^+ y 84.59% de Ag^0 , eliminando la totalidad de bacterias a partir de 2 mg/L. Este comportamiento fue consistente con el presentado por *E. coli* en la sección 3.6.4, demostrando que la combinación entre Ag^+ y Ag^0 supera el efecto producido de cada especie de plata por separado.

Todos los agentes probados presentaron una influencia positiva en la eliminación de *S. aureus*; sin embargo, la presencia de Ag^+ en SCOM, AgNO_3 y SUSP influyó directamente en que la dosis requerida contra las bacterias fuera menor en comparación con las AgNP. Por otra parte, se ha reportado que las propiedades antibacteriales de los iones de plata pueden ser modificadas al aplicarse en forma de nanopartículas por los fenómenos de superficie que éstas ofrecen (Salomoni *et al.*, 2015; Chudobova *et al.*, 2013), lo cual puede explicar el incremento en el poder biocida de la suspensión de nanopartículas donde conviven ambas especies de plata. La Figura 3.57 d) reflejó la superioridad de este agente en comparación con el AgNO_3 ; en ambos agentes 2 mg/L inhibieron por completo el crecimiento de *S. aureus*, sin embargo en la suspensión desde 1 mg/L se eliminó el 99.79% de la cuenta inicial.

La aplicación de iones metálicos o nanopartículas en combinación con otras sustancias es considerada la siguiente etapa para incrementar la actividad antimicrobiana de estos materiales, misma que se puede mejorar a través de estabilizadores y surfactantes que favorezcan la permeabilidad de la pared celular de las bacterias (Chudobova *et al.*, 2013; In-Sok *et al.*, 2012). Con los resultados

obtenidos en este estudio, se presenta a las AgNP sintetizadas por bioreducción como materiales potenciales para ser considerados en pruebas microbidas y continuar en su desarrollo para la fabricación de productos que contribuyan en la eliminación de patógenos.

3.6.10 Crecimiento bacteriano en presencia de AgNP en polvo

S. aureus presentó una cinética típica de crecimiento bacteriano (Figura 3.58) donde la presencia de AgNP influyó en la concentración de células/mililitro a través del tiempo. Este comportamiento se evidenció desde 15 mg/L con una notable disminución respecto al control, hasta que en 50 mg/L se inhibió completamente el crecimiento.

En la cinéticas obtenidas con 50 y 100 mg/L de AgNP, no se observó el cambio en la pendiente de las curvas que correspondería a la fase de crecimiento exponencial, lo cual indica que la muerte de las células ocurrió desde la fase estacionaria (Paredes *et al.*, 2014), de esta forma la concentración de bacterias permaneció constante.

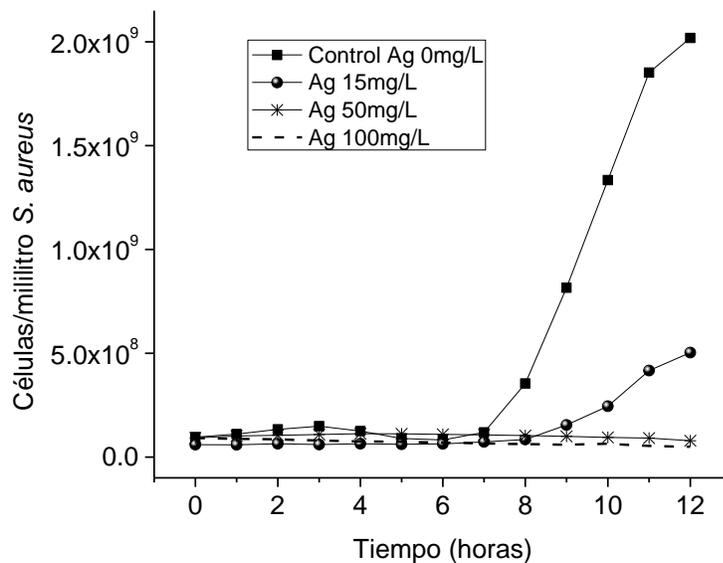


Figura 3.58 Curva de crecimiento de *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de AgNP

A través de las cinéticas de crecimiento realizadas para *S. aureus* y *E. coli* (en la sección 3.6.5), se evidenció que el desempeño de las nanopartículas fue superior al estar en contacto con *S. aureus*, ya que como se observó al presentarse una menor concentración de células/mililitro al aplicar la misma dosis de AgNP. Además con 50 mg/L, *S. aureus* presentó la inhibición total del crecimiento, que con *E. coli* no se alcanzó incluso con 100 mg/L.

3.6.11 Influencia del extracto de *E. crassipes* como agente microbicida

Debido a que la presencia de fitoquímicos en las plantas utilizadas como agente reductor se ha asociado con el posible incremento en la actividad bactericida de las AgNP (Ahmed *et al.*, 2016; Moyo *et al.*, 2015), en este estudio se puso en contacto 1 mL del extracto del lirio (cuya concentración de fenoles totales se encontró en el rango de 6.4 - 8 mg/L) con los inóculos obtenidos en las secciones 3.6.2 y 3.6.7 para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

Tabla 3.21 UFC/mL antes y después de aplicar el extracto de *E. crassipes* sobre *E. coli* y *S. aureus* (Inc.-Incontable)

Bacteria	UFC/mL Antes del extracto	UFC/mL Después del extracto
<i>E. coli</i>	761	Inc.
<i>S. aureus</i>	Inc.	Inc.

En la Tabla 3.21, se observó que lejos de tener efecto bactericida, el extracto del lirio aportó una carga adicional de microorganismos a las UFC/mL iniciales en cada inóculo y la concentración de polifenoles en el extracto no fue suficiente para ejercer un efecto bactericida ante ambos microorganismos, a pesar de que *E. coli* fue la más susceptible durante las pruebas con AgNP.

CONCLUSIONES

En este estudio, se probó exitosamente la hipótesis de que las nanopartículas de plata sintetizadas utilizando los taninos del lirio acuático como agente reductor, presentan actividad microbicida favorable.

La presencia de polifenoles en la estructura de *Eichhornia crassipes*, antepuso su función como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata y el contenido de TH en cada sección del lirio influyó directamente en la disponibilidad de moléculas para reaccionar con los iones Ag^+ del AgNO_3 y obtener una mayor producción de AgNP.

El contenido de TH influyó en la conversión de iones Ag^+ de la solución de AgNO_3 a Ag^0 , ya que los porcentajes más elevados de nanopartículas se obtienen al utilizar las secciones verdes del lirio.

La mayor concentración de compuestos fenólicos reductores en hojas y tallos, favoreció la formación de nanopartículas con morfologías poliédricas que incluyeron diferentes sistemas cristalinos (trigonal, cúbico y hexagonal); mientras que al utilizar las raíces con menor contenido fenólico predominó una morfología esférica sistema cristalino cúbico

El pH utilizado durante la síntesis, influye en el tamaño de las AgNP sintetizadas, debido a que a pH ácido ocurre un incremento en la concentración de protones y esto reduce la habilidad de oxidar los electrones, ocasionando que la velocidad de reemplazar los electrones presentes en los taninos del lirio disminuya, incrementando el tamaño de partícula por la colisión entre partículas más pequeñas.

Únicamente las AgNP sintetizadas a pH básico pueden separarse de la suspensión original mediante centrifugación y pueden deshidratarse para obtener el material en polvo.

El proceso de centrifugación no es capaz de recuperar el 100% de las AgNP obtenidas después de la síntesis y el rendimiento es proporcional al diámetro de partícula obtenido, es decir, entre mayor sea el diámetro de las nanopartículas la recuperación será mayor, mientras que entre mayor sea la presencia de AgNP en escala de puntos cuánticos la recuperación del material será menor.

El efecto microbici da de las AgNP depende de la concentración inicial de células, el tipo de bacteria utilizada, y el diámetro de las partículas separadas en el proceso de centrifugación, además es proporcional a la dosis de AgNP aplicada.

S. aureus fue más sensible a los efectos de las AgNP en comparación con *E. coli*. La mínima cantidad requerida para inhibir el crecimiento en inóculos de *E. coli* en el rango de 400 a 850 UFC/mL es de 15 mg/L, mientras 2 mg/L inhiben una concentración menor 667 UFC/mL de *S. aureus*.

Las suspensiones de AgNP fueron el agente microbici da más efectivo durante este estudio superando los efectos de las AgNP en polvo y las sustancias a base de Ag⁺, debido a la presencia de las nanopartículas < a 10 nm que no fueron separadas por centrifugación, con lo cual el poder bacterici da se incrementó y la dosis de plata requerida fue menor.

La concentración de fenoles totales contenida en el extracto de *Eichhonia crassipes*, no presentó actividad microbici da favorable frente a las cepas de *E. coli* y *S. aureus*, además aporta una carga adicional de microorganismos al medio si es aplicada en la ausencia de AgNP.

REFERENCIAS

Ahmad N. y Sharma S. (2012). "Green synthesis of Silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*". *Green and Sustainable Chemistry*, Vol. 2, pp. 141-147.

Ahmed S., Saifullah, Ahmad M., Swai B. y Ikram S. (2016). "Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract". *Journal of radiation research and applied sciences*, No.9, pp. 1-7.

Álvarez C. y Lock de Ugaz C. (1992). "Taninos". *Revista de Química*, Vol.6, No.1, pp. 47-63.

An J., Zhang M., Wang S. y Tang J. (2008). "Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP". *LTW*, No. 41, pp. 1100-1107.

Arapitsas P. (2012). "Hidrolizable tannin analysis in food". *Food Chemistry*, No. 135, pp. 1708-1717.

Arooj N., Dar N. y Samra Z. (2014). "Stable silver nanoparticles synthesis by *Citrus Sinensis* (Orange) and assesing activity against food poisoning microbes". *Biomedical Environmental Sciences*, Vol. 27, No. 10, pp. 815-818.

Atehortua E. y Gartner C. (2013). "Preliminary studies of *Eichhornia crassipes* dry biomass for lead and chromium removal from waters". *Revista Colombiana de Materiales*, No.4, pp. 81 – 92.

Banala R., Babu V. y Reddy P. (2015). "Green synthesis and characterization of *Carica papaya* leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties". *Saudi Journal of Biological Sciences*, No. 22, pp. 637-644.

Begum N., Mondal S., Basu S., Laskar R. y Mandal D. (2009). "Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol.71, pp. 113-118.

Bhattacharya A. y Kumar P. (2010). "Water Hyacinth as a potential biofuel Corp". *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 9, No.1, pp. 112-122.

Borker A., Mane A., Saratale D. y Pathade G. (2013). "Phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* for the treatment of cadmium in relation with biochemical and water parameters". *Journal of food agriculture*, Vol. 25, No.6, pp. 443-456.

Cabral J. (2010). "Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, No.7, pp. 3657-3703.

Carrión C., Ponce C., Cram S., Sommer I., Hernández M. y Vanegas C. (2012). "Aprovechamiento potencial del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en Xochimilco para fitorremediación de metales". *Agrociencia*, Vol. 46, pp. 609-620.

Celis B. y Yamile A. (2012). "Uropathogenic escherichia coli resistant to multiple antibiotics: a public health problem". *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, Vol. 30, pp. 74-77.

Chantirakul P., Meechai P. y NakbaNPote W. (2009). "Antioxidant Activities and phenolic contents of extracts from *Salvinia molesta* and *Eichhornia crassipes*". *Research Journal of Biological Sciences*, Vol. 10, No.4, pp. 1113-1117.

Cheng J., Xie B., Zhou J., Song W. y Cen K. (2010). "Cogeneration of H₂ and CH₄ from water hyacinth by two-step anaerobic fermentation". *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 35, pp. 3029-3035.

Chudobova D., Maskova D., Nejdil L., Kopel P., Merlos M.A. Adam V. y Kizek R. (2013). "The effect of silver ions and silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*". *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.), Vol. 1, pp. 728-735.

Das B., Dash S.K., Mandal D., Ghosh T., Chattopadhyay S., Tripathy S., Das S., Dey S.K., Das D. y Roy S. (2015). "Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damaged". *Arabian Journal of Chemistry*, disponible en: <http://dx.doi.org.10.1016/j.arabjc.2015.08.008>.

Devi L. y Joshi S. (2015). "Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi". *Journal of microscopy and ultrastructure*, No. 3, pp. 29-37.

Dhand V., Soumya L., Bharadwaj S., Chakra S., Bhatt D. y Sreedhar B. (2016). "Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity". *Materials Science and Engineering C*, No. 58, pp. 36-43.

Doll U., Rodríguez I., Soto C. y Razmilic I. (2012) "Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de *Ugni molinae* de la región del Maule (Chile)". *Bosque* 33, No. 2, pp. 203-209.

Dong C., Zhang X. y Cai H. (2014). "Green synthesis of monodisperse silver nanoparticles using hidroxyl propyl methyl cellulose". *Journal of Alloys and compounds*, Vol. 583, pp. 267-271.

Elumalai E., Prasad T., Hemachandran J., Viviyani S., Thirumalai T. y David E. (2010). "Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities". *Journal of pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 2, pp. 549-554.

Falçao L. y Araujo M. (2011). "Tannins characterization in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot test". *Journal of cultural heritage*, No.12, pp. 149-156.

Félix-Fuentes A., Campas-Baypoli O., Aguilar-Apodaca M. y Meza-Montenegro M. (2007). "Calidad microbiológica del agua de consumo humano de tres comunidades rurales de Sonora (México)". *Revista salud pública y nutrición*, Vol. 8, No. 3, Fecha de consulta 03 de Diciembre de 2015. Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/viii/3/articulos/calidad_de_agua.htm.

Flores C. (2014). "Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida". *Tesis Doctoral*, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.

Frutos P., Hervás G., Giráldez J., y Mantecón R. (2004). " Review. Tannins and ruminant nutrition". *Spanish journal of agricultural research*, No. 2. Vol. 2, pp. 191-202.

Gaillet S. y Rouanet J. (2015). "Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanism". *Food and chemical toxicology*, No. 77, pp. 58-63.

Galazzi R., de Barros-Santos E., Caurin T., de Souza-Pessôa G., Odone I. y Auréli M. (2015). "The importance of evaluating the real metal concentration in nanoparticles post-synthesis for their applications: A case-study using silver nanoparticles". *Talanta*. Fecha de consulta: 09 de Septiembre de 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.016>.

Girisuta B., Danon B., Manurung R., Janseen L. y Heeres H. (2008). "Experimental and kinetic modelling studies on the acid-catalysed hydrolysis of the water hyacinth plant to levulinic acid". *Bioresource Technology*, No. 99, pp. 8367–8375.

González A.Z.I., Ávila-Pérez P., Tejeda-Vega S., Zarazúa-Ortega G. y Longoria-Gándara L. C.(2007). "Estudio del Curso Alto del Río Lerma desde una Perspectiva Sustentable". Versión electrónica disponible en: http://www.inecc.gob.mx/descargas/cuencas/cong_nal_06/tema_05/22_zaire_gonzalez.pdf. Fecha de consulta 18 de Junio de 2016.

Goswami S.R., Sahareen T., Singh M. y Kumar S. (2015). "Role of biogenic silver nanoparticles in disruption of cell-cell adhesión in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilm". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, No. 26, pp. 73-80.

Harun M., Dayang A., Zainal Z. y Yunus R. (2011). "Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)". *Bioresource Technology*, No. 102, pp. 5193–5199.

Harmami S.B., Sondari D. y Haryono A. (2007). "The synthesis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution". *Indonesian Journal of Materials Science*, ISSN : 1411-1098, pp. 233-236.

Hernando-Granade A. (2007). "Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la física actual en lucha contra la enfermedad". *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, Vol. 101, No. 2, pp. 321-327.

Hongna L., Xiuping Z. y Jinren N. (2011). "Comparison of electrochemical method with ozonation, chlorination and monochloramination in drinking water disinfection". *Electrochimica Acta*, No. 56, pp. 9789-9796.

Hourdebaigt R., Iade J., Le Rose C. y Damonte D. (2007). "Estudio comparativo de taninos de tara, mimosa y pino como recurtientes". *INN TEC*, No.2, pp.24-27.

Ibrahim H. (2015). "Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms". *Journal of Radiation research*. No. 8, pp. 265-275.

In-Sok H., Ji H., Hyemin C., Keuk-Jun K. y Dong G. (2012). " Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanism involved". *Journal of Medical Microbiology*, No. 61, pp.1719-1726.

Isaza J., Veloza L., Ramírez L. y Guevara C. (2007). "Estimación espectrofotométrica de taninos hidrolizables y condensados en las plantas Melastomatáceas". *Scientia et Technica*, No. 33, pp. 261-267.

Ivask A., ElBadawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H., Ji Z., Hyun C., Liu R., Tolaymat T., Telesca D., Zink J., Cohem Y., Holden P. y Godwin H. (2014). "Toxicity mechanism in *Escherichia coli* vary from silver nanoparticles and differ from ionic silver". *American chemical society*, Vol. 8, No.1, pp. 374-386.

Jannathul M. y Lalitha P. (2013). "Phyto-mediated synthesis of Gold Nanoparticles using the aqueous extract of *Eichhornia* (Mart.) SOLMS". *BioMedRx*, Vol.1, No.5, pp. 558-562.

Jena J., Pradhan N., Prasad B., Kumar P. y Kanta B. (2015). "Pigment mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles using diatom *Amphora* sp. and its antimicrobial activity". *Journal of Saudi Chemical Society*, No. 16, pp. 661-666.

Kasay M.I., Huamán J. y Guerrero M. (2013). "Estudio cualitativo y cuantitativo de taninos de la *Oenothera Roseal L'hér. Exaiton*". *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, Vol. 16, No. 1, pp. 13-19.

Khlalil M., Ismail E., El-Baghdady K. y Mohamed D. (2014). "Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity". *Arabian Journal of Chemistry*, No. 7, pp.1131-1139.

Khloud M., Abou El., Eftaiha A., Abdulrhman A. y Reda A. (2010). "Synthesis and applications of silver nanoparticles". *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 3, pp. 135-140.

Khoddami A., Meredith A. y Roberts T. (2013). "Techniques for analysis of plant phenolic compounds". *Molecules*, No.18, pp. 2328-2375.

Kim S., Eun J., Choi J., Chung K., Park K. y Yi J. (2009). "Oxidative stress-depend toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells". *Toxicology in vitro*, No. 23, pp. 1076-1084.

Kiruba D., Nehru K. y Sivakumar M. (2012). "Rapid Biosynthesis of silver Nanoparticles using *Eichhornia crassipes* and its Antibacterial Activity". *Current nanoscience*, Vol. 8, pp. 125-129.

Koberkandi H., Asgharu G., Sadat S., Sadat M. y Bandegani M. (2012). "Nanosilver Particle Production Using *Juglans Regia L.* (Walnut) Leaf extract". *Journal of natural pharmaceutical products*, Vol. 8, No. 1, pp. 6-20.

Kon K. y Rai M. (2013). "Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors". *Journal of Comparative Clinical Pathology Research*, Vol. 2, No.1, pp. 160-174.

Kvítek L., Panáček A., Soukupova J., Kolář M., Večeřová R., Pruček R., Holecová M. y Zbořil R. (2008). "Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles". *The journal of physical chemistry C*, No. 112, pp. 5825-5834.

Latitha A, Subbaiya R. y Ponmurugan P. (2013). "Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract *Azadirachta indica* and to study its anti-bacterial and antioxidant property". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Vol. 2, No.6, pp. 228-235.

Li D., Liu Z., Yuan Y., Liu Y. y Niu F. (2015). "Green synthesis of Gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells". *Processes Biochemistry*, No. 50, pp. 357-366.

Logeswari P., Silambarasan S. y Abraham J. (2013). "Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties". *Scientia Iranica*, Vol. 20, No. 3, pp. 1049-1054.

López-Lorente A. y Valcárcel M. (2016). "The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: Involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process". *Trends in Analytical Chemistry*, No. 75, pp. 1-9.

Maiti S., Krishnan D., Barman G., Kumar S. y Konar J. (2014). "Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from *Lycopersicon esculentum* extract". *Journal of analytical science and technology*, Vol. 5, No. 40, pp. 1-7.

Martínez-Ramírez A., Contreras Esquivel J.C. y Belares-Cerda R. (2010). "Extracción de polifenoles asistida por microondas a partir de *Punica granatum L.*". *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, Vol. 2, No.4, pp. 1-5.

Medini F., Fellah H., Ksouri R. y Abdelly C. (2014). "Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organ extracts of

shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah university for science*, No. 8, pp. 216-224.

Mirzajani F., Ghassempour A., Aliahmadi A. y Esmaeili M.A. (2011). "Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*". *Research in Microbiology*, No. 162, No. 5, pp. 542-549.

Mishima D., Kuniki M., Sei K., Soda S., Ike M. y Fujita M. (2008). "Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and waterlettuce (*Pistia stratiotes* L.)". *Bioresource of Technology*, No. 99, pp. 2495–2500.

Morones J., Elechiguerra J., Camacho A., Holt K., Kouri J., Tapia J. y Yacaman M. (2005). "The bactericidal effect of silver nanoparticles". *Nanotechnology*, No. 16, pp. 2346-2353.

Moyo M., Gomba M. Y Nharingo T. (2015). "Afzelia quanzensis bark extract for green synthesis of silver nanoparticles and study of their antibacterial activity". *International Journal of Industrial Chemistry*, Vol. 6, No. 4, pp. 329-338.

Munive-Olarte A. (2014). "Ag nanoparticles biosynthesis using water hyacinth (*Eichnornia crassipes*) as reductant agent". Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.

Murugan K., Senthilkumar B., Senbagam D. y Al-Sobahibani S. (2014). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Acacia leucophloea* extract and their antibacterial activity". *International Journal of nanomedicine*, No. 9, pp. 2431–2438.

Navarro E. Piccapietra B., Marconi F., Kaegi R. Odzak N., Sigg L. y Behra R. (2008). Toxicity of Silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, Vol. 42, No. 23, pp. 8959-8964.

Nigam J.N. (2002). "Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast". *Journal of Biotechnology*, No. 97, pp. 107–116.

Nowack B., Krug H. y Murray H. (2011). "120 Years of nanosilver History: Implications for Policy Makers". *Environmental Science and Technology*. Vol. 45, pp. 1177-1183.

Okuda T. y Ito H (2011). "Tannins of constant structure in medicinal and food plants- Hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins". *Molecules*, No. 16, pp. 2191-2217.

Olivas-Aguirre F.C., Wall-Medrano A., González-Aguilar G., López-Díaz A.A., Alvarez-Parrilla E., de la Rosa L. y Ramos-Jiménez A. (2015). "Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud". *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 31, No.1, pp. 55-66.

Padalia H., Moteriya P. y Chanda S. (2015). "Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential". *Arabian Journal of Chemistry*, No. 8, pp. 732-741.

Pal S., Kyung Y. y Myong J. (2007). "Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? a study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 6, pp. 1712-1720.

Palici I. Tița B., Urșica L. y Tița D. (2005). "Method for quantitative determination of polyphenolic compounds and tannins from vegetal products". *Acta Universitatis Cibiniensis Seria F Chemia*, No. 8, pp. 21-32.

Panimathy A. (2011). "Comparative estimation of percentage of anticancer and antiageing antioxidants isolated from various tea samples". *International Journal on Applied Bioengineering*, Vol. 5, No. 1, pp. 30-34.

Paredes D., Ortiz C. y Torres R. (2014). "Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *E. coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 9, pp. 1717-1729.

Paul B., Bhuyan B., Purkayastha D. y Sankar S. (2015). "Green synthesis of silver nanoparticles using dried biomass of *Diplazium esculentum* (retz.) sw. and studies of their photocatalytic and anticoagulative activities". *Journal of Molecular Liquids*, No. 212, pp. 813-817.

Prabhu S. y Poulouse K. (2012). "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects". *International Nano letters*, Vol. 2, No. 32, pp. 1-10.

Prusty A. y Parida P. (2014). "Green synthesis of silver nanoparticles using *Eichhornia* and study of *in-vitro* antimicrobial activity". *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, Vol. 3, No. 6, pp. 504-509.

Raffi M., Hussain F., Bhatti T., Akhter J., Hameed A. y Hasan M. (2008). "Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224". *Journal of materials science and technology*, Vol. 24, No.2, pp. 192-197.

Rahim K.A. y Mohamed A.M. (2015). "Bactericidal and antibiotic synergistic effect of nanosilver against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Jundishapur Journal of Microbiology*, Vol.8, No.11, pp.1-6.

Rai M., Yadav A. y Gade A. (2009). "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials". *Biotechnology Advances*, No. 27, pp. 76-83.

Ramírez-Castillo F.Y., Loera-Muro A., Jaques M., Garneau P., Avelar-González F.J., Harel J. y Guerrero-Barrera A. L. (2015). "Waterborne pathogens: detection methods and challenges". *Pathogens*, No. 4, pp. 307-334.

Rehab M. y Abuelmagd M. (2014). "Rapid Green Synthesis of Metal Nanoparticles using Pomegranate Polyphenols". *International journal of Sciences: basic and applied research*, Vol. 15, No. 1, pp. 57-65.

Rey-Fraile I. (2012). "Identificación forense de especies silvestres". *Sociedad Española de Bioquímica y biología molecular divulgación*, pp. 1-2.

Rodríguez-León E., Iñiguez-Palomares R., Navarro R., Herrera-Urbina R., Tánori J., Iñiguez-Palomares C. y Maldonado A. (2013). "Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts)". *Nanoscale Research Letters*, Vol. 8, No. 318, pp. 1-9.

Rosano-Ortega G. (2009). "Síntesis de nanopartículas metálicas mediante un proceso autosustentado". *Tesis Doctoral*, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

Roy K., Sarkar C.K. y Ghosh C.K. (2015). "Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using parsley (*Petroselinum crispum*) leaf extract: spectral analysis of the particles and antibacterial study". *Applied Nanoscience*, Vol. 5, No. 8, pp. 945-951.

Saad H., Khoukh A., Ayed N., Charrier B., Charrier F. y Bouhtoury E. (2014). "Characterization of tunisian Aleppo pine tannins for a potential use in wood adhesive formulation". *Industrial Crops and Products*, No. 61, pp. 517-525.

Sadowski Z., Maliiszewska I.H., Grochowalska B., Polowczyk I., y Kozlecki T. (2008). "Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms". *Material Science-Poland*, Vol. 26, No. 2, pp. 419-424.

Salomoni R., Léo P. y Rodriguez M.F.A. (2015). "Antibacterial activity if silver nanoparticles (AgNPs) in *Staphylococcus aureus* and citotoxicity effect in mamalian cells". *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, pp. 851-856.

Sankar K., Iniyan E., Sanjeev K. y Venugopal S. (2009). "A Green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds". *Current Science*, Vol.97, No. 7, pp. 1055-1059.

Shankar S., Absar A. y Murali S. (2003). "Geranium leaf assisted biosynthesis of silver Nanoparticles". *Biotechnology Progress*, Vol.19, pp. 1627-1631.

Sharma S., Kumar S., Bulchandini B., Taneja S. y Banyal S. (2013). "Green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria". *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, Vol. 4, No. 7, pp. 711-714.

Sifontes A. Melo L., Maza C., Mendes J y Mediavilla M. (2010). "Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes". *Quim Nova*, Vol. 33, No. 6, pp. 1266-1269.

Singh K., Panghal M., Kadyan S. y Yadav J.P. (2014). "Evaluation of Antimicrobial Activity of Synthesized Silver Nanoparticles using *Phyllanthus amarus* and

Tinospora cordifolia Medicinal Plants”. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, Vol 5., No.6, pp. 1-5.

Singhal G., Bhavesh R., Kasariya K., Sharma A.R. y Singh R. (2011). “Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity”. *Journal of Nanoparticles Research*, No. 13, pp. 2981-2988.

Sondi I. y Salopek-Sondi B. (2004). “Silver nanoparticle as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria”. *Journal of colloid and interface science*, No. 275, pp. 177-182.

Sondi I., Goia D. y Matijević E. (2003). “Preparation of highly concentrated stable dispersion of uniform silver nanoparticles”. *Journal of colloid and interface science* 260, No. 260, pp. 75-81.

Soo-Hwan K., Hyeong L., Deok R., Soo. J. y Dong S. (2011). “Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*”. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 39, No. 1 pp. 77-85.

Subhabrata D., Gangly A. y Apurba D. (2014). “Characterization of water hyacinth biomass and microbial degradation of the biomass under solid state fermentation using a lignocellulolytic fungus (*Alternaria Spp* NITDS1)”. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, Vol. 4, No. 3, pp. 2279-2293.

Tan A., Chawla R., Mahdibeiraghdar S., Jeyaraj R., Rajadas J., Hamblin M. y Seifalian A. (2015). Nanotechnology and regenerative therapeutics in plastic surgery: the next frontier. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic Surger*, No. 20, pp. 1-13.

Thombre R., Chitnis A., Kadam V., Bogawat Y., Colaco R. y Kale A. (2014). "A Facile method for synthesis of biostabilized silver nanoparticles using *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth)". *Indian journal of biotechnology*. Vol. 13, pp. 337-341.

Tien D., Tseng K., Liao C., Huang J. y Tsung T. (2008). "Discovery of ionic silver in silver suspension fabricated by arc discharge method". *Journal of alloys compounds*, No. 463, pp. 408-411.

Tondi G. y Petutschnigg A. (2014). "Middle infrared (ATR FT-MIR) characterization of industrial tannin extracts". *Industrial Crops and Products*, Fecha de consulta 02 de Marzo de 2015. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.005>.

Vázquez A., Álvarez E., López J. y Medrano A. (2012). "Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo". *Tecnociencia*, Vol. 6, No. 2, pp. 84-93.

Velusamy P., das J., Pachaiappan R., Vaseeharan B. y Pandian K. (2015). "Greener approach for synthesis of antibacterial silver nanoparticles using aqueous solution of neem gum *azadirachta indica L*". *Industrial crops and products*, No. 66, pp. 103-109.

Vilchis A., Sánchez V., Camacho M., Gómez R., Camacho M. y Arenas J. (2008). "Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract". *Materials Letters*, Vol. 62, pp. 3103-3105.

Wady A.F., Machado A.L., Foggi C.C., Zamperini C.A., Zucolotto V., Moffa E.B. y Vergani C.E. (2014). "Effect of silver nanoparticles solution on *Staphylococcus aureus* and *Candida spp*". *Journal of nanomaterials*, Vol. 2014, pp. 1-7.

Wang Z., Wang J., Ren G., Li Y. y Wang X. (2015). "Influence of Core Oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of *Escherichia coli*". *Marine drugs*, Vol. 13, pp. 3325-3339.

Wen-Ru L., Xiao-Bao X., Qing-Shan S., Hai-Yan Z., You-Sheng O. y Yi-Ben C. (2010). "Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*". *Applied microbial and cell physiology*, No. 85, pp. 1115-1122.

Yasin S., Lin L. y Juming Y. (2013) "Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo leaves extract and their antimicrobial activity". *Journal of fiber Bioengineering and Informatics*, Vol. 6, No. 1, pp. 77-84.