

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Posgrado en Nanotecnología

Tesis

SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y

PLATA

Que para obtener el grado de
Doctor en Nanotecnología

Presenta:

Alejandra López Millán

1942

Director de Tesis:

Dr. Jesús Armando Lucero Acuña

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Votos Aprobatorios

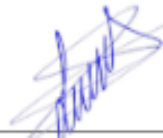

DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS

Coordinador de posgrado en Nanotecnología

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Doctorado titulada: "**Síntesis Verde de Nanopartículas de Oro y Plata**", presentada por:

ALEJANDRA LÓPEZ MILLÁN

La han revisado y cada uno de los integrantes da su VOTO APROBATORIO ya que cumple con los requisitos para la obtención de Título de Doctor en Nanotecnología.

18-junio-2021	
Fecha	DR. JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA
Fecha	DR. MARCELINO BARBOZA FLORES
18-junio-2021	<i>Adriana Garibay E.-</i>
Fecha	DRA. ADRIANA GARIBAY ESCOBAR
18-junio-2021	
Fecha	DR. ROSALÍO ELÍAS LÓPEZ ONOFRE
Fecha	<i>Roberto Guzmán</i>
Fecha	DR. ROBERTO GUZMÁN ZAMUDIO (EXTERNO)

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Enrique Álvarez, coordinador del posgrado en Nanotecnología, por su invaluable apoyo durante el transcurso de estos 4 años.

A todos los doctores y doctoras, por las enseñanzas, los momentos de trabajo y toda la ayuda brindada, esto no habría sido posible todos ustedes.

“Donde la naturaleza termina de producir sus propias especies, los hombres comienzan, usando cosas naturales y con la ayuda de esta naturaleza, a crear una infinidad de nuevas especies”.

Leonardo Da Vinci

Dedicatoria

A mi familia por haber sido mi apoyo durante toda mi formación profesional.

A mi hijo Iker con esos hermosos ojos azules color de cielo gracias por ser ese ser de luz que hace maravillosos mis días.

Tabla de Contenido

Votos Aprobatorios.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	x
CAPITULO I.....	1
Introducción.....	1
Nanociencia y nanotecnología.....	1
La cadena de valor en la industria nanotecnológica.....	2
Nanotecnología e industria. Del contexto mundial a México.....	2
Nanopartículas. Generalidades.....	5
Nanopartículas metálicas de oro.....	7
Mecanismos de reacción para la formación de nanopartículas de oro.....	9
Método de formación con citrato.....	9
Nanopartículas metálicas de plata.....	9
Mecanismo de reacción para la formación de nanopartículas de plata.....	11
Nanopartículas metálicas por métodos de síntesis biológicos.....	11
Síntesis verde de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas.....	12
Mecanismo de reacción de síntesis de nanopartículas con extractos.....	14
Cambio de fase.....	16
Técnicas de caracterización.....	18
Dispersión dinámica de Luz.....	18
Potencial zeta.....	19
Microscopía.....	20
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	20
Espectroscopia de Ultravioleta-visible.....	21
Transformada de Fourier para infrarrojo (FT-IR).....	22

Objetivos Generales y Específicos	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
CAPITULO II	24
Transferencia en fase acuosa-orgánica de nanopartículas de oro y plata usando ácido oleico modificado con tiol.....	24
Introducción	24
Materiales y métodos.....	25
Materiales.....	25
Preparación de ácido oleico tiolado (OAS).....	25
Preparación de nanopartículas de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs).....	26
Transferencia de fase acuosa-orgánica de AuNPs y AgNPs	27
Caracterización	27
Resultados.....	28
Preparación de ácido oleico terminado en tiol (OAS).....	28
Síntesis de nanopartículas de oro y plata	31
Transferencia de fase acuosa-orgánica de AuNPs y AgNPs	32
Conclusiones	37
CAPITULO III	38
Síntesis verde de nanopartículas de oro y plata con extracto acuoso de hojas de <i>Parkinsonia florida</i>	38
Introducción	38
Materiales y métodos.....	42
Materiales.....	42
Preparación de extracto de hojas de <i>Parkinsonia florida</i>	42
Análisis fitoquímico del extracto de <i>P. florida</i>	43
Ensayo de eliminación de radicales sin DPPH.....	43

Síntesis de nanopartículas de plata	44
Síntesis de nanopartículas de oro	44
Estudio de repetibilidad	44
Caracterización de las nanopartículas metálicas	45
Actividad antibacterial de las nanopartículas de plata.....	45
Resultados y Discusión	46
Evaluación fitoquímica del extracto de hojas de <i>Parkinsonia florida</i>	46
Análisis de FT-IR del extracto de <i>P. florida</i> y las nanopartículas metálicas ...	48
Caracterización de nanopartículas	49
Potencial zeta.....	57
Actividad antimicrobiana.	59
Conclusiones	62
CAPITULO IV	63
Conclusiones y Recomendaciones	63
CAPITULO V	64
Referencias	64

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1.1 Diagrama de cadena de valor de la nanotecnología.....	3
Figura 1.2 Esquema general de formación de nanopartículas metálicas por reducción y estabilización con un extracto acuoso de una planta.....	13
Figura 1.3 Representación esquemática de los metabolitos primarios y secundarios más abundantes de las plantas	14
Figura 2.1 Representación esquemática de la modificación de OA para obtener el ligando de ácido oleico con grupo terminal tiol (OAS).....	26
Figura 2.2. Espectros FT-IR de (a) OA, (b) 2-aminoetanetiol y (c) OAS....	30
Figura 2.3 (a) Espectro de RMN 1H de OAS en CDCl ₃ ; (b) Espectro 13C NMR de OAS en DCl ₃	31
Figura 2.4 Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de oro dispersas en agua; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de oro dispersas en agua (c) Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de plata en agua; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de plata en agua.....	33
Figura 2.5 (a) AuNPs antes de la transferencia de fase y (b) después de la transferencia de fase. (c) AgNPs antes de la transferencia de fase y (d) después de la transferencia de fase.....	33
Figura 2.6 (a) AuNPs. (b) AgNPs. Espectros de UV-vis normalizados de nanopartículas metálicas en solución acuosa (línea negra) y en el solvente DCM (línea discontinua roja).....	35
Figura 2.7. Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de oro en solvente orgánico; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de oro en DCM; (c) Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de plata en solvente orgánico; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de plata en DCM.....	36
Figura 2.8. Esquema de transferencia de fase para AUNPSS estabilizadas con citrato utilizando OEA.....	37
Figura 3.1. Esquema general de formación de nanopartículas metálicas por reducción y estabilización con extracto acuoso de hojas de <i>P. florida</i>	39
Figura 3.2. Metabolitos más abundantes en <i>Parkinsonia spp</i>	41
Figura 3.3 Relación logarítmica de la concentración del extracto de <i>P. florida</i> vs equivalentes Trolox.....	47
Figura 3.4. Espectro de FT-IR de extracto de <i>P. florida</i> , AuNPs y AgNPs...	49
Figura 3.5 Espectros de absorción óptica de (a) nanopartículas de oro y (b) plata sintetizadas con diferentes concentraciones en equivalentes Trolox de extracto de hojas de <i>P. florida</i>	51
Figura 3.6 Espectros experimentales de absorción (líneas negras) y resultados de ajuste Lorentziano (línea roja) para soluciones de nanopartículas preparadas a diferentes concentraciones de equivalentes Trolox (ET). a) y b) AuNPs y AgNPs respectivamente a 4.35 µg/mL ET; c) y d) AuNPs y AgNPs a 8.70 µg/mL ET; e) y f) AuNPs y AgNPs 13.05 µg/mL	

ET. g) y h) AuNPs y AgNPs a 17.40 µg/mL ET; y finalmente i) y j) AuNPs y AgNPs a 21.50 µg/mL ET.....	53
Figura 3.7 Micrografías STEM de las AuNPs formadas por reducción de iones de oro usando extracto de <i>Parkinsonia florida</i> como agente reductor, a diferentes concentraciones. a) 4.35, b) 8.71, c) 13.05, d) 17.4 y e) 21.5 ug/ml de equivalentes Trolox respectivamente.	56
Figura 3.8. Micrografías STEM de AgNPs formadas por reducción de iones de plata usando extracto de <i>Parkinsonia florida</i> como agente reductor, a diferentes concentraciones. a) 4.35, b) 8.71, c) 13.05, d) 17.4 y e) 21.5 ug/ml de equivalentes Trolox respectivamente.....	57
Figura 3.9. Valores potencial Zeta de nanopartículas metálicas preparadas con equivalentes Trolox de extracto de hoja de <i>P. florida</i> . (a) AuNPs y (b) AgNPs.....	59
Figura 3.10 Prueba de susceptibilidad microbiana de AgNPs contra <i>S. aureus</i> (a) - (d) y <i>E. coli</i> (e) - (h).....	61

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Principales universidades o centros públicos de investigación en nanomateriales en México.....	4
Tabla 1.2. Métodos comúnmente utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas	7
Tabla 3.1. Análisis fitoquímico del extracto acuoso de <i>P. florida</i>	46
Tabla 3. 2. Actividad Antioxidante del extracto acuoso de <i>P. florida</i> en equivalentes Trolox.	47
Tabla 3.3 Diámetro del tamaño de partícula de nanopartículas de oro y plata sintetizadas con extracto de hoja de <i>P. florida</i>	55
Tabla 3.4 Resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	61

CAPITULO I

Introducción

Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia es un área multidisciplinaria que estudia los fenómenos observados en estructuras y sistemas medibles en escala nanométrica e investiga las propiedades físicas, químicas o biológicas de estructuras a nivel atómico, molecular, o lo que es lo mismo, se encarga del estudio de las estructuras que tienen un tamaño de entre 1 y 100 nanómetros, convencionalmente un nanómetro se define como una mil millonésima parte de un metro (10^{-9}m). Por lo tanto, los nanomateriales deben tener en al menos una de sus dimensiones una de sus medidas dentro de esta escala [1,2]. La nanotecnología comprende el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala [3]. Estos materiales nanoestructurados son el objeto de trabajo de la nanotecnología, que comprende el diseño, la caracterización, la producción y la aplicación de estas estructuras o sistemas, mediante el control de la forma y el tamaño de la materia a escala nanométrica [2].

Durante las últimas décadas, el estudio de diferentes nanoestructuras metálicas ha experimentado un creciente interés entre los investigadores debido a las propiedades físicas y químicas únicas que poseen y a sus potenciales aplicaciones en diferentes sectores de la industria. Las nanopartículas de oro y plata, por ejemplo, poseen propiedades que son de interés para aplicaciones que van desde catalizadores, mejora de métodos diagnósticos, actividad antibacteriana y entrega de fármacos, por mencionar algunos.

El desarrollo de estos materiales trae consigo la necesidad de apoyarse de otras áreas de investigación como la ingeniería, la biología, la bioquímica, entre muchas otras, lo que convierte a este campo de investigación en un campo multidisciplinario.

La cadena de valor en la industria nanotecnológica

Una cadena de valor es un conjunto de actividades realizadas en una industria o empresa para transformar los insumos primarios en productos y servicios finales. Cada una de estas actividades aporta un valor económico al producto final; de aquí que se utilice el término cadena de valor como un conjunto interconectado de actividades útiles para aportar valor o, dicho de otra forma, una cadena de valor son los diferentes pasos por los que transita un producto, desde su diseño hasta el consumidor final.

En este contexto, Lux Research una consultora financiera en nanotecnologías, presentó en el año 2004 una propuesta para la cadena de valor en relación a la nanotecnología, donde identificó 3 diferentes etapas misma que fue años más tarde modificada por Záyago y cols. quienes propusieron una cadena de valor dividida en 4 etapas: nanoherramientas, nanomateriales, nanointermediarios, y productos nanohabilitados [4,5] (v. figura 1.1). Donde las nanoherramientas son instrumentos y equipo para manipular, visualizar, modelar materiales o componentes en nanoescala. Los nanomateriales son materias primas en la escala nanométrica con propiedades cuánticas y reactivas derivadas de su tamaño, y que han sido parcialmente procesadas. Los nanointermediarios que son productos que incorporan los nanomateriales y adquieren sus ventajas funcionales ejemplo de ellos son algunos tipos de recubrimiento, cables superconductores o pinturas. Y finalmente los productos nanohabilitados, son productos manufacturados finales que se pueden adquirir en el mercado como automóviles, teléfonos celulares o computadoras donde nanomateriales o nanointermediarios han sido incorporados.

Nanotecnología e industria. Del contexto mundial a México

La nanotecnología tuvo un surgimiento importante en la década de 1980 y el interés por incursionar en la industria nanotecnológica se incrementó de manera importante a nivel mundial. A partir del año 1990 organizaciones internacionales como el Banco Mundial (BM) han estado promoviendo la estrategia de desarrollo conocida como "economía del conocimiento", en la que el desarrollo está estrechamente relacionado con la innovación y las altas tecnologías y en este contexto la

nanotecnología se incorporó rápidamente como una de las áreas estratégicas de investigación y desarrollo [6]. En 2019 a nivel mundial, se estimó que existen aproximadamente 40 empresas con una participación realmente significativa en el desarrollo de materiales nanoestructurados [7].

Durante la década del 2010, muchos países latinoamericanos incluyeron a la nanotecnología (NT) como un área estratégica para fomentar la competitividad.

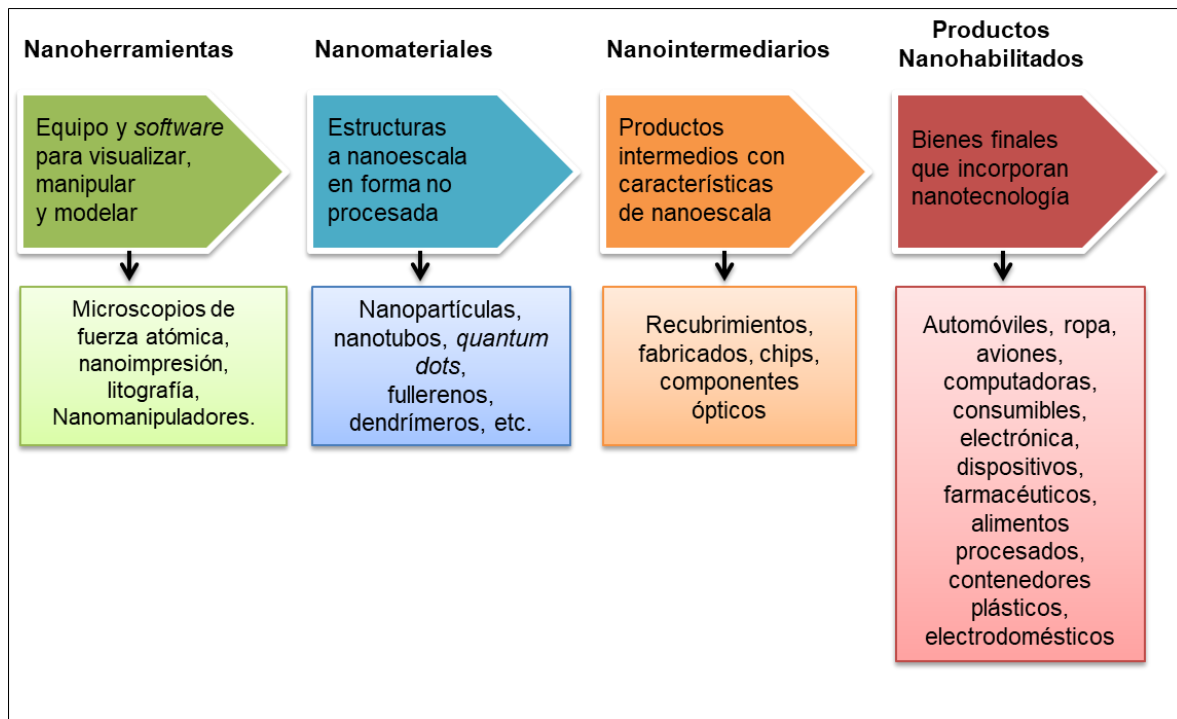


Figura 1.1. Diagrama de cadena de valor de la nanotecnología. Fuente: Adaptado de E. Záyago Lau et al. 2013

En América Latina países como México, Brasil, Argentina, Uruguay, Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela empezaron a incursionar cada vez con más fuerza en sectores industriales nanotecnológicos [8].

Durante los años 2000-2010, México implementó una política nanotecnológica y con ella vinieron avances importantes: Se creó la Red de Nanociencia y Nanotecnología (2009), se construyeron dos Laboratorios Nacionales de Nanotecnología (2007), y se desarrollaron parques de ciencia y tecnología donde estuvieran integrados las empresas, el gobierno y la academia. Para el año 2010,

diferentes programas de investigación y desarrollo nanotecnológico se llevaban a cabo en diferentes universidades o centros públicos de investigación en México, actualmente se destacan algunos de ellos con importantes áreas de investigación en nanomateriales (v. tabla 1.1).

Tabla 1.1. Principales universidades o centros públicos de investigación en nanomateriales en México.

Universidad o Centro de Investigación	Área de Investigación
Universidad Nacional Autónoma de México	Desarrollo de materiales nanoestructurados como catalizadores de mejora ambiental. Red interna de nanotecnología (regina-red de grupos de investigación en nanociencias).
CINVESTAV	Cuenta con un Laboratorio de Nanoestructuras Semiconductoras. También investigan física de nanopartículas en el campus de Mérida.
El Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT)	Estudio de las propiedades de los materiales nanoestructurados. El IPYCyT participa del consorcio NANOFORUMEULA con la Unión Europea.
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla	Destaca en el área de semiconductores. Sede de la Red Internacional de Nanociencia y Nanotecnología
Universidad Autónoma de México	Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular especializado en superficie de nanopartículas.
Universidad Autónoma de Nuevo León	Laboratorio de Nanociencias con proyectos de aplicación a la salud.
Universidad Veracruzana	Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología Especializado en sensores magnéticos.
Universidad de Sonora	Diferentes líneas de investigación en nanomateriales.

En el año 2012 el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) presentó los resultados de la primera encuesta sobre Investigación y Desarrollo Tecnológico y Módulo sobre Actividades de Biotecnología y Nanotecnología (ESIDET), donde identificó un estimado de 188 empresas trabajando con nanotecnologías en México [9]. Sin embargo, al ser sus fuentes confidenciales, no se sabe qué tipo de compañías eran las encuestadas, a qué sector de la industria pertenecían o qué producto nanotecnológico se obtenía como resultado. Un año más tarde, Záyago y Cols. publican los resultados de su primer censo sobre industria nanotecnológica en México [5], encontrando alrededor de 100 empresas distribuidas en diferentes entidades federativas, concentrándose un importante número de ellas en Nuevo León y Ciudad de México, destacando el sector de

industria química con el 17% de las empresas nanotecnológicas ubicadas en este sector. Donde además son clasificadas a partir de una cadena de valor nanotecnológica.

Tres años más tarde, en 2016, Záyago y cols., presentaron un segundo inventario de empresas nanotecnológicas en México, identificando un total de 139 empresas, con la mayor parte de estas (69% de total) ubicadas en las entidades federativas de Ciudad de México y Nuevo León. Hasta ese momento el sector de la industria química seguía siendo el sector con el mayor número de empresas nanotecnológicas [10]. El trabajo publicado por Záyago y cols., nuevamente clasificó a las empresas a partir de una cadena de valor ubicando 21 empresas en nanomateriales, 41 empresas en producción de nanointermediarios, 72 empresas en productos nanohabilitados siendo el sector de la construcción el más importante y 5 empresas ubicadas en nanoherramientas.

Nanopartículas. Generalidades

Las nanopartículas (NP's), de acuerdo con la definición estándar de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM por sus siglas en inglés), son partículas con longitudes que varían de 1 a 100 nanómetros en dos o tres dimensiones y se comportan como una unidad completa en términos de su transporte y propiedades [11].

En general, las NP's se pueden sintetizar por métodos físicos, químicos y biológicos (v. tabla 1.2). Sin embargo, los métodos físicos pueden implicar costos primarios de inversión con relación a equipo de trabajo que suelen ser muy altos, por otra parte, los métodos químicos pueden ser potencialmente peligrosos para el medio ambiente debido a que implican el uso de reactivos tóxicos, mismos productos químicos que pueden ser responsables de diversos riesgos biológicos. Por lo tanto, se necesita una forma de síntesis que reduzca la toxicidad de las nanopartículas metálicas para permitir su uso en una amplia gama de aplicaciones en la industria del sector salud y se ha sugerido que esto podría lograrse utilizando métodos biológicos [12–14].

Las técnicas que utilizan reactivos de origen natural, como extractos de plantas, hongos, azúcares, bacterias, polímeros biodegradables, entre otros, como agentes reductores y estabilizantes podrían considerarse alternativas para la síntesis de nanopartículas metálicas [15–17]. En el caso concreto de la síntesis que emplea como agentes reductores y estabilizantes extractos de plantas proporciona ventajas sobre otros métodos, ya que son reacciones de un solo paso, de bajo costo, amigables con el medio ambiente y relativamente reproducibles [18–20].

Para la síntesis química de nanopartículas por reducción y estabilización de una sal metálica, se pueden emplear solventes polares o solventes orgánicos, presentando cada entorno o solvente sus ventajas y desventajas únicas pudiendo este influir en la geometría y el tamaño de las partículas obtenidas [21–23], por ejemplo, la síntesis de nanopartículas metálicas en solventes orgánicos requiere un esfuerzo considerable para desarrollar procesos que permitan obtener un tamaño y geometría de partícula específico, el control de estos parámetros por ejemplo resulta muy importante cuando trabajamos nanoestructuras con aplicaciones biomédicas [24,25]. En este contexto, la transferencia de fase de nanopartículas permitiría tomar ventaja de la síntesis de NP's en solventes acuosos para ser posteriormente transferidas a diferentes solventes polares y de esta manera maximizar sus potenciales aplicaciones. La necesidad de utilizar estos métodos de transferencia de nanopartículas metálicas entre solventes polares y no polares radica en poder tomar ventaja del proceso de síntesis, que se traduciría en un control favorable del tamaño y la morfología de la partícula de interés. Diversos procedimientos de preparación en solventes polares o solventes orgánicos se encuentran bien descritos en la literatura [15,26].

Tabla 1.2. Métodos comúnmente utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas.

MÉTODOS COMÚNMENTE UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS		
FÍSICOS	QUÍMICOS	BIOLÓGICOS
MECÁNICOS	CO-PRECIPITACIÓN	REDUCCIÓN POR EXTRACTO DE PLANTAS
DEPÓSITO DE VAPOR	SOL GEL	MÉTODOS ENZIMÁTICOS
ELECTRODEPÓSITO	MICROEMULSIÓN	REDUCCIÓN INTRACELULAR POR BACTERIAS
TÉCNICA DE HAZ DE IONES	SÍNTESIS HIDROTERMAL	REDUCCIÓN EXTRACELULAR POR BACTERIAS
CRECIMIENTO EPITAXIAL POR HAZ MOLÉCULAR	SONOQUÍMICA	SÍNTESIS MEDIADA POR HONGOS
	REDUCCIÓN DE LA SAL METÁLICA	

Fuente: A.B. Moghaddam, F. Namvar, M. Moniri, P. Tahir, S. Azizi, R. Mohamad, Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications, *Molecules*. 20 (2015) 16540–16565. doi:10.3390/molecules200916540.

Existen numerosos protocolos con una considerable variedad de ligandos utilizados para la transferencia de fase entre diferentes solventes, la transferencia de fase de nanopartículas metálicas de solventes polares a no polares se ha llevado a cabo exitosamente utilizando líquidos iónicos, grupos hidroxilo fenólicos, ligandos tiolados, etc., [23,27–30].

Nanopartículas metálicas de oro.

Las nanopartículas metálicas son partículas que tienen al menos una de sus dimensiones dentro de la escala nanométrica. El oro coloidal, también conocido como nanopartículas de oro, es una suspensión (o coloide) de partículas de oro de

tamaño nanométrico. Estas nanopartículas tienen interesantes propiedades ópticas que se deben a su interacción única con la luz [31]. En presencia de un campo electromagnético oscilante, los electrones libres de las nanopartículas metálicas experimentan una oscilación con respecto a la red metálica [32,33]. Este proceso resuena a una frecuencia particular de la luz y se denomina plasmón de resonancia de superficie localizada (LSPR por sus siglas en inglés). Después de la absorción, el plasmón superficial se desintegra radiativamente, lo que produce dispersión de la luz o de forma no radiativa al convertir la luz absorbida en calor. Esto se puede visualizar cuando realizamos un estudio de espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis) para nanoesferas de oro con un tamaño de partícula de alrededor de 10 nm de diámetro, las cuales tienen una fuerte absorción máxima del espectro de UV-vis de alrededor de 520 nm en solución acuosa debido a su LSPR. Estas nanopartículas muestran un cambio o desplazamiento de la longitud de onda máxima de absorción a medida que se presenta un incremento de su tamaño debido a que ese incremento de tamaño genera un retraso electromagnético de la absorción cuando las partículas son más grandes. Además, las propiedades y aplicaciones de las nanopartículas de oro coloidal también dependen de su geometría [34,35].

El método utilizado más frecuentemente para la síntesis de nanopartículas de oro esféricas monodispersas fue propuesto por primera vez por Turkevich et al., en 1951 y luego refinado por Frens et al., en 1973 [36,37]. Este método utiliza la reducción química de sales de oro como el tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl_4) utilizando citrato de sodio como agente reductor. La síntesis produce nanopartículas de oro esféricas monodispersas en el rango de 10-20 nm de diámetro. Brown y Natan informaron la síntesis de nanopartículas de oro más grandes con diámetros entre 30 y 100 nm mediante la reacción de Au^{3+} e hidroxilamina [38]. Investigaciones posteriores condujeron a la modificación de la forma de estas nanopartículas de oro dando como resultado barras, primas, nanoestructuras poligonales y partículas esféricas [39–41].

Mecanismos de reacción para la formación de nanopartículas de oro.

Método de formación con citrato

El método de síntesis propuesto por Frens et al. en los años de 1970, se convirtió en uno de los métodos de síntesis más utilizados actualmente [37]. Aunque la mayoría de las reacciones que ocurren durante la formación de nanopartículas y los intermediarios formados en el proceso se conocen, algunos de los fenómenos que ocurren durante la síntesis aún no se comprenden completamente.

Brevemente, el período de reacción previo a la nucleación de las partículas de oro está asociado con la formación de productos de oxidación del citrato, como la acetona-1,3-dicarboxilato. Los iones de Au^{3+} se reducen en solución por la presencia del citrato a Au^+ , que forma un complejo multimolecular con la acetona-1,3-dicarboxilato. El complejo se desproporciona formando átomos de oro. Estos átomos adsorben Au^+ y por complejación con la acetona-1,3-dicarboxilato, forman grandes agregados. Una mayor desproporción conduce a la formación de aún mayores agregados de átomos de oro. Cuando el tamaño del agregado alcanza un valor crítico, se forma un núcleo de átomos de oro. Los átomos de oro producidos por desproporción son absorbidos por la partícula, lo que resulta en su crecimiento. El equilibrio entre la velocidad de nucleación y la degradación de la acetona-1,3-dicarboxilato es lo que determina el tamaño de partícula en el proceso de síntesis. Es esta característica la que puede explicar la dependencia inusual del tamaño medio de partícula de la relación de concentración de citrato a sal de oro. También se encuentra que la coagulación juega un papel importante en la determinación del tamaño de partícula a altas concentraciones de citrato [42,43].

Nanopartículas metálicas de plata.

Las nanopartículas de plata debido a sus propiedades químicas, físicas y biológicas, han atraído la atención de diversos investigadores académicos, propiedades como su alta conductividad térmica y eléctrica, su estabilidad química, su actividad catalítica, entre otras, las han colocado como parte de los materiales que podrían

ser utilizados en campos como la electrónica o en sectores de la industria como el sector salud [44].

Las nanopartículas metálicas de plata han sido reconocidas por sus propiedades antimicrobianas contra bacterias, hongos y virus y es debido a esta propiedad que se investigan para ser utilizadas en productos comerciales de uso diario, como plásticos, envases de alimentos, jabones y textiles, entre otros [45,46] Su importancia se puede juzgar por el hecho de que estas partículas pueden ser utilizadas en diversas formas por ejemplo, se puede incorporar a esmaltes, revestimientos y pinturas, entre muchos otros materiales [47].

Los métodos de síntesis de nanopartículas de plata más utilizados son los métodos químicos por reducción de una sal metálica, debido a la facilidad para sintetizarlos en solución con posibilidad de variar su tamaño y su morfología. Normalmente la síntesis de nanopartículas de plata por métodos químicos se basa en tres factores: el precursor de Ag, el o los agentes reductores y el agente estabilizador [48].

Junto con los métodos químicos, varias técnicas alternativas también se han desarrollado. Los métodos físicos generalmente son técnicas que tienen como inconvenientes más comunes un mayor requerimiento de energía y tiempo, aplican presión mecánica, radiaciones de alta energía, energía térmica o energía eléctrica para causar abrasión, fusión, evaporación o condensación del material para generar nanopartículas, ejemplo de ello son los métodos de evaporación y condensación o descomposición térmica. Estos métodos aunque son ventajosos ya que están libres de contaminación por solventes y producen partículas monodispersas tienen el inconveniente de ser procesos económicamente costosos [49].

Las nanopartículas de plata también presentan un plasmón de resonancia de superficie localizada que se puede visualizar cuando realizamos un estudio de espectroscopia de UV-vis para nanoesferas de plata con un tamaño de partícula de alrededor de 40 nm de diámetro, las cuales tienen una fuerte absorción máxima del espectro de Uv-vis de alrededor de 430 nm en solución acuosa debido a su LSPR [50].

Mecanismo de reacción para la formación de nanopartículas de plata

Actualmente el mecanismo de reacción para la formación de nanopartículas de plata no está claramente establecido. El mecanismo de formación de nanopartículas metálicas consta principalmente de tres etapas: reducción de iones, agrupamiento para la formación de núcleos y crecimiento de las nanopartículas. Las características de cada etapa dependen de la naturaleza del agente reductor, su concentración, la concentración de la sal metálica (AgNO_3), entre otros factores.

En términos generales el mecanismo de crecimiento se puede dividir en cuatro pasos. El paso inicial es la rápida reducción del precursor de plata. En un segundo paso, estos átomos metálicos reducidos forman dímeros, trímeros, etc. estos grupos / nanopartículas coalescen aún más hasta que las partículas adquieren cierta estabilidad lo que detiene el proceso de coalescencia. Estos dos pasos ocurren dentro de los primeros segundos del proceso de síntesis, después de lo cual las partículas tienen un tamaño de alrededor de 2 a 3 nm de radio. El tercer paso describe una fase intermedia de estabilidad en la que las partículas más grandes de 1 nm ya no están creciendo en radio. En cierto punto de la síntesis o punto de conmutación, la estabilidad coloidal disminuye abruptamente. Este cambio de estabilidad electrostática es muy probable que este correlacionado con la hidrólisis de borohidruro e induce un mayor crecimiento debido a la coalescencia y eventualmente se producen las nanopartículas. Esto comprende el cuarto y último paso de la síntesis. Después de este cuarto paso, las partículas son estables [51].

Nanopartículas metálicas por métodos de síntesis biológicos

La química verde en la síntesis de nanopartículas metálicas aborda múltiples desafíos, trabajar con procesos y productos químicos mediante la utilización de extractos obtenidos a partir de diferentes plantas, sugiere que se podrían maximizar los productos deseados y minimizar los subproductos, así como el diseño de nuevas estrategias sintéticas que simplificarían operaciones en producciones químicas y la búsqueda de solventes verdes que sean ambiental y ecológicamente benignos.

El uso de materiales eco-amigables y biodegradables en la producción de nanopartículas metálicas es importante para las aplicaciones farmacéuticas y

biomédicas, entre otras. La generación de nanopartículas con frecuencia requiere de agentes reductores químicos que pueden resultar tóxicos como el borohidruro y la hidracina de sodio respectivamente, agentes estabilizantes como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y en algunos casos de solventes orgánicos volátiles como el tolueno o el cloroformo. Aunque estos métodos pueden producir exitosamente nanopartículas metálicas puras y bien definidas, el material y los costos de producción pueden ser nocivos para la salud y el medio ambiente, por lo que es necesario desarrollar alternativas más rentables y benignas con carácter de urgencia.

Síntesis verde de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas.

Durante los últimos años numerosos trabajos reportaron en la literatura métodos de síntesis verde para la elaboración de NP's metálicas utilizando como agentes reductores y estabilizantes de partículas el empleo de extractos obtenidos de diferentes plantas [52–54], asistida por bacterias [55,56], hongos [57–59], levaduras [12,60,61], entre otros, demostrando que estos métodos resultan efectivos en la reducción de los iones metálicos con la consecuente formación de las NP's metálicas, si lo comparamos con las partículas que se obtienen por métodos de reducción química [62]. La reducción del ion metálico es posible debido a los metabolitos propios de cada organismo [63].

Sin embargo, el uso de microorganismos como bacterias u hongos requiere cuidados especiales, a veces complejos y que conllevan a numerosos pasos previos a la obtención de las moléculas o entidades de interés biológico, que además pueden resultar costosos cuando se tiene la necesidad de cultivar, aislar y crecer estos microorganismos [59].

En el caso particular de las plantas como sistema biológico empleado en la formación de nanopartículas, es posible utilizar compuestos naturales extraídos de diferentes partes de esta como son el tallo, la raíz, el fruto, las semillas, las cáscaras, las hojas y la flor [64,65]. Los extractos obtenidos a partir de ellas contienen una variedad muy amplia de metabolitos como proteínas, azúcares, aminoácidos, enzimas, aldehídos, entre otros, los cuales participan en la reducción de los iones

metálicos y su estabilización. Estas moléculas se adhieren a través de enlaces químicos o por adsorción física formando una capa protectora en la superficie de las nanopartículas metálicas, manteniéndolas estables en la solución y evitando así su agregación y precipitación [66–68]. La reacción química utilizando extractos de plantas es relativamente sencilla, una vez preparado el extracto este se adiciona a la sal metálica en solución a temperatura ambiente y la reacción se completa en algunos casos en cuestión de minutos [69–72] (v. figura 1.2, figura 1.3).

En todos los casos, se siga un protocolo de síntesis verde o no, es importante conocer la concentración de la sal metálica, las condiciones de temperatura, el pH de las soluciones y, cuando se trabaja síntesis verde a través de la obtención de extractos de plantas, es importante registrar el tiempo de recolección, la(s) parte(s) de la planta que se van a utilizar, el método de extracción de los metabolitos, entre otros parámetros [59,64,73].

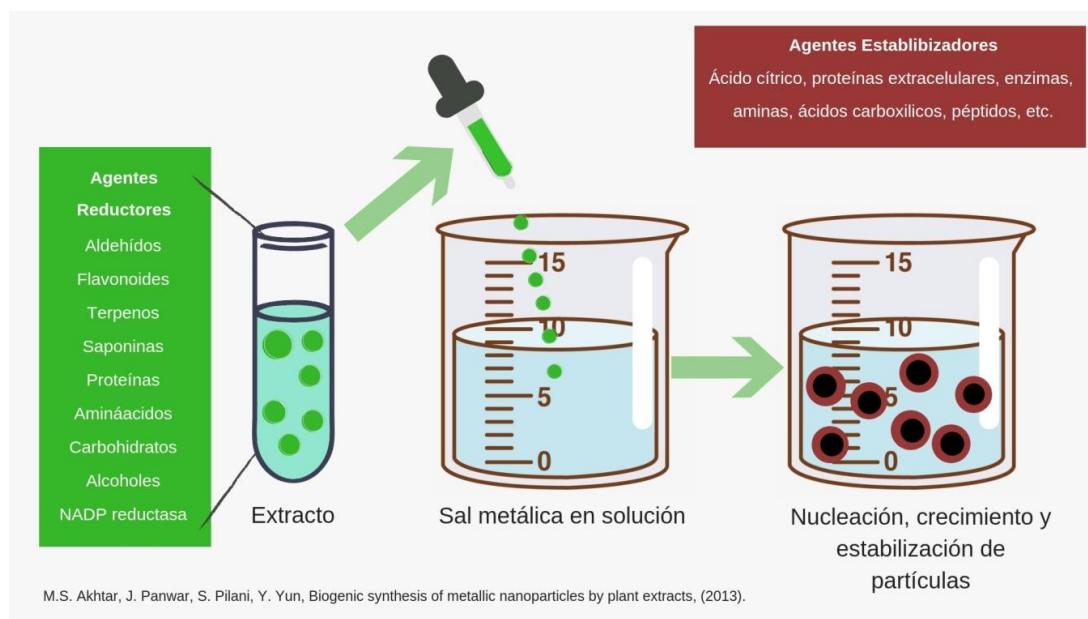


Figura 1.2 Esquema general de formación de nanopartículas metálicas por reducción y estabilización con un extracto acuoso de una planta.

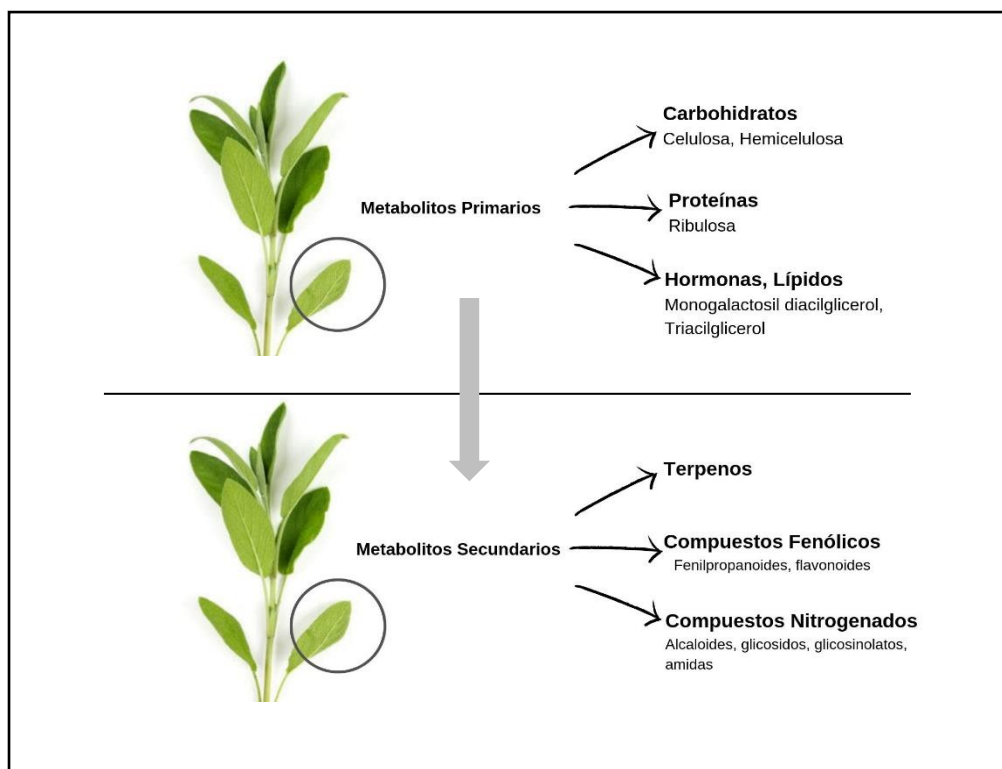


Figura 1.3 Representación esquemática de los metabolitos primarios y secundarios más abundantes de las plantas.

Mecanismo de reacción de síntesis de nanopartículas con extractos

Nanopartículas de oro

Los extractos de plantas han demostrado tener un tremendo potencial para la síntesis de AuNPs debido a sus características ecológicas, rentables y renovables. Las moléculas bioactivas presentes en estos extractos juegan un papel importante en la dirección de la eficiencia biológica y catalítica de las nanopartículas para sus diversas aplicaciones industriales [20,62]. Numerosos esfuerzos para explicar la formación de nanopartículas utilizando extractos de plantas han sido llevados a cabo por diversos investigadores; sin embargo, el mecanismo de reacción exacto aún no se ha explicado completamente debido a la naturaleza compleja de los biocompuestos implicados en la reacción.

Actualmente se sabe que las plantas que contienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos muestran una alta actividad antioxidante. Estos compuestos

poseen una excelente capacidad quelante y una buena tendencia a donar electrones [37].

Los compuestos fenólicos interactúan con los iones Au^{+3} debido a su extraordinaria capacidad de unión y liberación de electrones, reduciendo así al ion Au^{+3} a Au^0 . Se ha propuesto la formación de un complejo durante la reducción de los iones Au^{+3} que pudiera llevar a la formación de quinonas y a la consecuente formación de las AuNPs. Las quinonas pueden adherirse a la superficie de las nanopartículas a través de grupos carbonilo y generar fuerzas repulsivas, que impidan la agregación de estas y mejorar su estabilidad coloidal durante largos períodos de tiempo [74,75].

Por otra parte diversos estudios han informado también la contribución colectiva de grupos hidroxilo y carbonilo de compuestos flavonoides en la estabilización de las nanopartículas durante un largo período de tiempo [76]. Se ha propuesto que la eficacia estabilizadora de los flavonoides en la biorreducción de iones metálicos depende del número de grupos hidroxilo y carbonilo presentes en los anillos de estos flavonoides y que estos grupos estén disponibles para donar electrones. Se ha informado que las quinonas actúan como agentes de biocapa que se unen a las AuNPs a través de grupos carbonilo cargados. Por tanto, un mecanismo de reacción para la síntesis de AuNPs utilizando flavonoides, podría proponer que los iones de oro se reducen y forman semiquinonas por oxidación de catequina. Las semiquinonas se oxidan aún más para producir quinonas estables, que cubren la superficie de átomos de oro reducidos a través de grupos carbonilo cargados negativamente formados debido a la oxidación de grupos hidroxilo. Los electrones generados durante la conversión de enol a quinonoide se han propuesto como responsables de reducir los iones Au^{+3} a Au^0 [77].

Nanopartículas de plata

Actualmente no se conoce a ciencia cierta el mecanismo que explique la formación de nanopartículas de plata utilizando como agentes reductores y estabilizantes extractos de plantas. De manera general se sabe que el mecanismo de formación de nanopartículas consta principalmente de tres etapas: reducción de iones,

formación de núcleos y crecimiento de nanopartículas [78]. Las características de cada etapa dependen de la naturaleza del agente reductor, su concentración, etc. Según algunos investigadores, cuando se utilizan extractos de plantas, los grupos -OH presentes en moléculas como los flavonoides pueden ser responsables de la reducción de iones de plata a AgNPs. Es posible que la transformación tautomérica de flavonoides a partir de la forma enólica a la forma ceto puede liberar un átomo de hidrógeno reactivo que reduce los iones de plata a nanopartículas de plata. Se ha informado que la quercetina tiene un alto potencial de reducción, por lo tanto, actúa como agente reductor [75,78–80].

Cambio de fase

Los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas tienen sus propias ventajas y desventajas, por ejemplo, en el caso del tipo de morfología de nanopartículas, las nanovarillas, nanoesferas, nanocubos, nanoprismas, etc., se pueden obtener a través de métodos de síntesis química en entornos polares y no polares [81,82]. Los protocolos de síntesis en solventes orgánicos se basan en la transferencia de iones metálicos en la fase acuosa a través de moléculas de transferencia de fase con la posterior reducción de los iones metálicos en la fase orgánica en presencia de agentes reductores [83]. Este método proporciona un buen control sobre el tamaño y la monodispersidad de las nanopartículas, pero muy poco control sobre por ejemplo, la morfología de las mismas, es por ello que a través de los años se ha buscado desarrollar procedimientos en los que sean las propias nanopartículas metálicas y no los iones metálicos los que se transfieran de la fase acuosa a la fase orgánica, con el fin de maximizar las ventajas que ofrecen estos entornos basados en el procesamiento y en las consideraciones para sus aplicaciones.

El método de Brust-Schiffrin es uno de los métodos más antiguos utilizado para la transferencia de fase de iones metálicos presentes en una fase acuosa a una fase orgánica para su posterior reducción y formación de nanopartículas. En este enfoque de dos pasos, los iones por ejemplo de oro en una solución acuosa se extraen primero a una fase orgánica, por ejemplo, tolueno, utilizando bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) como agente de transferencia de fase. La transferencia de

iones metálicos es facilitada por la atracción electrostática entre los aniones de tetraoctilamonio cargados positivamente y los cationes por ejemplo tetracloroáuricos cargados negativamente. Subsecuente las reacciones de reducción tienen lugar en la solución orgánica utilizando una solución acuosa de NaBH_4 en presencia de un alcanotiol, produciendo así las nanopartículas [83,84].

Modificaciones posteriores a este método incluyen el uso de diferentes moléculas como alcanetioles de variadas longitudes, tioles aromáticos, disulfuros de dialquilo, entre otras.

Otras propuestas se basan en lugar de transferir iones metálicos de una solución acuosa a un medio orgánico seguido de la reacción de reducción, en la posibilidad de una transferencia de fase que implica el intercambio de ligandos y que aprovecha la síntesis de nanopartículas con las propiedades y grupos funcionales deseados [23,84]. Las nanopartículas se preparan primero en las condiciones optimizadas y luego se someten a intercambio de ligandos para realizar la transferencia de fase de la solución acuosa a medios orgánicos, o viceversa. Aunque este enfoque implica un proceso de dos pasos y emplea agentes estabilizantes adicionales, ha proporcionado un mayor control del tamaño, forma y dispersidad de las partículas. En 1992 Hidefumi Hirai y Hotaka Aizawa reportaron uno de los primeros trabajos de transferencia de fase de nanopartículas metálicas en solución acuosa a un solvente orgánico y un año más tarde en 1993, reportando la preparación de dispersiones estables de oro coloidal en n-hexano y ciclohexano por transferencia de nanopartículas de oro de una fase acuosa a una fase de n-hexano y a una fase de ciclohexano, respectivamente, utilizando para ello cloruro de magnesio añadido a la emulsión de hexano en la solución acuosa de oro con oleato de sodio [85,86]. La transferencia de fase de nanopartículas de plata de soluciones acuosas a orgánicas se ha llevado a cabo utilizando 1-aminooctadecano.

Técnicas de caracterización

El desarrollo de la nanotecnología en diversas áreas de investigación condujo a la necesidad de utilizar técnicas analíticas para el análisis y la caracterización de nanomateriales. Diferentes técnicas de caracterización están actualmente disponibles, como microscópicos, espectroscopios, entre otros. Las nanopartículas generalmente se caracterizan por su distribución de tamaño, morfología, propiedades superficiales, estabilidad e interacciones. Las principales técnicas de caracterización de nanopartículas en general son espectroscopia de Ultravioleta visible, espectroscopia (XPS), espectroscopia infrarroja, potencial zeta, microscopía electrónica de barrido (SEM) Microscopía de transmisión por electrones (TEM), Dispersión dinámica de luz (DLS). Entre muchas otras técnicas disponibles.

Dispersión dinámica de Luz.

La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) es una de las técnicas más utilizadas para determinar el coeficiente de difusión, radio hidrodinámico, radio de giro y polidispersión de partículas o agregados en suspensión. La dispersión de la luz puede ser medida en estado estacionario en un espectrofluorímetro, o de forma dinámica en un instrumento equipado con un láser [87].

La técnica DLS se basa en hacer incidir un haz de radiación de longitud de onda λ y vector de onda $k = \frac{2\pi n}{\lambda}$ sobre una muestra con partículas en movimiento. Al interactuar la radiación con las partículas una parte de la energía es absorbida, otra es transmitida sin modificación del vector de onda incidente y otra es dispersada en todo el espacio.

La luz dispersada a un cierto ángulo es colectada por un detector (fotomultiplicador). Estudiando la dispersión de la muestra suponiendo que la energía incidente es igual a la energía transmitida y correlacionando las intensidades de dispersión a diferentes tiempos se construye una función de correlación. La función de correlación puede ser ajustada por un modelo físico acorde al tipo de partículas o estructuras presentes en la muestra para determinar el coeficiente de difusión, la distribución de tamaños y la polidispersión. En términos

generales todos los equipos de dispersión de luz contienen los mismos componentes como son: una fuente de radiación, un detector situado al ángulo de dispersión y un correlador digital que conjuntamente con un software específico, permiten obtener de primer orden la intensidad de luz dispersada a cada ángulo. En el análisis de dispersión de luz dinámica el movimiento browniano de las partículas induce un ensanchamiento del espectro lo que se relaciona con la forma y tamaño de las partículas. La dispersión de luz dinámica es uno de los métodos más empleados para estimar el radio hidrodinámico promedio de partículas en suspensión y su índice de polidispersidad, cubriendo un rango desde unos pocos nanómetros hasta μm [88].

Potencial zeta

El potencial zeta indica la carga neta que hay en la superficie de una partícula. El desarrollo de la carga neta en la superficie de una partícula afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de iones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. Por lo tanto, existe una capa doble eléctrica alrededor de cada partícula.

La capa de líquido que rodea la partícula se divide en dos regiones, una llamada capa de Stern, donde los iones están fuertemente unidos y una región exterior difusa en la que están sujetos con menos firmeza. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico en el cual los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (debido a la gravedad), los iones dentro de los límites se mueven con él, pero los iones más allá de la frontera no viajan con la partícula. Este límite se denomina superficie de cizallamiento hidrodinámico.

El potencial que existe en este límite se conoce como potencial zeta, que es la carga global que adquiere una partícula en un medio particular. La magnitud del potencial zeta es un parámetro que se utiliza para conocer la estabilidad potencial de un sistema coloidal. Un sistema coloidal estable es cuando uno de los tres estados de la materia: gaseoso, líquido y sólido, están finamente disperso uno en otro. Entre mayor es el valor absoluto del valor del potencial zeta (cargas negativas

o positivas), las partículas en suspensión tienden a repelerse entre sí y no hay tendencia a agregarse y flocular. En cambio, si las partículas tienen valores de potencial zeta bajos, no hay fuerzas de atracción para impedir que las partículas se unan y entonces se agregan y floculan. Generalmente un sistema coloidal se considera estable cuando los valores de potencial zeta absolutos superan 20 mV [88].

Microscopía

La microscopía es una herramienta importante para la caracterización de la estructura de los nanomateriales, esta técnica de formación de imágenes se puede utilizar para examinar de forma detallada, el tamaño y distribución de micro y nanopartículas metálicas. Hay diferentes clases disponibles de técnicas de microscopía, como la microscopía óptica tradicional, barrido electrónico microscopía (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de sonda de barrido (SPM), entre otros

Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica valiosa para el examen y análisis de las características microestructurales de los objetos sólidos, con una resolución de 5 nm. La microscopía SEM es una herramienta que puede proporcionar información de la composición de nanomateriales, además de que permite la observación de materiales orgánicos e inorgánicos heterogéneos en escala mesoscópica. En un experimento típico de SEM, un haz de electrones se enfoca para obtener un tamaño de haz de electrones muy fino que se hace incidir sobre la superficie, y un detector apropiado que recoge los electrones emitidos desde cada punto. De esta forma, una imagen con una gran profundidad de campo y una notable apariencia tridimensional se construye línea por línea. La muestra suele ser recubierta con una película conductora antes del examen para mejorar la conductividad electrónica y, por lo tanto, mejorar el contraste de la imagen.

El microscopio electrónico de barrido es capaz de generar imágenes en condiciones de alto vacío, para ello consta de un cañón de electrones en la parte superior que crea un haz de electrones divergentes, estos pasan a través de una

columna que se encuentra al vacío, donde una serie de aperturas electromagnéticas conducen y enfocan el haz de electrones, posteriormente un campo electrostático impulsa los electrones a través de un pequeño punto llamado cruce donde se aceleran atravesando la columna hasta la cámara de muestra, a través de un sistema de deflexión el haz de electrones se mueve en forma de zig zag realizando el barrido de la muestra. Las señales resultantes de la interacción haz-muestra son finalmente, construidas como una imagen virtual a partir de la señal emitida por la muestra. Esto se logra escaneando el haz de electrones línea por línea a través de un patrón rectangular en la superficie de la muestra. El patrón de escaneo define el área representada en la imagen. En cualquier momento, el rayo ilumina sólo un punto en el patrón. A medida que el rayo se mueve de un punto a otro, las señales que genera varían en intensidad, reflejando diferencias en la muestra [89].

Espectroscopia de Ultravioleta-visible

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica donde una molécula absorbe una longitud de onda de luz específica, después de lo cual un electrón se excita a un nivel de energía más alto. Se utilizan dos tipos de longitudes de onda, un haz de referencia que no interactúa con el nanomaterial y otro que se ha elegido específicamente para excitar el material. Luego, el detector registra la relación entre estos dos haces de luz y determina la concentración del nanomaterial. Esto es posible porque, cuando el nanomaterial (o molécula, nanopartícula, etc.) está absorbiendo la luz, la intensidad de la transmisión de esta se reduce, y luego se puede utilizar de manera cuantitativa.

Dado que el nanomaterial debe disolverse en un disolvente para que se lleve a cabo el análisis, la espectroscopia de UV-Vis tiene aplicaciones limitadas en nanotecnología en comparación con otras técnicas, pero se utiliza con bastante frecuencia para nanopartículas en suspensión. Además de determinar la concentración de una suspensión de nanopartículas, esta técnica también puede utilizarse para determinar las propiedades de absorción del color de las nanopartículas metálicas (a través del plasmón resonancia de superficie), así como

las propiedades de absorción, difusión y liberación de las nanopartículas / nanomateriales [90]

Transformada de Fourier para infrarrojo (FT-IR)

El análisis de una muestra por FT-IR provee como resultado un espectro de absorción de infrarrojo el cual proporciona información de la estructura y concentración molecular. Todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, a este conjunto de señales se les conoce como la "huella dactilar" del compuesto. La mayoría de los componentes de un enlace químico tienen movimientos vibracionales con frecuencias dentro del infrarrojo medio (4000 a 650 cm^{-1}), moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras presentes en una muestra biológica tienen cada una un espectro de infrarrojo específico. La radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética usada es la misma que la del propio enlace, haciendo posible la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos. Estructuras químicas grandes como es el caso de las biomoléculas tienen picos de absorción predecibles, los cuales pueden variar ligeramente dependiendo de las distintas interacciones moleculares y propiedades físicas de las muestras. El número de onda absorbida por un enlace vibracional depende de los átomos que forman el enlace, el tipo de enlace formado y el tipo de vibración inter e intramolecular [91].

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo general

El objetivo principal del presente trabajo es:

1. Modificar la superficie de nanopartículas de oro y plata mediante ligandos que permitan la transferencia de estas nanopartículas de fase acuosa a fase orgánica.
2. Sintetizar nanopartículas de oro y plata siguiendo los principios básicos de la síntesis o química verdes utilizando un extracto acuoso de hojas de palo verde (*Parkinsonia florida*).

Objetivos específicos

1. Sintetizar un ligando basado en ácido oleico que permita su acoplamiento a nanopartículas de oro y de plata.
2. Probar la efectividad del ligando en la transferencia de fase usando nanopartículas de oro y plata sintetizadas por técnicas convencionales.
3. Preparar un extracto acuoso utilizando la planta *Parkinsonia florida*.
4. Evaluar la efectividad del extracto para la síntesis de nanopartículas de oro y de plata.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata obtenidas con el extracto.

CAPITULO II

Transferencia en fase acuosa-orgánica de nanopartículas de oro y plata usando ácido oleico modificado con tiol

Introducción

Las nanopartículas metálicas son de gran interés debido a sus propiedades fisicoquímicas, lo que las hace adecuadas para una amplia gama de aplicaciones industriales. En este sentido, las nanopartículas de oro son una de las partículas metálicas más estables que ofrece características que incluyen propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas relacionadas con el tamaño de partícula, son biocompatibles, poseen una baja citotoxicidad, es posible utilizarlas en múltiples tipos de ensamblaje y funcionalizarlas en su superficie para utilizarlas una amplia gama de aplicaciones biomédicas [92,93]. Así mismo, las nanopartículas de plata presentan propiedades ópticas, electrónicas y antibacterianas que dependen de su geometría, distribución de tamaño y entorno fisicoquímico, lo que las hace adecuadas para importante de aplicaciones industriales [2,46].

Estas nanopartículas pueden sintetizarse en solventes polares y no polares presentando cada uno sus ventajas y desventajas y cuyas propiedades pueden afectar desde la morfología, tamaño de partícula hasta sus potenciales aplicaciones [21,57,94]. Sin embargo, en general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolventes orgánicos es muy sensible y, por lo tanto, requiere un esfuerzo considerable para desarrollar procesos que resulten convenientes para manipular de manera controlada el tamaño y forma que se desea obtener, mientras que la síntesis de aquellas nanopartículas en soluciones acuosas proporcionan la ventaja de controlar de manera exitosa el crecimiento y morfología de las partículas y es posible encontrar numerosos procedimientos de preparación bien definidos en la literatura [13,49,95,96]. En este contexto, la transferencia de nanopartículas de oro entre solventes polares y no polares es necesaria para obtener las ventajas del proceso de fabricación que ofrece la síntesis en solventes polares. La transferencia de fase de nanopartículas de oro de disolventes polares a no polares se ha estudiado utilizando líquidos iónicos [96], grupos hidroxilo fenólicos [29], ligandos

tiol [27,97], etc. Existen varios informes que presentan muchas metodologías particulares que se han establecido para la transferencia de fase de nanopartículas metálicas desde una fase acuosa a un medio orgánico o viceversa [98]. Para los casos en que el uso de un ligando se aplica en la transferencia de fase de nanopartículas metálicas, también hay informes que muestran los ligandos de modificación de superficie de uso común [99]. El ácido oleico (OA) se ha utilizado como un ligando para la transferencia de fase de nanopartículas de óxido de hierro[28] y nanopartículas de plata [100]. También se ha utilizado para sintetizar nanopartículas de oro recubiertas con ácido oleico [101].

En este capítulo se presenta un trabajo que tiene como objetivo estudiar la síntesis de un ligando de tiol preparado a través de la modificación del ácido oleico con 2-aminoetanotiol, y la transferencia de fase acuosa-orgánica de nanopartículas metálicas usando este ligando, con un enfoque particular en nanopartículas de oro y plata. Sin embargo, las estrategias propuestas podrían ser de naturaleza general y funcionar de manera similar a otras nanopartículas metálicas.

Materiales y métodos

Materiales

El Citrato de Sodio (citrato de Na_3), ácido tetracloroáurico III (HAuCl_4), nitrato de plata (AgNO_3), ácido ascórbico y el clorhidrato de hidroxilamina se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El OA fue adquirido de Fermont (Monterrey, NL, México). N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) se compró a Alsa Aesar (Ward Hill, MA, EE. UU.). DCM se adquirió de Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, NJ, EE. UU.). El 2-aminoetanotiol se adquirió de TCI (Portland, OR, EE. UU.). Otros reactivos fueron de grado analítico.

Preparación de ácido oleico tiolado (OAS)

La modificación de OA con 2-aminoetanotiol se realizó después de una reacción de acoplamiento común encontrada en la literatura [102], misma que se presenta en la figura 2.1. Brevemente, 3.54 mmol de OA y 3.54 mmol de DCC se disolvieron en metanol (otros disolventes como dimetil sulfóxido también podrían ser utilizados). A

continuación, se añadieron 2-aminoetanotiol (3,54 mmol) a la solución de metanol y se agitó suavemente durante dos horas a temperatura ambiente. La dicitclohexilurea precipitada se eliminó mediante un ciclo de centrifugación a 2348 x g durante 20 minutos en el equipo Sigma 3-30 KS Ultracentrifuge (Osterode, Alemania). El sobrenadante se almacenó a 4° C durante 12 horas para asegurar la terminación de la reacción de acoplamiento. Posteriormente, se realizó un ciclo de centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente para eliminar posibles precipitados (dicitclohexilurea).

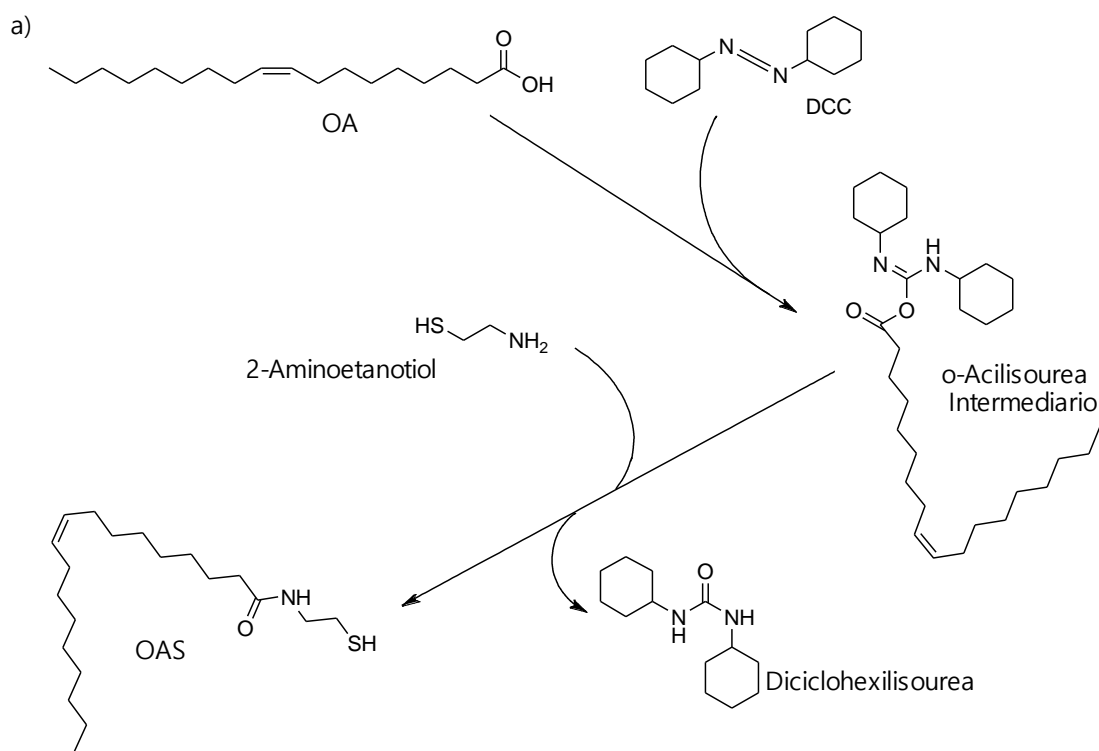


Figura 2.1 Representación esquemática de la modificación de OA para obtener el ligando de ácido oleico con grupo terminal tiol (OAS).

Preparación de nanopartículas de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs)

Las soluciones de AuNPs se prepararon de acuerdo con el método de Frens [37]. Brevemente, se preparó una solución de H₂AuCl₄ al 0,01% en peso (solución I) y una solución de citrato de sodio al 1% en peso (solución II). Diez ml de la Solución I se calentaron hasta el punto de ebullición, después de lo cual se añadieron 0,2 ml de solución II. Después de unos 25 segundos, la solución se volvió ligeramente azul.

Aproximadamente 70 segundos después, el color azul cambió repentinamente a un rojo brillante, lo que indica la formación de partículas esféricas [37]. Se dejó completar la reducción del cloruro de oro durante 10 minutos en el punto de ebullición.

En el caso de las nanopartículas de plata se prepararon soluciones de AgNPs a 60°C añadiendo 100 mmol de borohidruro de sodio a una solución bajo agitación magnética (90 ml) que contenía 0,2 mmol de nitrato de plata y 0,5 mmol de citrato de sodio. La solución de plata se dejó reaccionar a 60 °C mientras se agitaba durante un mínimo de dos horas observando un color amarillo característico de la formación de las partículas. A continuación, se llevó a cabo el crecimiento de partículas de plata añadiendo 200 mmol de hidrocloreuro de hidroxilamina a la solución de plata, seguido de la adición de 0,7 ml de AgNO_3 0,1 M, bajo agitación magnética. Las nanopartículas de plata en crecimiento cambiaron el color de la solución a un amarillo más oscuro o naranja en función de la cantidad de AgNO_3 adicional según lo descrito por Prevo y colaboradores [103].

Transferencia de fase acuosa-orgánica de AuNPs y AgNPs

La transferencia de fase acuosa-orgánica de las AuNPs y las AgNPs se llevó a cabo utilizando la molécula OAS obtenida previamente. Brevemente, se mezclaron 2 ml de AuNPs o AgNPs en solución acuosa con un volumen de solución de metanol que contenía OAS. La mezcla se agitó vigorosamente hasta que se formó una emulsión y se dejó reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron secuencialmente 2 ml de DCM y 1 ml de metanol, y la solución se agitó vigorosamente hasta que las AuNPs o las AgNPs comenzaron la transferencia en la fase orgánica, lo que puede observarse a simple vista. Después de la transferencia completa de AuNPs o AgNPs a la fase orgánica, ambos se separaron de la fase acuosa mediante decantación.

Caracterización

Las estructuras del OA y los derivados fueron analizados y confirmados por análisis de espectroscopia de infrarrojo utilizando un espectrómetro FT-IR (Perkin Elmer, Llantrisant, Reino Unido). Para las mediciones de FT-IR, la muestra se colocó

directamente sobre cristal de ATR, y el espectro se recolectó en un rango entre 4.000 y 500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} (16 exploraciones por muestra). Las morfologías de AuNPs y AgNPs se observaron mediante STEM a través de un microscopio electrónico de exploración de campo (JEOL JSM-7800F) y mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (JEOL JEM-2200FS). Para el estudio por microscopía, las muestras de nanopartículas se prepararon a través de su inmovilización sobre rejillas de cobre revestidas con carbono de 400 mallas (Ted Pella Inc., Redding, CA, EE. UU.). El estudio de las distribuciones de tamaño de nanopartículas se llevó a cabo usando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones de los tamaños de nanopartículas se realizaron por DLS. Cada muestra se midió tres veces con diez carreras cada vez. Los promedios que se reportan se obtuvieron a partir de al menos cinco experimentos independientes. Los espectros de absorción de UV-vis para las muestras de nanopartículas en ambas fases se recogieron con un espectrofotómetro UV-6300PC (VWR, Radnor, PA, EE. UU.). Se realizó un estudio de análisis de repetibilidad, como control de calidad.

Resultados

Preparación de ácido oleico terminado en tiol (OAS)

Se registraron los espectros infrarrojos para OA y ácido oleico terminado en tiol (OAS). La Figura 2.2 muestra el espectro de transmisión infrarroja de a) OA, b) 2-aminoetanotiol y c) OAS. Los espectros IR de OA y OAS indican que el 2-aminoetanotiol es de hecho parte del compuesto. En el espectro de transmisión infrarroja del ácido oleico puro, la banda de infrarrojos a 1707 cm^{-1} está relacionada con el modo de estiramiento C=O. Generalmente, los grupos COOH implican enlaces de hidrógeno a concentraciones más altas para formar las especies diméricas de COOH. Tras el enlace de hidrógeno, la ubicación de la banda para el modo de estiramiento C=O que implica la especie monomérica de COOH se desplaza a un número de onda inferior debido a la perturbación del modo de vibración. El hombro débil a 1656 cm^{-1} y 1245 cm^{-1} se puede atribuir al modo de estiramiento C=C para el ácido oleico y el estiramiento C-O, respectivamente.

Finalmente, la banda de infrarrojos a 1434 cm^{-1} está relacionada con la flexión en el plano de C-OH[104,105]. Para el análisis infrarrojo de la molécula de 2-amoniethanethiol, la banda de infrarrojos a 2780 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento de N-CH₂. Las bandas IR a 1131 , 1150 , 1175 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento C-N alifático, las bandas IR a 750 y 758 cm^{-1} se atribuyen a la ondulación y torsión NH, y la banda IR 660 cm^{-1} está asociada con el estiramiento C-S. Finalmente, la banda IR en 2494 cm^{-1} se atribuye al estiramiento S-H [104]. En el espectro de transmisión infrarroja de la OEA, la banda de infrarrojos a 3260 cm^{-1} se puede atribuir a la amida secundaria de estiramiento N-H. La banda de 1650 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C=O de amida secundaria, y 1556 cm^{-1} se puede atribuir a un N-H de flexión y C-N de estiramiento de una amida secundaria. Finalmente, la banda de infrarrojos a 642 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento C-S. Como se presenta, la modificación OA para obtener OAS se llevó a cabo con éxito debido a la desaparición de la banda de 2780 cm^{-1} relacionada con el estiramiento N-CH₂ y la consiguiente aparición de una banda a 1556 cm^{-1} , que puede atribuirse a la flexión N-H y estiramiento C-N de una amida secundaria.

Las señales resultantes para Resonancia Magnética Nuclear NMR ¹H y NMR ¹³C para OAS se presentan en la figura 3. Las señales para ¹H NMR -CH₂SH y -N - CH₂ se encontraron en $\delta\text{H} = 2.90$ (2H, s, H-21) y $3.41\text{--}3.66$ (2H, d, H-20). Mientras que las señales para protones de metileno equivalentes CH = CH- se encontraron en $\delta\text{H} = 5.31$ (1H, s, H-9 y H-10), las señales para los protones alquílicos de la cadena de ácido oleico están en $\delta\text{H} = 0.99\text{--}1.5$ (22H, m, H2-7, H12-15) y $\delta\text{H} = 1.5\text{--}1.75$ (6H, m, H-15 y H-16). Finalmente, los protones -CH₂- se encontraron en $\delta\text{H} = 1.75\text{--}2.0$ (6H, m, H-8, H-11 y H-17). La señal de protón de Mercapto se encontró solapada $\delta\text{H} = 1.21$ (1H, s, H-22), terminal -CH₃ se encontró en $\delta\text{H} = 0.85$ (2H, s, H-1) (v. figura 3a). Las señales correspondientes para ¹³C RMN, que se muestra en la figura 3b, son CH₂ - SH (26.92, C-21), NH - CH₂- (57.28, C20), -CH₂C = O (38.65, C17), NHC = O (180.26, C18), -CH₂- (22.40, C2), -CH₂- (24.79, C16), -CH₂- (28.86, C6 y C13), -CH₂- (29.03, C15), -CH₂- (29.24, C5 y C14), -CH₂- (29.35, C4), -CH₂- (29.48, C7 y C12), -CH₂- (31.61, C8 y C11),

-CH₂- (33.0, C3), -CH = CH- (129.67, C9 y C10). La RMN muestra una señal única patrón, correspondiente a un compuesto químicamente puro.

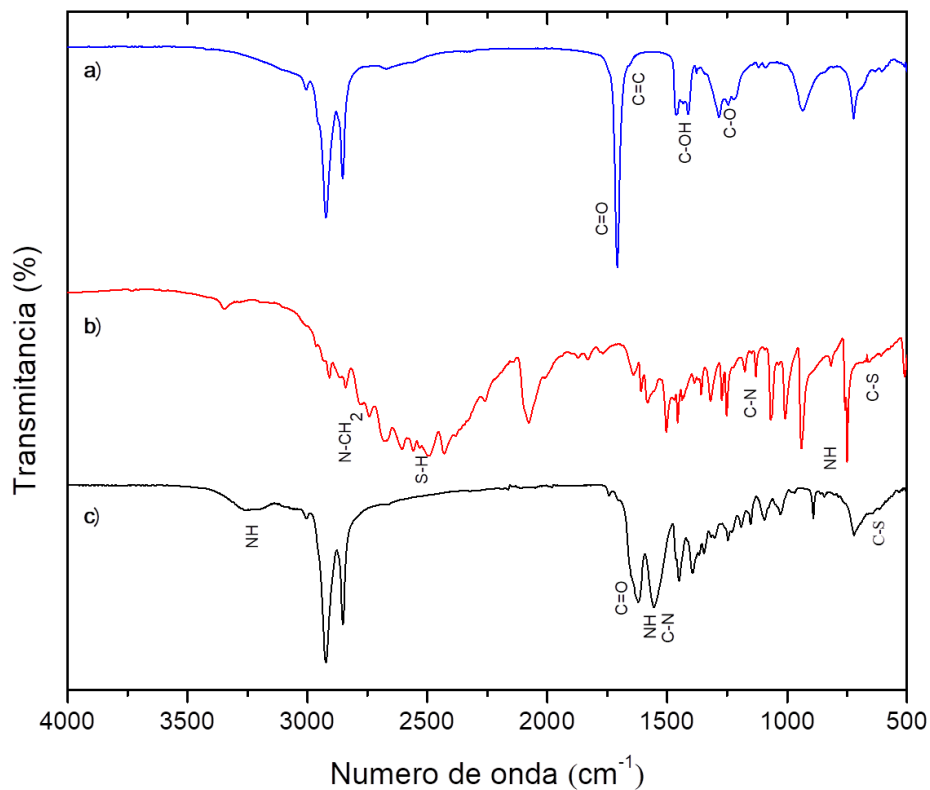


Figura 2.2. Espectros FT-IR de (a) OA, (b) 2-aminoetanetiol y (c) OAS.

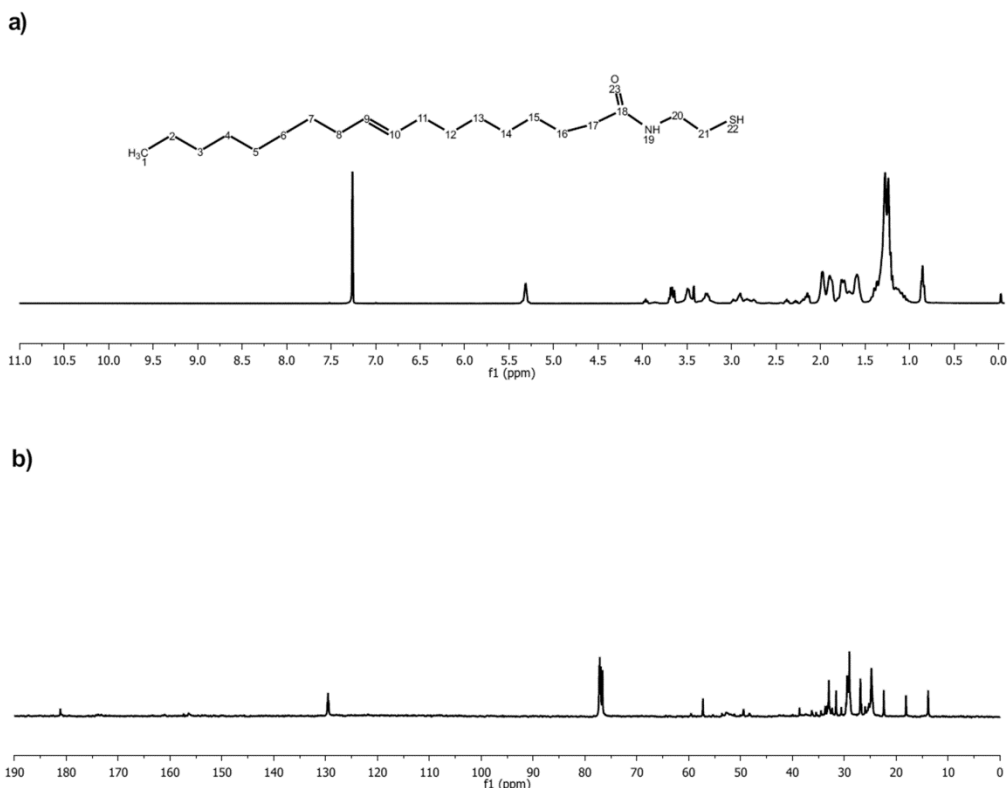


Figura 2.3 (a) Espectro de RMN ^1H de OAS en CDCl_3 ; (b) Espectro ^{13}C NMR de OAS en CDCl_3 .

Síntesis de nanopartículas de oro y plata

El análisis de microscopía evaluado mediante microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) de las nanopartículas de oro (AuNPs) mostró una morfología esférica, (figura 2.4a). Las AuNPs presentaron una buena dispersión en solución acuosa con un tamaño de partícula de 13 ± 2 nm evaluado mediante histograma de distribución de tamaño presentado en la figura 2.4b. La línea continua en esa figura es un ajuste gaussiano de los datos. La reacción a temperaturas de 100°C dejó una distribución de tamaño de partícula más pequeña y morfología uniforme [93]. Zhao y Friedrich informaron que las nanopartículas de oro esféricas uniformes de alrededor de 10, 25 y 50 nm eran producidas a través del mismo método [93].

Las nanopartículas de plata (AgNPs) presentaron una morfología principalmente esférica, pero se hizo evidente la presencia de algunas varillas, como

se puede ver en la micrografía STEM que se muestra en la figura 2.4c. Las AgNPs presentaron una buena dispersión en solución acuosa y con tamaños de partícula de 57 ± 7 nm como se puede observar en el histograma de distribución de tamaños mostrado en la figura 2.4d. La línea continua en la figura es un ajuste gaussiano de los datos. Tamaños de nanopartículas similares fueron reportados por Prevo et al. [106], quien utilizó el mismo método. Estas partículas de plata se pueden usar como centro de nucleación para un crecimiento adicional al agregar más nitrato de plata e hidrocloreuro de hidroxilamina. Un aumento directo en la absorbancia en el pico de 400 nm, relacionado con el plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas de plata, al aumentar la concentración del nitrato de plata, se informa ha informado en la literatura [106].

Transferencia de fase acuosa-orgánica de AuNPs y AgNPs

Las soluciones acuosas de AuNPs y AgNPs se transfirieron al solvente diclorometano (DCM) usando el ligando OAS. Las soluciones que contenían las nanopartículas se mezclaron con OAS, formando una emulsión. La emulsión se rompió luego mediante la adición secuencial de DCM y metanol para permitir la transferencia de fase. Después de algunos minutos, las partículas se transfirieron efectivamente de agua a DCM, como se puede ver en la Figura 2.5. La transferencia de fase de partículas metálicas se llevó a cabo por intercambio de ligandos, (tiol de OAS se unió a la superficie de la partícula). Los grupos tiol han mostrado una gran afinidad con las superficies de los metales nobles, particularmente con el oro.

Este acoplamiento se ha llamado quimioabsorción y también se ha observado como un enlace covalente, mientras que los procesos exactos y la naturaleza microscópica todavía están sujetos a investigación y discusión [28,37,99–105,107].

La Figura 2.6 muestra el espectro de absorción de las AuNPs y las AgNPs en solución acuosa y en DCM. Los espectros de adsorción de ultravioleta-visible (UV-vis) mostraron un máximo pico de absorción para las AuNPs de alrededor de 525 nm y alrededor de 407 nm para las AgNPs en soluciones acuosas.

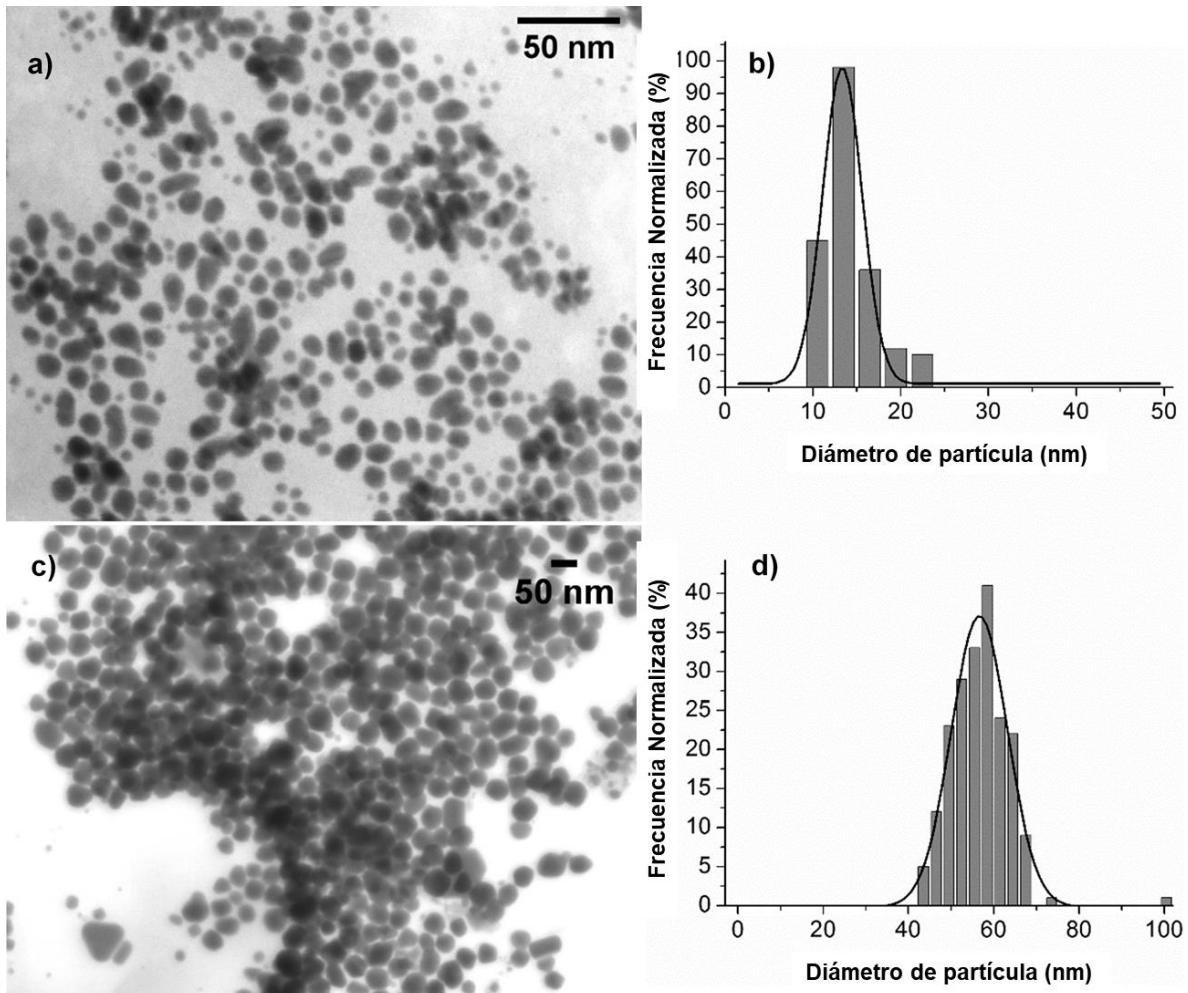


Figura 2.4 Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de oro dispersas en agua; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de oro dispersas en agua (c) Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de plata en agua; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de plata en agua.

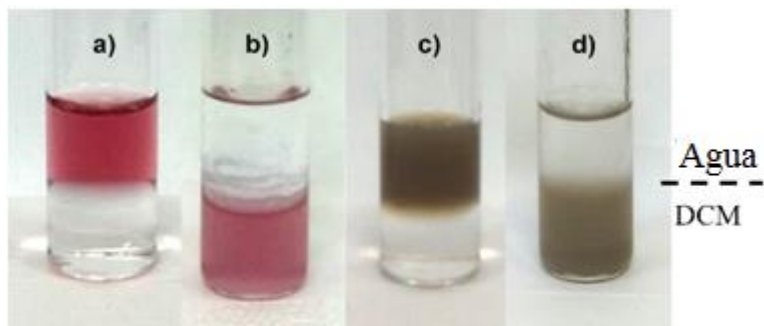


Figura 2.5 (a) AuNPs antes de la transferencia de fase y (b) después de la transferencia de fase. (c) AgNPs antes de la transferencia de fase y (d) después de la transferencia de fase.

Las propiedades ópticas como la absorción máxima y la intensidad de absorción dependen del tamaño de partícula [108]. Un pico de absorción intenso a 525 nm generalmente se atribuye a la excitación superficial del plasmón de pequeñas partículas esféricas de oro, que, según la teoría Mie para nanopartículas metálicas, representa una forma esférica y un tamaño de diámetro de partícula pequeño [109]. El espectro de absorción de las AuNPs y las AgNPs en solventes orgánicos también se muestra en la Figura 2.6. Después de la transferencia de fase, la desaparición de la señal de plasmón para las AuNPs y las AgNPs sugiere una transferencia alrededor del 100%, a la fase orgánica. El metanol es un solvente intermediario para obtener la transferencia de fase de las nanopartículas. De acuerdo con Alkilany et al., [110], el metanol podría inducir una transferencia de fase completa, así como ayudar en la concentración de nanopartículas en el solvente DCM. Los espectros de absorción UV-vis muestran que las propiedades ópticas de las nanopartículas se mantienen a través del proceso de transferencia de agua a DCM. El desplazamiento de resonancia de plasmón de superficie en color rojo observado en ambos espectros UV-vis normalizados, para nanopartículas de oro y plata (v. figura 2.6), podría deberse a la modificación en el índice de refracción de los medios.

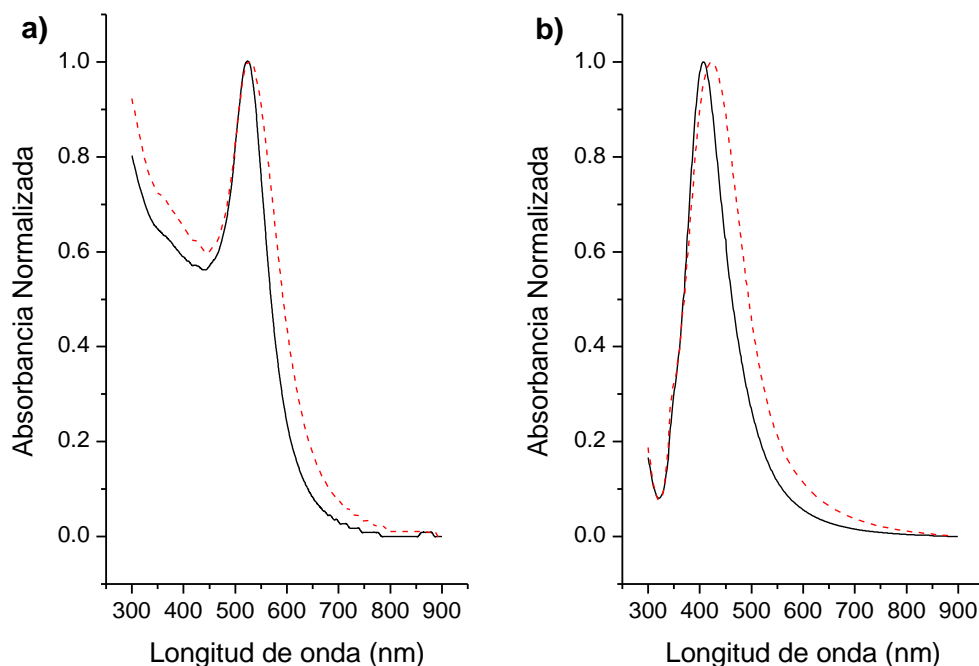


Figura 2.6 (a) AuNPs. (b) AgNPs. Espectros de UV-vis normalizados de nanopartículas metálicas en solución acuosa (línea negra) y en el solvente DCM (línea discontinua roja).

La transferencia de fase acuosa-orgánica de las AuNPs y las AgNPs se realizó utilizando la molécula OAS. La morfología de las nanopartículas, analizada por microscopía electrónica de transmisión de exploración (STEM), se mantuvo esférica, como se muestra en la figura 2.7 a y c, respectivamente. Los histogramas de los diámetros de las partículas se representan en la figura 2.7 b y d, para las AuNPs y las AgNPs, respectivamente. Las líneas continuas en esas figuras son un ajuste gaussiano de los datos, lo que revela partículas con diámetro de 15 ± 3 nm y 50 ± 6 nm para las AuNPs y las AgNPs respectivamente, y que indica que el tamaño de partícula se mantiene en el proceso de transferencia de fase. Además, las nanopartículas presentaron buena estabilidad en el solvente orgánico por varios días sin que ocurriera precipitación. Las nanopartículas metálicas dispersas en el disolvente no polar podrían ser transferidas nuevamente a un solvente polar usando α -ciclodextrina en la fase polar y agitando, según los protocolos de la literatura.

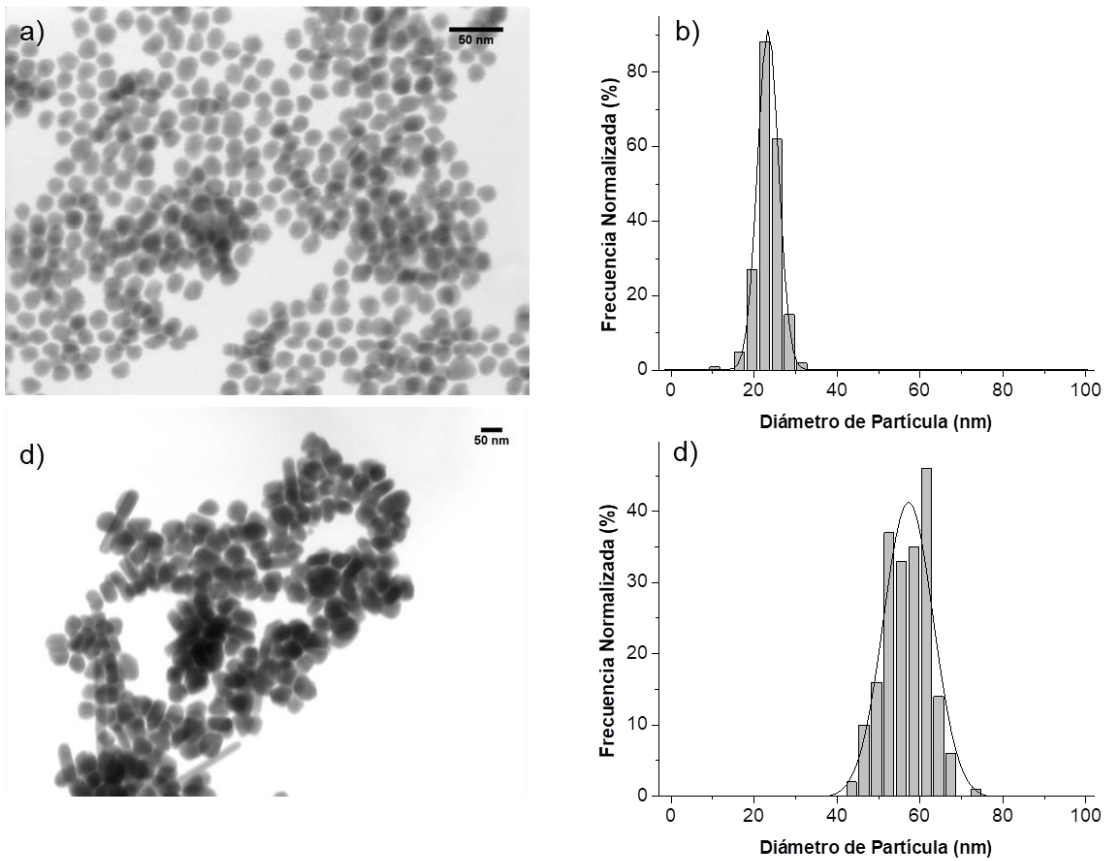


Figura 2.7. Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de oro en solvente orgánico; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de oro en DCM; (c) Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de plata en solvente orgánico; (b) histograma de distribución de tamaño de partículas de plata en DCM.

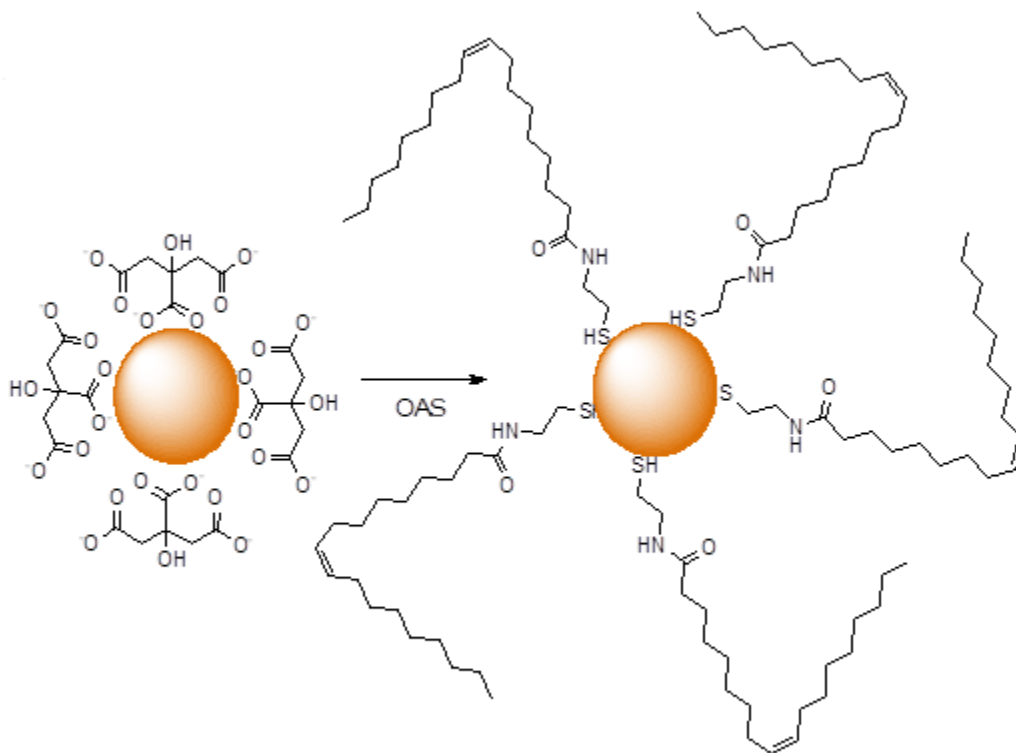


Figura 2.8. Esquema de transferencia de fase para AuNPs estabilizadas con citrato utilizando OEA.

Conclusiones

Se demostró la capacidad de un ligando recién sintetizado basado en ácido oleico para ayudar a la transferencia de fase acuosa-orgánica de nanopartículas de oro y plata. El diámetro y la morfología de las nanopartículas se conservan cuando se utiliza este ligando de transferencia de fase, como se verifica mediante DLS, espectroscopia UV-vis y mediciones STEM. Los altos rendimientos de transferencia y la síntesis directa de este ligando lo hacen adecuado para lograr varios procesos de autoensamblaje modificando el ácido oleico con diferentes grupos funcionales.

CAPITULO III

Síntesis verde de nanopartículas de oro y plata con extracto acuoso de hojas de *Parkinsonia florida*

Introducción

Los métodos para la síntesis de nanopartículas metálicas actualmente se investigan ampliamente debido a sus posibles aplicaciones en diversas áreas. Los principales métodos para sintetizar nanopartículas incluyen vías químicas y físicas [21,37,103,111], pero a veces estas rutas son costosas y perjudiciales para el medio ambiente. Los métodos de síntesis ecológica disminuyen estas complicaciones al lograr la síntesis de nanopartículas mediante el empleo de extractos de plantas o microorganismos [20,73,111–113]. La formación de nanopartículas metálicas por fuentes naturales, como extractos de plantas, está sustentada por la presencia de metabolitos primarios o secundarios derivados de los procesos metabólicos de las plantas donde moléculas como carbohidratos, proteínas, aminoácidos, fenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides y muchos otros pueden ser capaces de llevar a cabo la reducción de iones metálicos [18,114]. La extracción de estas moléculas de interés de una planta implican la separación de porciones activas que están presentes en las hojas, flores, raíces, entre otros, utilizando solventes especialmente seleccionados y métodos estandarizados.

Por lo general, el producto final obtenido de la extracción es una mezcla relativamente compleja de moléculas activas. Naturalmente, la presencia de estas moléculas, responsables de la reducción de los iones metálicos, puede ser muy diferente de una muestra a otra [73]. La síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas (hoja, corteza, tallo, raíz, etc.) se puede obtener mezclando el extracto con una solución de sal metálica, donde se puede hacer la

reducción química de las sales en nanopartículas sin agentes estabilizadores / protectores externos y a temperatura ambiente (v. figura 3.1) [18,115,116].



Figura 3.1. Esquema general de formación de nanopartículas metálicas por reducción y estabilización con extracto acuoso de hojas de *P.florida*.

Se ha reportado la síntesis verde de nanopartículas de oro usando extracto acuoso de semillas de *Abelmoschus esculentus* [117], extracto de hojas de Neem [118], *Salvia officinalis*, *Lippia citriodora*, *Pelargonium graveolens*, *Punica granatum* [66], *Hibiscus tiliaceus* [119], extracto de hoja de *Indigofera tinctoria* [120], entre otros. Las principales aplicaciones de las nanopartículas de oro incluyen administración dirigida de fármacos [121], administración de genes [122], antitumoral y terapia contra el cáncer [108,120,123], bioimagen [124,125] y otras aplicaciones potenciales [126]. Por otro lado, la síntesis verde de nanopartículas de plata se encuentra ampliamente documentada en la literatura, estas nanopartículas de plata (AgNPs) se han sintetizado utilizando un extracto acuoso de Neem [95], extracto de cáscara de plátano [127], extracto de *Trianthema decandra* [128], extracto de hoja de *Abutilon indicum* [129], extracto de hoja de *Psidium guajava L.* [130], entre otros. Además, las nanopartículas de plata presentan actividad antibacteriana tanto contra microorganismos Gram-negativos como Gram-positivos,

mostrando una mejor actividad antimicrobiana contra Gram-negativos [73,131] debido a la diferencia en las características estructurales de la especies bacterianas.

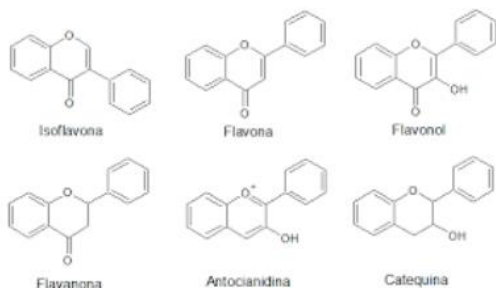
Parkinsonia florida (*P. florida*), generalmente llamada *Cercidium floridum* o paloverde azul, es un árbol de la subfamilia Caesalpinioideae [132,133], también conocida como familia del pavo real (Leguminosae), que comprende aproximadamente 180 géneros y aproximadamente 3000 especies. Incluye muchas legumbres económicamente importantes como *Bauhinia forficata*, *Caesalpinia gilliesii*, *Caesalpinia spinosa*, *Ceratonia siliqua*, *Cercis siliquastrum*, *Gleditsia triacantos*, *Gymnocladus dioica*, *Parkinsonia aculeata* y *Senna multiglandulosa* [134]. *P. florida* se encuentra principalmente en el desierto de Colorado, el sureste de California, el desierto de Sonora, el sur de Arizona y en el noroeste del estado de Sonora (México). *Parkinsonia spp.*, contiene potentes antioxidantes y fitoquímicos en flores, hojas y tallos como glucósidos, flavonoides, esteroides y minerales. Las hojas también contienen C-glicosil flavonas como orientina, vitexina e iso-vitexina, Parkinsonin A, Parkinsonin B y Parkintin (v. figura 3.2) [132,135].

Este capítulo comprende la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando un extracto de hojas de *P. florida* como agente reductor y estabilizante en la síntesis de nanopartículas de oro y plata, mientras que el ácido tetracloroaurico y el nitrato de plata se utilizan como precursores. Se realizó un estudio fitoquímico del extracto de hojas de *P. florida*, y las nanopartículas metálicas obtenidas se caracterizaron por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia de absorción óptica, microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) y potencial zeta. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata se evaluó contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.

Metabolitos

Parkinsonia spp.

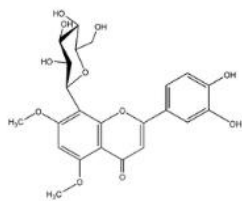
FLAVONAS Y FLAVONOIDES



OTROS

Ácidos grasos poliinsaturados
 Aminoácidos libres
 Carbohidrtados
 Carotenos
 Minerales
 Proteínas
 Parkintin

PARKINSONINAS



ROTENOIDES

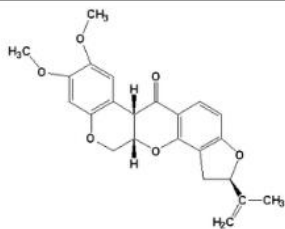


Figura 3.2. Metabolitos más abundantes en *Parkinsonia spp.* Fuente B. Divya, K. Mruthunjaya, S.N. Manjula, *Parkinsonia aculeata*: A Phytopharmacological review, Asian J. Plant Sci. 10 (2011) 175–181. doi:10.3923/ajps.2011.175.181.

Materiales y métodos

Materiales

El ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl_4), el nitrato de plata al 99% (AgNO_3), el cloruro férrico (FeCl_3), el 2,2-difenil-1-picilhidrazilo (DPPH), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El ácido nítrico (HNO_3), el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido acético glacial (CH_3COOH) se adquirieron de Fermont (Monterrey, NL México). Los discos de antibióticos de tetraciclina y vancomicina se adquirieron de Becton Dickinson (Sparks, MD, EE. UU.), el agar Mueller-Hinton (MHA), la sal de manitol y el agar eosina azul de metileno (EMB) se compraron de MCDLAB (Tlalnepantla. Edo de México). El Cultivo de células de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron proporcionados por el laboratorio de microbiología de la Universidad de Sonora.

Preparación de extracto de hojas de *Parkinsonia florida*

El extracto de *P. florida* se utilizó para preparar las nanopartículas metálicas adaptando métodos de literatura bien conocidos de extracción [38]. Brevemente, se recogieron hojas frescas de *P. florida* del campus de la Universidad de Sonora (Hermosillo, Sonora, México) (Latitud 29.081890, Longitud - 110.959947) en abril, noviembre y enero. Se limpiaron con agua corriente y agua destilada para eliminar los desechos y otros contenidos orgánicos contaminados. Posteriormente, las hojas limpias se secaron al aire a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, 3 g de hojas secas finamente cortadas se agregaron a un matraz de vidrio que contenía 100 ml de agua desionizada y se dejaron en ebullición durante 30 minutos. El extracto se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro Whatman n.º 1 y se almacenó a 4°C para su uso posterior. Un pequeño volumen de extracto fue liofilizado para su posterior análisis.

Análisis fitoquímico del extracto de *P. florida*

Se investigaron las características fitoquímicas del extracto de *P. florida* para detectar la presencia de carbohidratos, alcaloides, saponinas, proteínas, fenoles, flavonoides y glucósidos cardíacos siguiendo los métodos de bioquímica estándar [38]. Mediciones de FT-IR se llevaron a cabo mediante reflectancia total atenuada (ATR) utilizando un espectrómetro Spectrum Two FT-IR (Perkin-Elmer), colocando las muestras liofilizadas directamente en el cristal ATR y el espectro se recogió en el intervalo de 4000-500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

Ensayo de eliminación de radicales sin DPPH

Uno de los métodos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos fue mediante el uso del radical libre DPPH que previamente fue reportado por Cheel y col. con algunas modificaciones [39]. El ensayo se basa en las diferencias de absorbancias producidas por la reacción de radical libre de DPPH con el hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Brevemente, se añadieron en una placa de 96 pozos de ELISA marca Costar Corning N.Y. USA, 20 μl de extracto a varias concentraciones (125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$), y 200 μL de una solución de 0.06 nM DPPH Sigma en metanol ajustando la absorbancia a 0.7 a una longitud de onda de 515 nm, se usó Trolox como control y una solución blanco, preparada de la misma manera que las mezclas de prueba, usando metanol en lugar de extracto o Trolox y DPPH. Las placas se incubaron por 30 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 515 nm. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. El grado de decoloración es proporcional a la eficiencia del extracto. El porcentaje de decoloración (efecto inhibitorio, IE%) se calcula a partir del porcentaje de la diferencia entre la absorbancia del control y la muestra sobre la absorbancia del control, y los resultados se informan como equivalentes de Trolox. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se realizó adaptando los métodos de síntesis verde de la literatura [73,136]. Brevemente, Se prepararon 10 ml de solución madre 0.1M AgNO₃. Luego, el nitrato de plata se mezcló con diferentes concentraciones del extracto de hoja de *P. florida* (4.35, 8.70, 13.05, 17.4 y 21.5 µg/ml de equivalentes Trolox), manteniendo constante la concentración final de nitrato de plata a 0.2 mM. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, las AgNPs se lavaron por centrifugación a 5000 rpm (2598 × g) durante 20 min y se resuspendieron en agua desionizada (DI). Una alícuota de la suspensión purificada se liofilizó y se analizó por FT-IR. La suspensión restante purificada de nanopartículas se mantuvo a temperatura ambiente y se analizó durante varias semanas.

Síntesis de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) se sintetizaron de manera similar a las nanopartículas de plata. Diferentes cantidades de una solución madre de HAuCl₄ 0.01% en peso se mezclaron con el extracto de *P. florida* con 4.35, 8.70, 13.05, 17.4 y 21.5 µg/ml de equivalentes Trolox respectivamente y se dejaron reaccionar durante 24h, manteniendo constante la concentración final de oro (2mM). Finalmente, las AuNPs se lavaron por centrifugación a 5000 rpm (2598 × g) durante 20 minutos y se resuspendieron en agua desionizada (DI). Una alícuota de la suspensión purificada se liofilizó y analizó por FT-IR. La solución restante purificada se mantuvo a temperatura ambiente y se analizó durante varias semanas.

Estudio de repetibilidad

Los estudios de repetibilidad de las mediciones determinan qué parte de la variación observada en el proceso se debe al sistema de medición usado. La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados. La misma se define, de acuerdo con el Vocabulario Internacional de Metrología, como la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de

medición, donde: 1. Estas condiciones son llamadas condiciones de repetibilidad. 2. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición, utilizado bajo las mismas condiciones, el mismo lugar, repetición en un período corto de tiempo [137].

Caracterización de las nanopartículas metálicas

Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM-7800F equipado con un detector STEM (DebenUKLtd, Londres). Las muestras se inmovilizaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono. La estabilidad coloidal fue evaluada midiendo el potencial zeta de las nanopartículas, utilizando un Malvern ZetaSizer Nano ZS equipado con un láser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$), utilizando células capilares plegadas (DTS1070). Los espectros de absorción óptica se adquirieron en un espectrofotómetro UV 6300PC (VWR, Radnor, PA, EE. UU.).

Actividad antibacterial de las nanopartículas de plata

Los ensayos antibacterianos de las AgNPs se evaluaron mediante el método de Kirby Bauer [138] contra microorganismos patógenos humanos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativos (*Escherichia coli*) cultivados en Medio agar Mueller-Hinton a 37°C durante 24h. De las colonias bacterianas recientemente cultivadas de los patógenos probados se tomaron 0,05 ml de inóculo y se extendieron en placas de agar Mueller-Hinton. Se prepararon discos (6 mm de diámetro) de papel filtro estéril Whatman que se cargaron con 2, 4 y 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de AgNPs. El extracto vegetal de *P. florida*, discos de antibióticos de vancomicina 5 μg y tetraciclina 10 μg (BDBBL Sensi-disc) y AgNO_3 como control se colocaron en cada placa y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las placas fueron examinadas para evaluar la presencia de zonas de inhibición, indicadas por el área despejada alrededor de los discos. Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición y se registró el valor medio para cada organismo.

Resultados y Discusión

Evaluación fitoquímica del extracto de hojas de *Parkinsonia florida*

Los resultados del examen fitoquímico para el extracto de *P. florida* mostraron la presencia de contenido moderado de flavonoides, como se observa en la tabla 3.1. Los flavonoides han sido reportados previamente en plantas de *Parkinsonia spp.* [64]. Además, se ha informado de moléculas como orientina, vitexina y epi-orientina en plantas de la especie *Parkinsonia* [132]. Los resultados también mostraron un bajo contenido de saponinas. Estos resultados están en concordancia con otros informes, donde se observa la presencia de bajo contenido de saponinas, incluso utilizando diferentes disolventes para extracción [139,140]. Mediante el uso de diferentes métodos de extracción y diferentes solventes es posible obtener diferentes contenidos de las moléculas de interés [64]. Los resultados del análisis fitoquímico del extracto de *P. florida* revelaron la presencia de contenido moderado de carbohidratos, fenoles y proteínas. Además, no se encontraron glucósidos cardiacos en el extracto de *P. florida* y también dieron negativo en la presencia de alcaloides.

Tabla 3.1. Análisis fitoquímico del extracto acuoso de *P. florida*.

Componente	Extracto de <i>P. florida</i>
Alcaloides	NP
Carbohidratos	+
Saponinas	+
Fenoles	+
Flavonoides	+
Proteínas	+
Glucósidos Cardiacos	NP

+ = Presente

NP = No está presente

La actividad de estabilización de radicales libres de DPPH se usó para cuantificar el contenido de antioxidantes en el extracto de *P. florida* para asegurar la reproducibilidad en la síntesis de nanopartículas, dado que es una mezcla compleja. El reactivo DPPH reacciona con el átomo de hidrogeno proporcionado por

el agente antioxidante que pueden servir como agentes reductores. De esta manera, la evaluación de la actividad antioxidante puede servir como control de calidad durante la reacción, evitando las variaciones relacionadas con la variación de planta a planta o estacional en relación al contenido de antioxidantes. Los valores de los datos obtenidos del análisis de DPPH se presentan en la tabla 3.2. El extracto de *P. florida* muestra una proporcionalidad logarítmica en relación a los equivalentes Trolox, como se puede observar en la figura 3.3. Este resultado podría ayudar a predecir la cantidad de equivalentes Trolox relacionados a la concentración del extracto.

Tabla 3. 2. Actividad Antioxidante del extracto acuoso de *P. florida* en equivalentes Trolox

Extracto <i>P. florida</i> (µg/ml)	Equivalente Trolox (µg/ml)
125	4.35
250	8.70
500	13.05
1000	17.40
2000	21.50

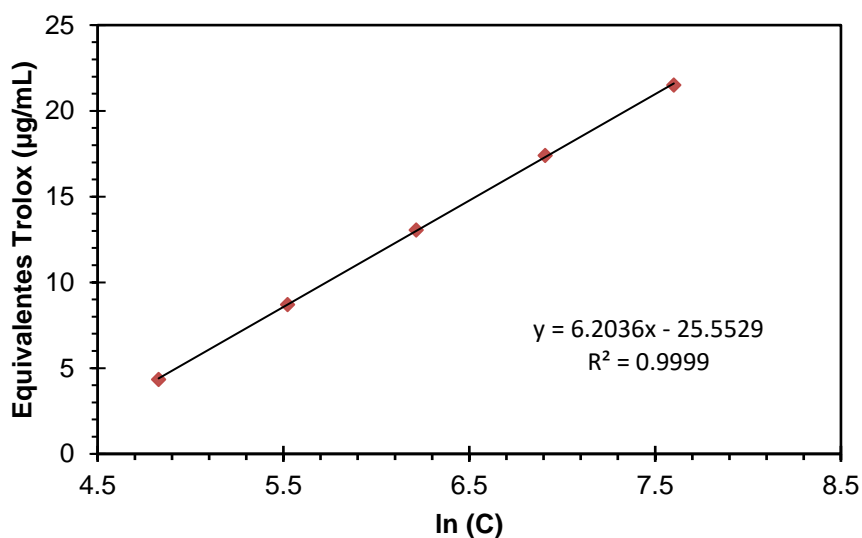


Figura 3.3 Relación logarítmica de la concentración del extracto de *P. florida* vs equivalentes Trolox.

Análisis de FT-IR del extracto de *P. florida* y las nanopartículas metálicas

El extracto de *P. florida* y las nanopartículas metálicas se analizaron por FT-IR para identificar las posibles biomoléculas responsables de la formación y estabilización de las nanopartículas metálicas. Todas las muestras, incluyendo el extracto de *P. florida* y las nanopartículas, presentaron bandas intensas a 3209 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} , 1392 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} y 843 cm^{-1} , relacionados con diferentes grupos funcionales, como se puede observar en la figura 3.4. Estas bandas corresponden a las biomoléculas adsorbidas en la superficie de la nanopartículas. Dado que las bandas están presentes tanto en nanopartículas como en el extracto, también indica que las biomoléculas influyen en la formación de nanopartículas metálicas y en su estabilización coloidal en el medio acuoso. La banda fuerte observada a 3209 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estrechamiento O-H de ácidos carboxílicos y grupos fenólicos. El pico a 2932 cm^{-1} podría asignarse a vibraciones de estiramiento de $-\text{CH}_2-$. La banda observada a 1580 cm^{-1} se puede identificar como una amida I y surge debido a las vibraciones de estiramiento de carbonilo en los enlaces amida de las proteínas. La banda observada a 1385 cm^{-1} corresponde al estiramiento de C-N en compuestos que contienen nitrógeno. Las bandas centradas en 1078 cm^{-1} y 1023 cm^{-1} se suelen asignar a vibraciones C-OH y a la vibración en modo de flexión de $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$, respectivamente. La banda a 669 cm^{-1} podría ser la flexión en el plano de vibraciones de grupos N-H. Estos resultados sugieren que biomoléculas específicas como fenoles, proteínas, aminoácidos, saponinas y los flavonoides presentes en el extracto de hoja de *P. florida* podrían haber participado en la reducción química de las sales metálicas y proporcionar una mayor estabilidad coloidal.

Además, los grupos funcionales observados por FT-IR del extracto en comparación con los resultados del examen fitoquímico, respaldan el papel de la modificación de la superficie por la presencia de residuos de fenoles, proteínas, aminoácidos, saponinas y flavonoides. Los flavonoides tienen grupos funcionales que puede quelar activamente iones metálicos y puede tener un papel importante en la reducción de metales debido a las transformaciones tautoméricas de la forma

enol a la forma ceto que puede liberar un átomo de hidrógeno reactivo y a su vez reducir iones metálicos [141]. Varios aminoácidos pueden desempeñar un papel de agentes reductores en la formación de nanopartículas metálicas y en la estabilización de las mismas uniéndose a iones metálicos. Este papel de los aminoácidos ha sido ampliamente discutido y analizado en la literatura [142,143].

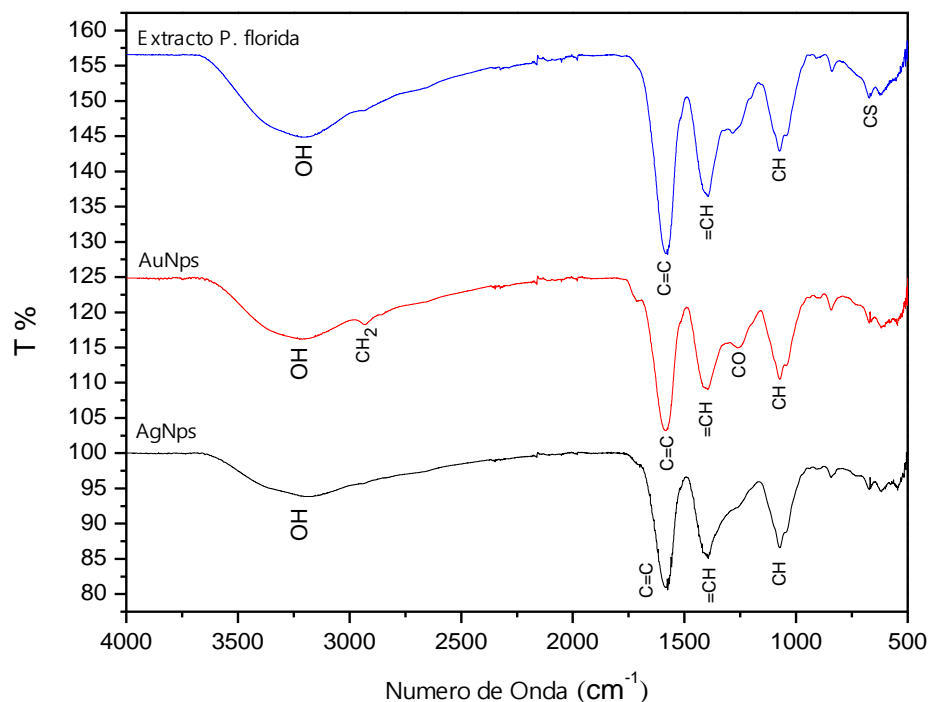


Figura 3.4. Espectro de FT-IR de extracto de *P. florida*, AuNPs y AgNPs.

Caracterización de nanopartículas

Las AuNPs y AgNPs exhiben colores característicos en soluciones acuosas debido a las vibraciones de superficie derivadas de la excitación de su plasmón de resonancia respectivo. Estas soluciones coloidales exhiben un color rojo rubí en el caso de las nanopartículas de oro sintetizadas y un color marrón amarillento en el caso concreto de las soluciones de nanopartículas de plata. La reducción de los iones de oro y plata para formar nanopartículas durante su exposición al extracto de *P. florida* puede seguirse a través de espectroscopia de absorción óptica [127]. La figura 3.5 (a) muestra las bandas de resonancia del plasmón de superficie para AuNPs preparadas con extracto de *P. florida* con diferentes equivalentes Trolox. La

máxima absorción se alcanzó para AuNPs preparadas en el rango de 4.35 a 17.40 $\mu\text{g/ml}$ de equivalentes Trolox mostrando absorbancias alrededor de 550 nm.

Un desplazamiento se observa de la banda de absorbancia a 562 nm cuando se usan 21.50 $\mu\text{g/ml}$ de equivalentes Trolox en la síntesis. Además, la intensidad de la banda de absorbancia es inversamente proporcional a los equivalentes Trolox en el rango de 4.35 a 17.40 $\mu\text{g/ml}$. Este comportamiento muestra que, al aumentar la concentración del extracto de *P. florida*, se mejora la reducción de las nanopartículas de oro; por lo tanto, se puede obtener un número reducido de partículas pero con diámetros mayores. Cuando se usan 21.50 $\mu\text{g/ml}$ de equivalentes Trolox, se puede observar un aumento de la intensidad de una banda de absorbancia con respecto a las concentraciones equivalentes de Trolox anteriores. Este aumento de la intensidad puede indicar que pueden surgir otras morfologías o agregaciones a concentraciones más altas del extracto de *P. florida*. Las bandas de resonancia del plasmón de superficie para AgNPs preparadas con diferentes equivalentes Trolox son presentado en la figura 3.5 (b). Las bandas de absorbancia máxima para AgNPs estaban en un rango cercano de 444 a 462 nm, pero las preparaciones con 8.70 a 17.40 $\mu\text{g/ml}$ de equivalentes Trolox presentaron una banda máxima alrededor de 462 nm. Además, en el mismo rango de equivalentes Trolox se pudo observar una proporcionalidad inversa con la intensidad de la banda de absorción. Este comportamiento, también observado en la síntesis de AuNPs, podría deberse a cambios en el diámetro de las nanopartículas además del incremento de equivalente de Trolox. Adicionalmente, a 21.50 $\mu\text{g/ml}$ de equivalentes Trolox, un aumento de la intensidad de la banda de absorbancia, con respecto a las concentraciones de equivalentes Trolox anteriores, se observa y también podría explicarse de manera similar a los AuNPs.

Se simularon los espectros de absorción de nanopartículas de plata y oro en la región de la longitud de onda SPR para una distribución lorentziana, según la teoría de Mie, como se informa en la literatura [144]. Los parámetros desconocidos se determinaron mediante un algoritmo de regresión no lineal de MATLAB® (MathWorks, EE. UU.). Los ajustes lorentzianos para todas las nanopartículas preparadas en este trabajo se presentan en la figura 3.6.

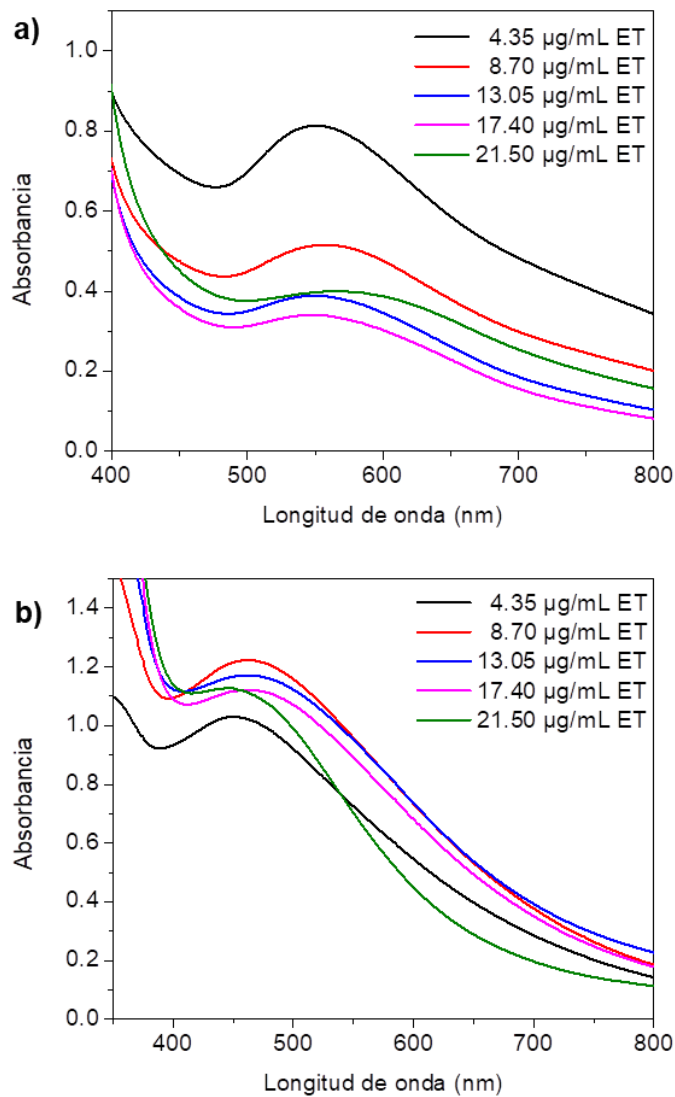


Figura 3.5 Espectros de absorción óptica de (a) nanopartículas de oro y (b) plata sintetizadas con diferentes concentraciones en Equivalente Trolox (ET) del extracto de hojas de *P. florida* .

Se obtuvieron buenos coeficientes de correlación y similitudes entre las bandas de resonancia de plasmones de superficie para los valores experimentales y los valores teóricos para todas las preparaciones, como se puede observar en la tabla 3.3; estos resultados indican que la teoría de Mie era adecuada para analizar

los datos experimentales. El ancho estimado medio máximo se correlaciona con la polidispersidad de nanopartículas; entonces, la polidispersidad de las nanopartículas de oro aumenta con un aumento de concentración de equivalentes Trolox (v. tabla 3.3). Este resultado respalda la noción establecida antes de que las morfologías o agregaciones están relacionadas a la concentración del extracto de hojas de *P. florida*. Similarmente, la polidispersidad de las nanopartículas de plata aumentó de 4.35 $\mu\text{g/ml}$ a 17.40 $\mu\text{g/ml}$; luego, a mayores concentraciones de equivalentes Trolox, la polidispersidad de las nanopartículas de plata y su diámetro promedio disminuye considerablemente como se ve en la tabla 3.3.

Las micrografías STEM y los histogramas de las AuNPs se presentan en la figura 3.7. Las partículas presentan morfología cuasiesférica. Los histogramas muestran que el tamaño del diámetro de las AuNPs se mantiene dentro de un rango cercano para todas las preparaciones. Además, la polidispersidad de las AuNPs es baja para todas las preparaciones, excepto las preparadas en 4.35 $\mu\text{g/ml}$ de equivalentes Trolox, donde se observan más variaciones de tamaño. El diámetro promedio de las AuNPs se obtuvo mediante un ajuste gaussiano de histogramas de la figura 3.7), y se presentan en la tabla 3.3.

Los diámetros promedio de las AuNPs presentan una tendencia a aumentar a medida que aumentan los equivalentes Trolox del extracto agregado, pero sin diferencias significativas. Se han reportado tamaños similares para las nanopartículas de oro sintetizadas con extractos acuosos y etanólicos de amaranto, con diámetros medios de 7.7 ± 2.0 nm y 17.5 ± 5.3 nm respectivamente [145].

Las micrografías STEM y los histogramas de las AgNPs se presentan en la figura 3.8. Las AgNPs presentan un aspecto casi esférico. La morfología para todas las preparaciones y los tamaños de diámetro pueden variar con la concentración del extracto, como puede ser observado en la tabla 3.3. Los valores del tamaño del diámetro se obtuvieron a partir de un ajuste gaussiano de los histogramas de la figura 3.8.

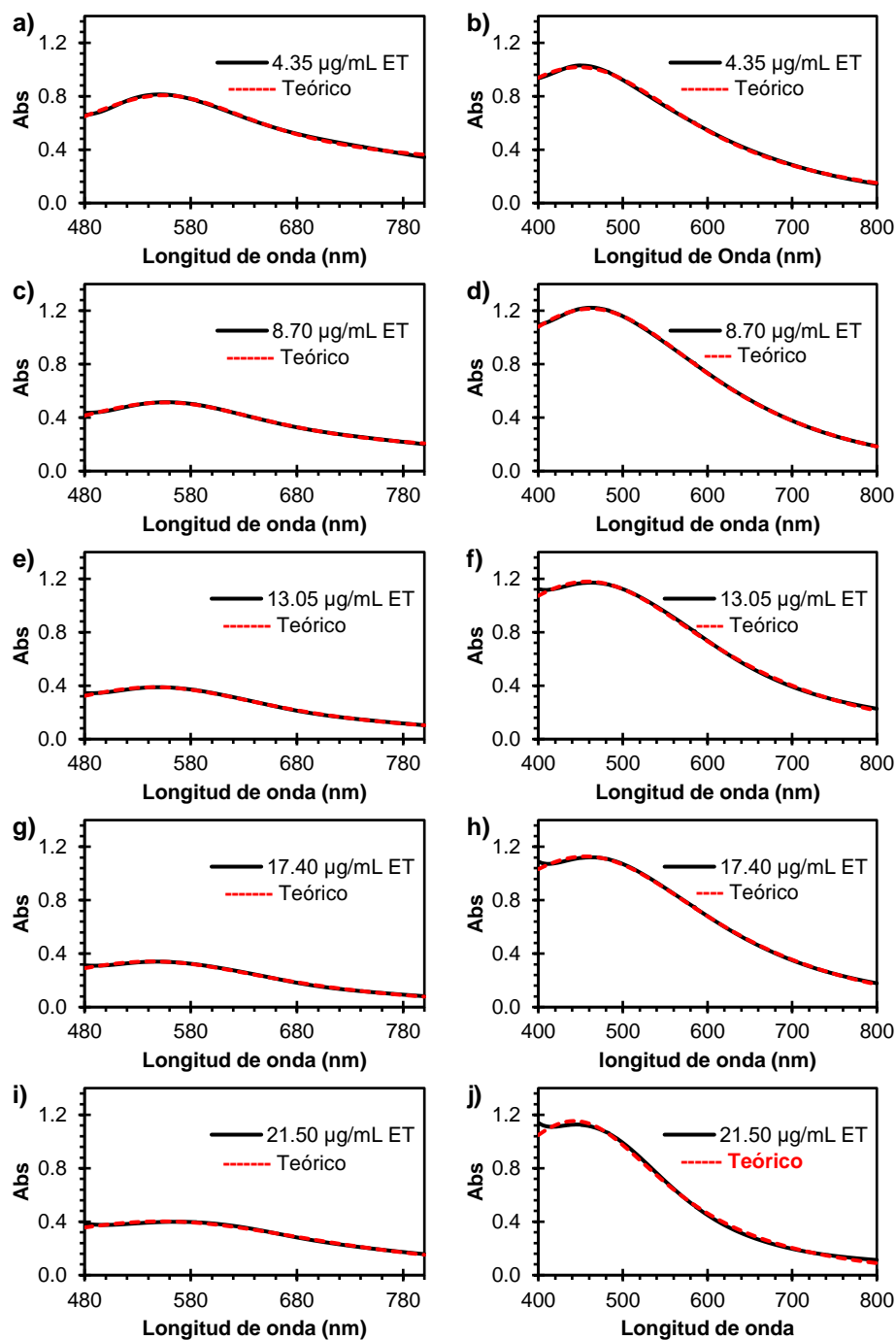


Figura 3.6 Espectros experimentales de absorción (líneas negras) y resultados de ajuste Lorentziano (línea roja) para soluciones de nanopartículas preparadas a diferentes concentraciones de equivalentes Trolox (ET). a) y b) AuNPs y AgNPs respectivamente a 4.35 µg/ml ET; c) y d) AuNPs y AgNPs a 8.70 µg/ml ET; e) y f) AuNPs y AgNPs 13.05 µg / ml ET. g) y h) AuNPs y AgNPs a 17.40 µg/ml ET; y finalmente i) y j) AuNPs y AgNPs a 21.50 µg/ml ET.

Las nanopartículas obtenidas tienden a disminuir su tamaño a medida que aumenta la concentración del extracto, a excepción de la menor muestra concentrada.

A medida que aumenta la concentración del extracto, una cantidad más significativa de núcleos de partículas se forman, lo que resulta en un tamaño de partícula reducido. De los resultados mencionados anteriormente, se puede inferir que el oro y la formación de nanopartículas de plata siguen diferentes mecanismos de reacción, un fenómeno que podría estar relacionado con las diferencias en valencia y radios iónicos de los metales. Se sintetizaron nanopartículas de plata con un tamaño similar usando *Brassica juncea* (hojas de mostaza) y *Medicago sativa* (alfalfa) [141].

Li et al., sintetizaron nanopartículas de plata tratando iones de plata con extracto de *Capsicum annuum L.* obteniendo AgNPs con un tamaño diferente de entre 10 nm y 40 nm [146]. Xin-Huang et al, sintetizaron nanopartículas de oro en el rango de 7.2 a 12.8 nm [147] usando bayberry tanino.

Con base en la literatura, otros investigadores han encontrado el uso de enfoques similares donde sintetizaron estructuras de nanopartículas que siguen una naturaleza cristalina con celosía cúbica centrada en la cara para el oro [148,149], y algo en la misma línea con una red cúbica centrada en la cara para plata [148,150,151]. Por lo tanto, esperamos tener una estructura bastante similar a las reportadas en la literatura, ya que los procesos de síntesis son similares

Tabla 3.3 Diámetro del tamaño de partícula de nanopartículas de oro y plata sintetizadas con extracto de hoja de *P. florida*.

Eq. Trolox ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		Max. Longitud de onda del plasmón de resonancia (nm)	Max. Longitud de onda del plasmón de resonancia del ajuste lorentziano	Ancho a la mitad máximo del ajuste lorentziano (nm)	Coefficiente de correlación (R2) Ajuste lorentziano	Diámetro medio de tamaño (nm) de Histogramas STEM
AuNPs	4.35	551	554	116.9634	0.9991	11 ± 3
	8.70	557	556	132.8796	0.9995	10 ± 1
	13.05	551	546	16.1463	0.9994	12 ± 2
	17.40	546	543	157.3771	0.9990	13 ± 2
	21.50	562	552	209.7456	0.9973	15 ± 2
AgNPs	4.35	450	448	169.9689	0.9998	17 ± 2
	8.70	462	462	183.5814	0.9999	57 ± 6
	13.05	462	458	192.9360	0.9997	47 ± 2
	17.40	461	456	195.1128	0.9997	38 ± 2
	21.50	444	442	138.0952	0.9989	10 ± 1

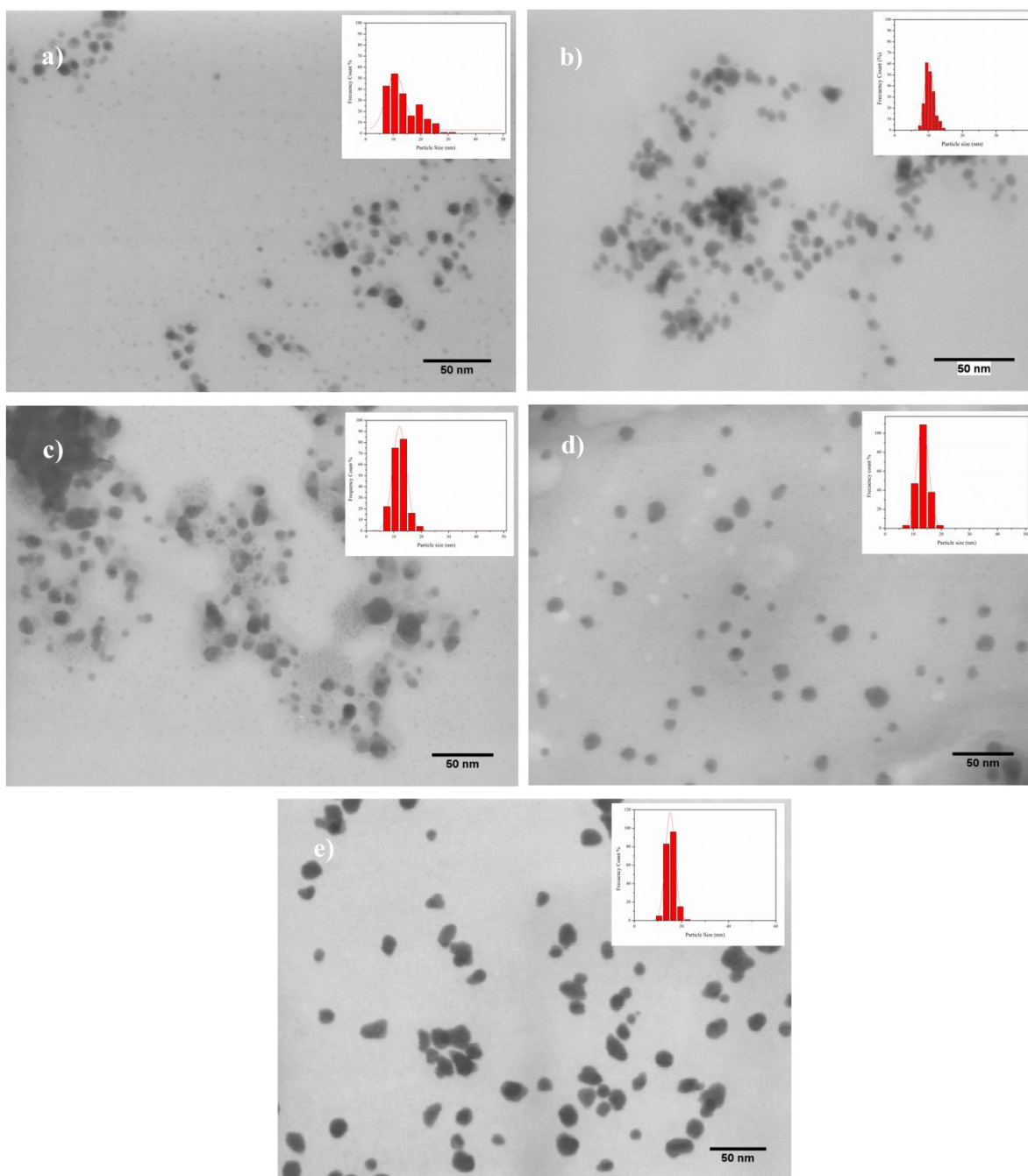


Figura 3.7 Micrografías STEM de las AuNPs formadas por reducción de iones de oro usando extracto de *Parkinsonia florida* como agente reductor, a diferentes concentraciones. a) 4.35, b) 8.71, c) 13.05, d) 17.4 y e) 21.5 ug/ml de equivalentes Trolox respectivamente. Los recuadros muestran el histograma de distribución de tamaños de cada muestra.

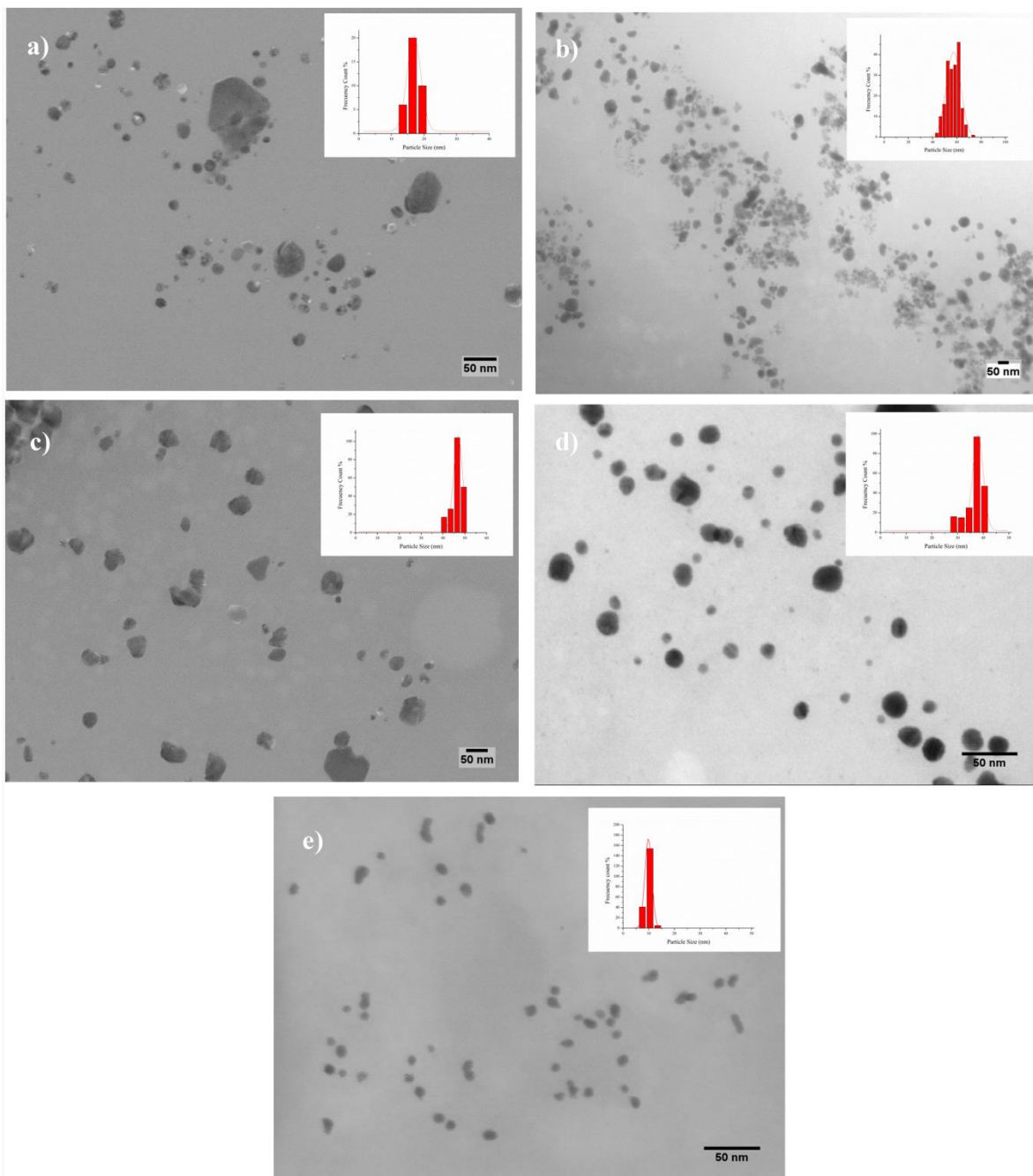


Figura 3.8. Micrográficas STEM de AgNPs formadas por reducción de iones de plata usando extracto de *Parkinsonia florida* como agente reductor, a diferentes concentraciones. a) 4.35, b) 8.7, c) 13.05, d) 17.4 y e) 21.5 ug/ml de equivalentes Trolox respectivamente. Los recuadros muestran el histograma de distribución de tamaños de cada muestra.

Potencial zeta

Las mediciones del potencial zeta se llevaron a cabo 24 h después de la síntesis de partículas, y los resultados se presentan en la figura 3.9. Las AuNPs presentaron

valores negativos de potencial zeta en el rango de -10 ± 1 a -16 ± 1 mV. Estos resultados son similares a otros estudios donde preparan AuNPs utilizando extractos de hojas [152]. Los valores de potencial zeta de las AuNPs son variables y no presentan tendencia respecto a la concentración de extracto utilizada en la síntesis, similar a los resultados obtenidos del análisis STEM.

De manera similar, las muestras de las AgNPs presentaron valores negativos de potencial zeta en el rango de -5 ± 1 a -16 ± 1 mV. Los valores de potencial zeta de las AgNPs tienden a disminuir a medida que aumenta la concentración de extracto de *P. florida*. Este efecto puede estar relacionado con un aumento en el número de sitios de nucleación para la formación de nanopartículas; conduciendo a un número más significativo de nanopartículas que cuando se utiliza menos extracto, pero con diámetros más pequeños (como se pudo verificar en Tabla 3.3). Luego, se obtienen nanopartículas con el área de superficie más grande usando más extracto y más moléculas podrían adsorberse en la superficie, aumentando su carga neta y mejorando su estabilidad coloidal.

Heydari y Rashidipour informaron resultados similares cuando prepararon AgNPs con extracto de fruta de roble (-25.3 mV) [53]. Las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de hoja de *Calliandra haematocephala* mostraron un valor de potencial zeta de -17.2 mV [54], y un valor potencial zeta de -24.1 mV se informó en AgNPs sintetizadas utilizando un extracto de hoja de *Urtica dioica Linn* [55]. La carga negativa obtenida a través de estos métodos no puede explicarse con certeza, debido a la presencia de varias moléculas en los extractos que no han sido identificados y su caracterización está lejos del alcance de este trabajo. Aunque el FT-IR discutido en la figura 3.4 muestra la presencia de enlaces C-S, estos grupos generalmente indican la presencia de grupos funcionales similares a tiol; que a cierto pH se puede desprotonar induciendo el cambio de potencial zeta hacia la región negativa, así como a otras moléculas del extracto [153].

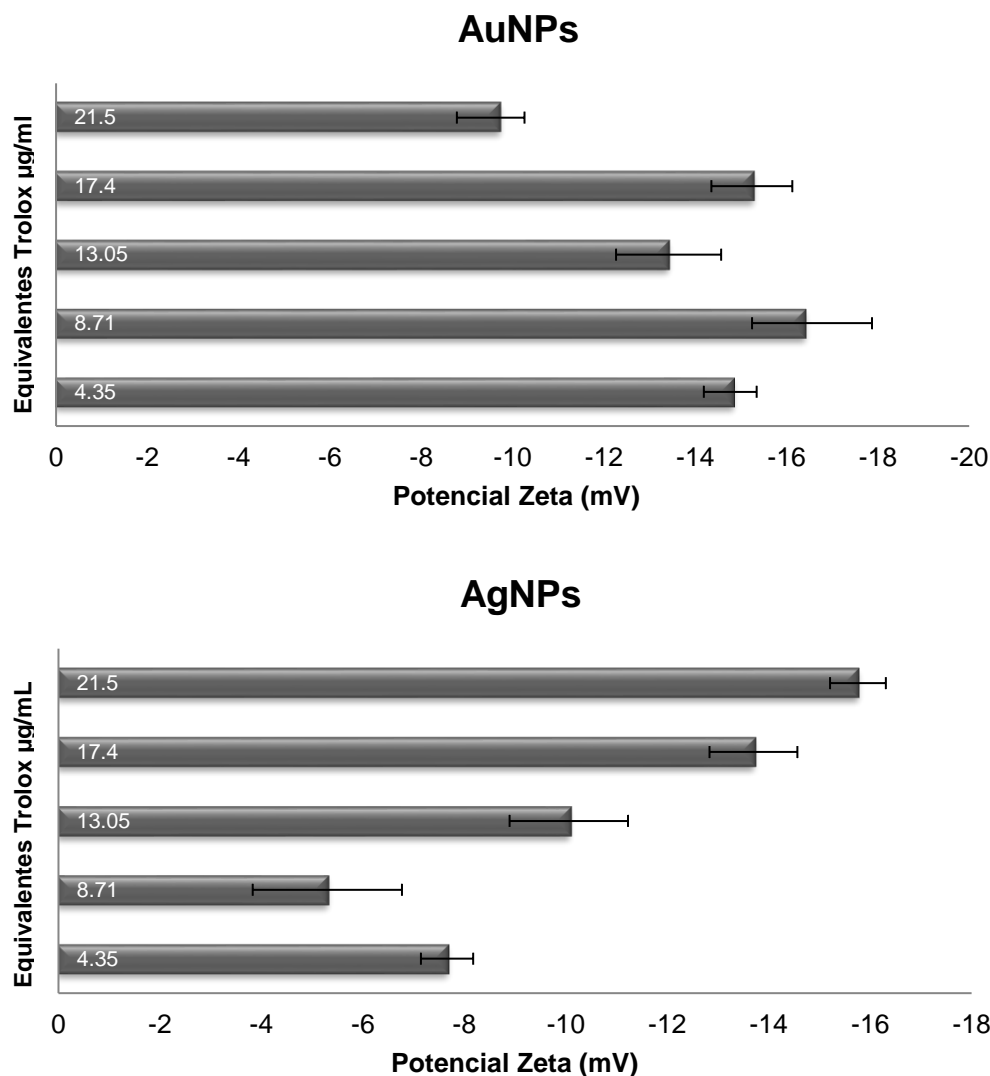


Figura 3.9. Valores de potencial zeta de nanopartículas metálicas preparadas con diferentes concentraciones de extracto de hojas de *P. florida* expresados en ug/ml de equivalentes Trolox de. (a) AuNPs y (b) AgNPs.

Actividad antimicrobiana.

La actividad antibacteriana de las AgNPs se investigó contra *S. aureus* y *E. coli* utilizando el método de difusión en agar. El diámetro de la zona de inhibición (milímetro) se muestra en la tabla 3.4 y en la figura 3.10 respectivamente. En el presente estudio, se encontró que la zona de inhibición para las AgNPs era 12mm contra *S. aureus* y 7.8 mm para *E. coli*. El extracto de *P. florida* no muestra actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Por otro lado, las AgNPs mostraron una mejor actividad antibacteriana en comparación con la

solución de AgNO_3 . Las AgNPs exhibieron buena actividad antibacteriana contra *S. aureus* y menor actividad antibacteriana contra *E. coli* (v. tabla 3.4, figura 3.10).

Actualmente no está bien definida la acción inhibitoria de las nanopartículas metálicas sobre los microorganismos, sin embargo se sugiere que la actividad antibacteriana puede ser posible debido a la presencia de iones Ag^+ liberados por las AgNPs, que actúan como un agente antibacteriano [154]. Feng et al propusieron dos mecanismos antibacterianos de iones de plata (1) los iones de plata pueden interactuar con grupos tiol en proteínas que inactivan la actividad enzimática y (2) los iones de plata pueden condensar las moléculas de ADN y hacer que pierdan sus habilidades de replicación [32].

Además, Li et al propusieron un mecanismo antimicrobiano de las AgNPs contra *S. aureus*, sugiriendo que las partículas probablemente puedan sobrepasar la pared celular e interactuar con la membrana celular para paralizar algunas enzimas e interferir con el metabolismo normal de las células, luego las AgNPs entrarían en las células bacterianas y condensarían el ADN para evitar su replicación, evitando la reproducción celular. Finalmente, la interacción con la pared celular y la membrana celular destruye a los microorganismos, induciendo la muerte bacteriana [155].

Por otro lado, diferentes informes en la literatura concluyen que se producen cambios significativos en la estructura de la membrana de *E. coli* como resultado de la interacción con iones de plata, lo que lleva a un aumento de la permeabilidad de la membrana y la consiguiente muerte de la bacteria [32,45].

Tabla 3.4 Resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Patógeno	Diámetro de zona de inhibición (mm)							
	Controles				AgNPs			
	Tetraciclina (10 µg)	Vancomicina (5 µg)	Extracto <i>P. florida</i> (8 µg/µl)	<i>P. AgNO</i> (17 µg/µl)	8 µg/µl	4 µg/µl	2 µg/µl	
<i>S. aureus</i>	33	10	0	9.3	12.5	11.7	10.5	
<i>E. coli</i>	27	0	0	7.2	7.8	6.5	5	

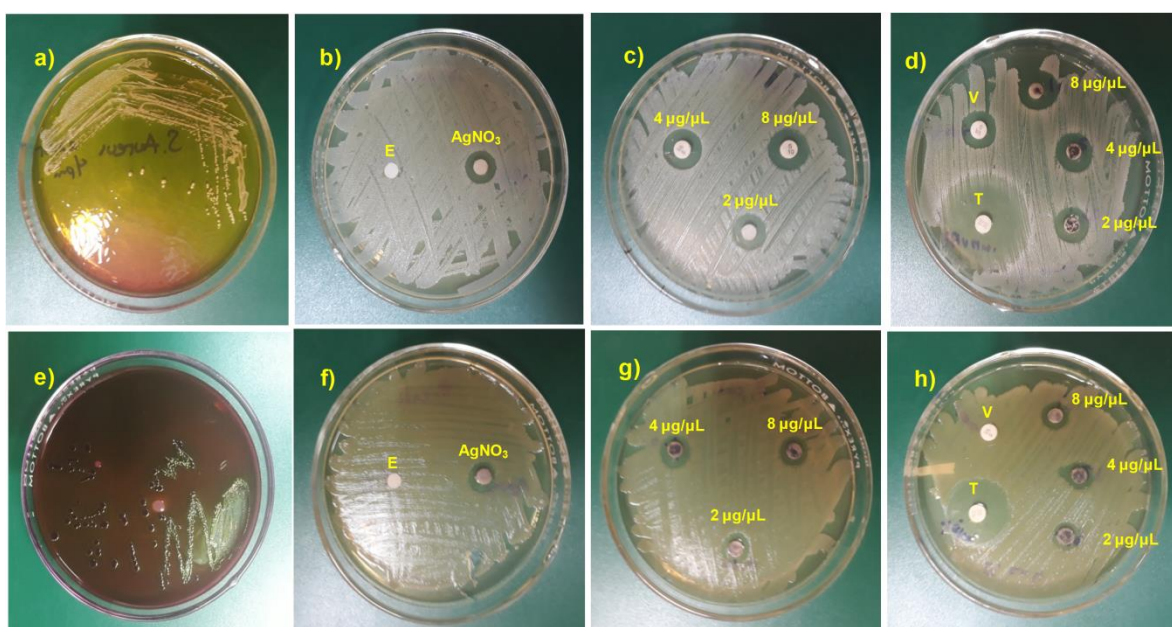


Figura 3.10 Prueba de susceptibilidad microbiana de AgNPs contra *S. aureus* (a) - (d) y *E. coli* (e) - (h).

Conclusiones

Este trabajo describe un método para la preparación de nanopartículas de oro y plata usando un extracto de hojas de *P. florida* como agente reductor y estabilizador.

El extracto es un agente reductor activo para formar nanopartículas metálicas a temperatura ambiente sin ningún reactivo o tratamiento adicional. Biomoléculas como aminoácidos, saponinas y flavonoides están presentes en el extracto de *P. florida* y pueden haber participado en la reducción química de las sales metálicas y además de proporcionar estabilidad coloidal. La biosíntesis es eficiente y reproducible y muestra potencial para aplicaciones prácticas. Las AgNPs sintetizadas mostraron una buena actividad antibacteriana en comparación con los antibióticos convencionales contra *S. aureus* y *E. coli*. El método de síntesis de AgNPs y AuNPs usando extractos de *P. florida* es ecológico y sencillo.

CAPITULO IV

Conclusiones y Recomendaciones

Las nanopartículas metálicas poseen interesantes propiedades fisicoquímicas que les confieren diferentes aplicaciones. Actualmente, pueden ser sintetizadas y/o modificadas a través de diferentes grupos químicos funcionales que hacen posible por ejemplo que nanopartículas de oro puedan conjugarse con anticuerpos, ligandos o fármacos de interés biológico abriendo con ello la posibilidad de aplicaciones potenciales para suministro dirigidos de fármacos, como vehículos para el desarrollo de terapias génicas, además de mejorar las técnicas de diagnóstico por imagen, funcionando como agentes de contraste.

Las nanopartículas metálicas de plata elaboradas en el presente trabajo encuentran aplicación en el área biomédica y farmacéutica como una alternativa estratégica antimicrobiana que puede ser propuesta y evaluada en futuros trabajos ante la aparición de cepas resistentes a los antibióticos. Debido a que los métodos de síntesis convencionales por medios químicos pueden plantear riesgos biológicos y tener efectos adversos, la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas surge como un enfoque alternativo a estas técnicas. Tentativamente las nanopartículas desarrolladas por síntesis verde durante el presente trabajo son biológicamente menos tóxicas, amigables con el medio ambiente, y con la posibilidad de ser sintetizadas rápidamente y de manera rentable. Las biomoléculas del extracto utilizado de *Parkinsonia florida* estarían actuando como agentes reductores y protectores, aportando estabilidad a las nanopartículas.

CAPITULO V

Referencias

- [1] S.D. Solomon, M. Bahadory, A. V Jeyarajasingam, S.A. Rutkowsky, C. Boritz, *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles*, 84 (2007) 322–325.
- [2] K.M.M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R.A.A. Ammar, *Synthesis and applications of silver nanoparticles*, Arab. J. Chem. 3 (2010) 135–140. doi:10.1016/j.arabjc.2010.04.008.
- [3] C. Buzea, I.I.P. Blandino, K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity*, 2 (2007) 1–103.
- [4] R.A. Guillermo Foladori, Edgar Arteaga Figueroa, Eduardo Robles-Belmont, Edgar Záyago Lau, *Cadena de valor de las nanotecnologías en México*, Rev. Digit. Univ. RDU. 17 (2016) 1–8. <http://www.revista.unam.mx/ojs/index.php/rdu/article/view/635>.
- [5] É. Záyago Lau, G. Foladori, R. Appelbaum, E. Arteaga Figueroa, *Empresas nanotecnológicas en México: hacia un primer inventario*, Estud. Soc. Rev. Investig. Científica. 21 (2013) 9–25.
- [6] Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C., *Diagnóstico y Prospectiva de la Mecatrónica en México.*, (2008). http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/Estudios/Diagnostico_Prospectiva_Mecatronica_Mexico.PDF.
- [7] A. Urquilla, *Impacto de la nanotecnología como revolución industrial a nivel mundial*, Real. y Reflexión. 49 (2019) 66–78. doi:10.5377/ryr.v49i49.8063.
- [8] G. Foladori, E. Zayago, *México se incorpora a la nueva revolución industrial de las nanotecnologías* Guillermo Foladori 1 Edgar Zayago 2, (2016) 1–17.
- [9] INEGI, *Encuesta sobre investigación y desarrollo tecnológico y módulo sobre actividades de biotecnología y nanotecnología 2012: Síntesis metodológica ESIDET - MBN*, (2014) 299.
- [10] R. Appelbaum, E. Zayago Lau, G. Foladori, R. Parker, L.L.V. Vazquez, E.R. Belmont, E.R.A. Figueroa, *Inventory of nanotechnology companies in Mexico*, J. Nanoparticle Res. 18 (2016) 1–13. doi:10.1007/s11051-016-3344-y.

- [11] P. Hatto, ISO consensus definitions relevant to nanomaterials and nanotechnologies International Organization for Standardization, (2011) 1–12.
- [12] K.N. Thakkar, S.S. Mhatre, R.Y. Parikh, Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 257–262. doi:10.1016/j.nano.2009.07.002.
- [13] A. V Kabashin, M. Meunier, Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water *Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water*, 7941 (2012) 18–21. doi:10.1063/1.1626793.
- [14] M.G. Guzmán, J. Dille, S. Godet, Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity, (2009) 104–111.
- [15] P. Heera, S. Shanmugam, J. Ramachandran, Green synthesis of copper nanoparticle using *Gymnema sylvestre* by different solvent extract, *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* 3 (2015) 268–275.
- [16] Poovathinthodiyil Raveendran, and Jie Fu, S.L. Wallen*, Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, (2003). doi:10.1021/JA029267J.
- [17] S.U. Ganaie, T. Abbasi, S.A. Abbasi, Rapid and green synthesis of bimetallic Au–Ag nanoparticles using an otherwise worthless weed *Antigonon leptopus*, *J. Exp. Nanosci.* 11 (2015) 1–23. doi:10.1080/17458080.2015.1070311.
- [18] V. V Makarov, A.J. Love, O. V Sinitsyna, S.S. Makarova, I. V Yaminsky, “Green ” Nanotechnologies : Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants, 6 (2014) 35–44.
- [19] N.A. Stki, M.I. Ro, METAL NANOPARTICLES AND PLANTS Characterization of metal / nanoparticles, 20 (2013) 9–22. doi:10.2478/eces-2013-0001.
- [20] M. Mohammadlou, H. Maghsoudi, H. Jafarizadeh-Malmiri, A review on green silver nanoparticles based on plants: Synthesis, potential applications and eco-friendly approach, *Int. Food Res. J.* 23 (2016) 446–463.
- [21] Q. Zhang, J.Y. Lee, J. Yang, C. Boothroyd, J. Zhang, M.C.B.W.D.F.L. and M.A. Sun S H, H.M.Y.Y. and A.K. Toshima N, W.A.Q.C.Y.S.L.H.P. and M.C.Y. Liu J H, L.J.H.L.S.D.L.T.S. and M.C.Y. Wang A Q, M. P, W.Z.L. and E.-S.M.A.

Link S, M.M.P. and M.C. J, S.R.W.J.G.-M.J.C. and C.R.M. Wilson O M, A.A.K.M.I.S.M. and K.R. Senapati S, H.M.J. et al, K.N.N. et al, C.D.H. and C.C. J, K.K.J.S.C.M.P.A.A. and M.B. Smetana A B, C.Y.H. and Y.C. S, H.S.W. and K.K. Lee I, S.A.V. and S.G.A. Izgaliev A T, P.G. C, M.B.T. and X.Y.N. Sun Y G, W.L.J.B.C.L. and J.L. Liang H P, S.P.R. and S. M, S.Y.G. and X.Y. N, M.M.P.N. and P.T. Mallik K, W.H.S.Z.Y.H.X.S.Q.Z.H.J.J.H.B.W. and Z.B. Lu L H, L.F.G.A. and G.J. Srnova-Sloufova I, Z.L.D. and C.W.P. Shi H Z, T.X.W.C.X. and Y.G.W. Ouyang G, D.T.Z.Z.Y. and M.D. Dick K, Y.H. and M. H, M.H.K.M. and T.K. Yasuda H, D.J.M.B.M. and L.Y. Wonnell S K, D.Y. and E. J, B.B.A.Z.Z.Y.M.D.V.C.F. and G.J.D. Shibata T, Z.T.O.O.G.V.S.S.A. and B.V. V Pavlyukhina L A, T.J.J.K.Y.L. and L.H.F. He B L, B.T.P.W.Z.L.K.J.T. and W.R.L. Murthy S, Size and composition tunable Ag–Au alloy nanoparticles by replacement reactions, *Nanotechnology*. 18 (2007) 245605. doi:10.1088/0957-4484/18/24/245605.

- [22] J. Yang, H. Liu, Introduction, in: *Met. Compos. Nanomater.*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 1–9. doi:10.1007/978-3-319-12220-5_1.
- [23] A. López-Millán, P. Zavala-Rivera, R. Esquivel, R. Carrillo, E. Alvarez-Ramos, R. Moreno-Corral, R. Guzmán-Zamudio, A. Lucero-Acuña, Aqueous-organic phase transfer of gold and silver nanoparticles using thiol-modified oleic acid, *Appl. Sci.* 7 (2017). doi:10.3390/app7030273.
- [24] B. Ankamwar, Size and Shape Effect on Biomedical Applications of Nanomaterials, *Biomed. Eng. - Tech. Appl. Med.* (2012) 20–40. doi:10.5772/46121.
- [25] H. Safari, J. Kin-Hun Lee, O. Eniola-Adefeso, Effects of shape, rigidity, size, and flow on targeting, Elsevier Inc., 2020. doi:10.1016/b978-0-12-816662-8.00005-9.
- [26] J. Natsuki, A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications, *Int. J. Mater. Sci. Appl.* 4 (2015) 325. doi:10.11648/j.ijmsa.20150405.17.
- [27] N. Lala, S.P. Lalbegi, S.D. Adyanthaya, M. Sastry, Phase transfer of aqueous

gold colloidal particles capped with inclusion complexes of cyclodextrin and alkanethiol molecules into chloroform, *Langmuir*. 17 (2002) 3766–3768. doi:10.1021/la0015765.

- [28] M. Anwar, M. Asfer, S. Akhter, S. Mohapatra, M.H. Warsi, N. Jain, N. Mallick, G.K. Jain, A. Ali, P.K. Panigrahi, F.J. Ahmad, Aqueous phase transfer of oleic acid coated iron oxide nanoparticles: Influence of solvents and surfactants on stability and pharmaceutical applications of ferrofluid, *Magnetohydrodynamics*. 49 (2013) 339–343.
- [29] T.K. Misra, T.-S. Chen, C.-Y. Liu, Phase transfer of gold nanoparticles from aqueous to organic solution containing resorcinarene., *J. Colloid Interface Sci.* 297 (2006) 584–588. doi:10.1016/j.jcis.2005.11.013.
- [30] J. Erler, S. Machunsky, P. Grimm, H.J. Schmid, U.A. Peuker, Liquid-liquid phase transfer of magnetite nanoparticles - Evaluation of surfactants, *Powder Technol.* 247 (2013) 265–269. doi:10.1016/j.powtec.2012.09.047.
- [31] P.K. Jain, X. Huang, I.H. El-sayed, M.A. El-sayed, Noble Metals on the Nanoscale : Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging , Sensing , Biology , and Medicine, 41 (2008) 7–9.
- [32] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, (2000).
- [33] A.A. Lazarides, K.L. Kelly, T.R. Jensen, G.C. Schatz, Optical properties of metal nanoparticles and nanoparticle aggregates important in biosensors, 529 (2000) 59–63.
- [34] D. Guo, G. Xie, J. Luo, Mechanical properties of nanoparticles: Basics and applications, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 47 (2014). doi:10.1088/0022-3727/47/1/013001.
- [35] A.B. Jindal, The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro- and nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 450–465. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.028.
- [36] M.A. Uppal, A. Kafizas, M.B. Ewing, I.P. Parkin, The effect of initiation method on the size , monodispersity and shape of gold nanoparticles formed by the

- Turkevich method, 44 (2010) 2906–2914. doi:10.1039/c0nj00505c.
- [37] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.* 241 (1973) 20–22. doi:10.1038/physci241020a0.
- [38] K.R. Brown, M.J. Natan, Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces, *Langmuir*. 14 (1998) 726–728. doi:10.1021/la970982u.
- [39] R.C. Carrillo-Torres, RSC Advances Hollow Au – Ag bimetallic nanoparticles with high photothermal stability †, (2016) 41304–41312. doi:10.1039/C5RA25821A.
- [40] P. Senthil Kumar, I. Pastoriza-Santos, B. Rodríguez-González, F. Javier García de Abajo, L.M. Liz-Marzán, High-yield synthesis and optical response of gold nanostars., *Nanotechnology*. 19 (2008) 015606. doi:10.1088/0957-4484/19/01/015606.
- [41] T. a. El-Brolossy, T. Abdallah, M.B. Mohamed, S. Abdallah, K. Easawi, S. Negm, H. Talaat, Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique, *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 153 (2008) 361–364. doi:10.1140/epjst/e2008-00462-0.
- [42] S. Kumar, K.S. Gandhi, R. Kumar, Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46 (2007) 3128–3136. doi:10.1021/ie060672j.
- [43] I. Ojea-Jiménez, J.M. Campanera, Molecular modeling of the reduction mechanism in the citrate-mediated synthesis of gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*. 116 (2012) 23682–23691. doi:10.1021/jp305830p.
- [44] V. Thamilselvi, K.V. Radha, A Review On The Diverse Application Of Silver Nanoparticle, *IOSR J. Pharm.* 07 (2017) 21–27. doi:10.9790/3013-0701012127.
- [45] I. Sondi, B. Salopek-sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent : a case study on E . coli as a model for Gram-negative bacteria, 275 (2004) 177–182. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012.
- [46] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z.S. Chen, G. Chen, Silver nanoparticles:

- Synthesis, properties, and therapeutic applications, *Drug Discov. Today*. 20 (2015) 595–601. doi:10.1016/j.drudis.2014.11.014.
- [47] J. Pulit-Prociak, M. Banach, Silver nanoparticles - A material of the future...?, *Open Chem*. 14 (2016) 76–91. doi:10.1515/chem-2016-0005.
- [48] K. Gudikandula, S. Charya Maringanti, Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties, *J. Exp. Nanosci*. 11 (2016) 714–721. doi:10.1080/17458080.2016.1139196.
- [49] T. Cele, Preparation of Nanoparticles, *Silver Nanoparticles - Heal. Saf. [Working Title]*. (2020) 1–14. doi:10.5772/intechopen.90771.
- [50] M.A. Garcia, Surface plasmons in metallic nanoparticles: M A Garcia To Surface Plasmons in metallic nanoparticles : Fundamentals and, *Phys. D Appl. Phys*. 44 (2011) 283001.
- [51] M.S. Kandarp Mavani, Synthesis of silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent, *Int. J. Eng. Res. Technol*. 2 (2013). doi:10.13140/2.1.3116.8648.
- [52] P. Kuppusamy, M.M. Yusoff, G.P. Maniam, N. Govindan, Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - An updated report, *Saudi Pharm. J*. 24 (2014) 473–484. doi:10.1016/j.jsps.2014.11.013.
- [53] P. Rajasekharreddy, *Plants: The Green Factories for Synthesis of Nanomaterials*, (2015).
- [54] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract., *Biotechnol. Prog*. 22 (2006) 577–583. doi:10.1021/bp0501423.
- [55] N. Pantidos, L.E. Horsfall, Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria , Fungi and Plants, *J. Nanomed. Nanotechnol*. 5 (2014) 10. doi:10.4172/2157-7439.1000233.
- [56] P. Kumar, S. Subir, Á.S.E.M.Á. Tem, Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Bacteria, (2013). doi:10.1007/s40011-013-0230-6.
- [57] M. Sastry, A. Ahmad, M.I. Khan, R. Kumar, Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete, 85 (2003).

- [58] Z. Molnár, V. Bódai, G. Szakacs, B. Erdélyi, Z. Fogarassy, G. Sáfrán, T. Varga, Z. Kónya, E. Tóth-Szeles, R. Szűcs, I. Lagzi, Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi, *Sci. Rep.* 8 (2018) 3943. doi:10.1038/s41598-018-22112-3.
- [59] M. Shah, D. Fawcett, S. Sharma, S.K. Tripathy, G.E.J. Poinern, Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities, 2015. doi:10.3390/ma8115377.
- [60] S. Ahmed, S. Ikram, S.Y. S, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, B: Biology Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach, *JPB.* 161 (2016) 141–153. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034.
- [61] N.I. Hulkoti, T.C. Taranath, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Biosynthesis of nanoparticles using microbes — A review, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 121 (2014) 474–483. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.05.027.
- [62] M. Yadi, E. Mostafavi, B. Saleh, S. Davaran, I. Aliyeva, R. Khalilov, M. Nikzamid, N. Nikzamid, A. Akbarzadeh, Y. Panahi, M. Milani, Current developments in green synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts: a review, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) S336–S343. doi:10.1080/21691401.2018.1492931.
- [63] K. Parveen, V. Banse, L. Ledwani, Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages, 020048 (2016) 020048. doi:10.1063/1.4945168.
- [64] B. Prashant Tiwari, M.K. Kumar, H.K. Gurpreet Kaur, Phytochemical screening and extraction - A review, *Int. Pharm. Sci.* 1 (2011) 98–106.
- [65] Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review, *Chinese Med. (United Kingdom).* 13 (2018) 1–26. doi:10.1186/s13020-018-0177-x.
- [66] P. Elia, R. Zach, S. Hazan, S. Kolusheva, Z. Porat, Y. Zeiri, Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 4007–4021. doi:10.2147/IJN.S57343.
- [67] S. Rajeshkumar, L. V. Bharath, Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and

- antibacterial activity, *Chem. Biol. Interact.* 273 (2017) 219–227. doi:10.1016/j.cbi.2017.06.019.
- [68] G. Marslin, K. Siram, Q. Maqbool, R.K. Selvakesavan, D. Kruszka, P. Kachlicki, G. Franklin, Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles, *Materials (Basel)*. 11 (2018) 1–25. doi:10.3390/ma11060940.
- [69] A.K. Mittal, Y. Chisti, U.C. Banerjee, Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 346–356. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
- [70] N. Ahmad, S. Sharma, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of *Ananas comosus*, *Green Sustain. Chem.* 02 (2012) 141–147. doi:10.4236/gsc.2012.24020.
- [71] P. Sharma, S. Pant, S. Rai, R.B. Yadav, S. Sharma, V. Dave, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles by *Allium cepa* L. to produce silver nano-coated fabric and their antimicrobial evaluation, *Appl. Organomet. Chem.* 32 (2018) 1–13. doi:10.1002/aoc.4146.
- [72] A. López-Millán, C.L. Del Toro-Sánchez, J.R. Ramos-Enríquez, R.C. Carrillo-Torres, P. Zavala-Rivera, R. Esquivel, E. Álvarez-Ramos, R. Moreno-Corral, R. Guzmán-Zamudio, A. Lucero-Acunã, Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Parkinsonia florida* leaf extract and antimicrobial activity of silver nanoparticles, *Mater. Res. Express*. 6 (2019). doi:10.1088/2053-1591/ab2d8e.
- [73] S. Kameswara Srikar, D.D. Giri, D.B. Pal, P.K. Mishra, S.N. Upadhyay, Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review, *Green Sustain. Chem.* 6 (2016) 34–56. doi:10.4236/gsc.2016.61004.
- [74] A. Yadav, S. Ranade, Properties and bioactivity of flavonoids and sugar induced gold nanoparticles, *Indian J. Biotechnol.* 15 (2016) 531–537.
- [75] LATIF MS, ABBAS S, KORMIN F, MUSTAFA MK, Green Synthesis of Plant-Mediated Metal Nanoparticles: the Role of Polyphenols, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 12 (2019) 75–84. doi:10.22159/ajpcr.2019.v12i7.33211.
- [76] D.K. Das, A. Chakraborty, S. Bhattacharjee, S. Dey, Biosynthesis of stabilised

- gold nanoparticle using an aglycone flavonoid, quercetin, *J. Exp. Nanosci.* 8 (2013) 649–655. doi:10.1080/17458080.2011.591001.
- [77] T. Ahmad, M.A. Bustam, M. Irfan, M. Moniruzzaman, H.M.A. Asghar, S. Bhattacharjee, Mechanistic investigation of phytochemicals involved in green synthesis of gold nanoparticles using aqueous *Elaeis guineensis* leaves extract: Role of phenolic compounds and flavonoids, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66 (2019) 698–708. doi:10.1002/bab.1787.
- [78] S. Jain, M.S. Mehata, Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13. doi:10.1038/s41598-017-15724-8.
- [79] E.A. Terenteva, V. V. Apyari, S.G. Dmitrienko, Y.A. Zolotov, Formation of plasmonic silver nanoparticles by flavonoid reduction: A comparative study and application for determination of these substances, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 151 (2015) 89–95. doi:10.1016/j.saa.2015.06.049.
- [80] M. Hussain, N.I. Raja, M. Iqbal, S. Aslam, Applications of Plant Flavonoids in the Green Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles and Impacts on Human Health, *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.* 43 (2019) 1381–1392. doi:10.1007/s40995-017-0431-6.
- [81] S.P. Chandran, R. Pasricha, U.M. Bhatta, P. V. Satyam, M. Sastry, Synthesis of gold nanorods in organic media, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2007) 2808–2817. doi:10.1166/jnn.2007.636.
- [82] I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, Synthesis of Silver Nanoprisms in DMF, *Nano Lett.* 2 (2002) 903–905. doi:10.1021/nl025638i.
- [83] S. Rama, K. Perala, S. Kumar, チオール金 NaBH₄還元 Langmuir.pdf, *Langmuir.* 29 (2013) 9863–9873.
- [84] M. Sastry, Phase transfer protocols in nanoparticle synthesis, *Curr. Sci.* 85 (2003) 1735–1745.
- [85] H. Hirai, H. Aizawa, H. Shiozaki, Preparation of Nonaqueous Dispersion of Colloidal Silver by Phase Transfer, *Chem. Lett.* 21 (1992) 1527–1530.

doi:10.1246/cl.1992.1527.

- [86] H. Hirai, H. Aizawa, Preparation of Stable Dispersions of Colloidal Gold in Hexanes by Phase Transfer, *J. Colloid Interface Sci.* 161 (1993) 471–474. doi:10.1006/jcis.1993.1491.
- [87] D.K. Carpenter, Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics (Berne, Bruce J.; Pecora, Robert), *J. Chem. Educ.* 54 (1977) A430. doi:10.1021/ed054pa430.1.
- [88] Malvern, ゼータサイザー ナノ シリーズ ZETASIZER NANO Series, (n.d.).
- [89] W. Zhou, R. Apkarian, Z.L. Wang, D. Joy, Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM), *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.* (2007) 1–40. doi:10.1007/978-0-387-39620-0_1.
- [90] P. Alessio, P.H.B. Aoki, L.N. Furini, A.E. Aliaga, C. Constantino, C.J. Leopoldo Constantino, *Characterization of Nanomaterials : Diffraction Characterization of Nanomaterials : Diffraction*, Elsevier Inc., 2017. doi:10.1016/B978-0-323-49778-7/00003-5.
- [91] G. Barraza-Garza, L.A. De La Rosa, A. Martínez-Martínez, H. Castillo-Michel, M. Cotte, E. Alvarez-Parrilla, La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos, *Rev. Latinoam. Quim.* 41 (2013) 125–148.
- [92] M.C. Daniel, D. Astruc, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293–346. doi:10.1021/cr030698+.
- [93] J. Zhao, B. Friedrich, NANOCON, in: 2015.
- [94] J. Yang, H. Liu, Metal-based composite nanomaterials, *Met. Compos. Nanomater.* (2015) 1–259. doi:10.1007/978-3-319-12220-5.
- [95] A. Verma, M.S. Mehata, Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 9 (2016) 109–115. doi:10.1016/j.jrras.2015.11.001.
- [96] G. Wei, Z. Yang, C. Lee, H. Yang, C.R.C. Wang, Aqueous-Organic Phase Transfer of Gold Nanoparticles and Gold Nanorods Using an Ionic Liquid,

(2004) 5036–5037.

- [97] M. Lista, D.Z. Liu, P. Mulvaney, Phase Transfer of Noble Metal Nanoparticles to Organic Solvents, *Langmuir*. 30 (2014) 1932–1938.
- [98] J. Yang, J. Yang, J.Y. Ying, J.Y. Lee, Phase transfer and its applications in nanotechnology, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1672–1696. doi:10.1039/b916790k.
- [99] R. a Sperling, W.J. Parak, Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles., *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 368 (2010) 1333–1383. doi:10.1098/rsta.2009.0273.
- [100] T. Bala, A. Swami, B.L. V Prasad, M. Sastry, Phase transfer of oleic acid capped NicoreAgshell nanoparticles assisted by the flexibility of oleic acid on the surface of silver, *J. Colloid Interface Sci.* 283 (2005) 422–431. doi:10.1016/j.jcis.2004.09.018.
- [101] P. De La Presa, M. Multigner, J. De La Venta, M.A. García, M.L. Ruiz-González, Structural and magnetic characterization of oleic acid and oleylamine-capped gold nanoparticles, *J. Appl. Phys.* 100 (2006) 123915-1-123915–6. doi:10.1063/1.2401314.
- [102] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, 2013.
- [103] B.G. Prevo, S.A. Esakoff, A. Mikhailovsky, J.A. Zasadzinski, Scalable routes to gold nanoshells with tunable sizes and response to near-infrared pulsed-laser irradiation, *Small*. 4 (2008) 1183–1195. doi:10.1002/smll.200701290.
- [104] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 2004. doi:10.1002/0470011149.
- [105] D.H. Lee, R. a Condrate, FTIR spectral characterization of thin film coatings of oleic acid on glasses : I . Coatings on glasses from ethyl alcohol, New York. 4 (1999) 139–146. doi:10.1023/A:1004494331895.
- [106] B.G. Prevo, S.A. Esakoff, A. Mikhailovsky, J.A. Zasadzinski, Scalable routes to gold nanoshells with tunable sizes and response to near-infrared pulsed-laser irradiation., *Small*. 4 (2008) 1183–95. doi:10.1002/smll.200701290.
- [107] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology.,

- Chem. Rev. 105 (2005) 1103–69. doi:10.1021/cr0300789.
- [108] X. Huang, M.A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *J. Adv. Res.* 1 (2010) 13–28. doi:10.1016/j.jare.2010.02.002.
- [109] P.K. Jain, I.H. ElSayed, M.A. El-Sayed, Au nanoparticles target cancer, *Nano Today.* 2 (2007) 18–29. doi:10.1016/S1748-0132(07)70016-6.
- [110] A.M. Alkilany, A.I.B. Yaseen, J. Park, J.R. Eller, C.J. Murphy, Facile phase transfer of gold nanoparticles from aqueous solution to organic solvents with thiolated poly(ethylene glycol), *RSC Adv.* 4 (2014) 52676–52679. doi:10.1039/C4RA11928B.
- [111] M. Sengani, A. Mihai, V.D. Rajeswari, OpenNano Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect, *OpenNano.* 2 (2017) 37–46. doi:10.1016/j.onano.2017.07.001.
- [112] V. Mishra, R. Sharma, N.D. Jasuja, D.K. Gupta, International Journal of Green and A Review on Green Synthesis of Nanoparticles and Evaluation of Antimicrobial Activity, *Int. J. Green Herb. Chem.* 3 (2014) 81–94.
- [113] A. Islam, M.A.K. Bhuiya, M.S. Islam, A Review on Chemical Synthesis Process of Platinum Nanoparticles, 1 (2014) 107–121.
- [114] P. Mohanpuria, N.K. Rana, S.K. Yadav, Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications, *J. Nanoparticle Res.* 10 (2008) 507–517. doi:10.1007/s11051-007-9275-x.
- [115] M.N. Nadagouda, R.S. Varma, Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract, *Green Chem.* 10 (2008) 859. doi:10.1039/b804703k.
- [116] P.T. Anastas, L.G. Heine, T.C. Williamson, *Green Chemical Syntheses and Processes*, American Chemical Society, Washington DC, 2000.
- [117] C. Jayaseelan, R. Ramkumar, A.A. Rahuman, P. Perumal, Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity, *Ind. Crops Prod.* 45 (2013) 423–429. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.019.

- [118] S.S. Shankar, A. Rai, A. Ahmad, M. Sastry, Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 496–502. doi:10.1016/j.jcis.2004.03.003.
- [119] N. Albusta, M. Keogh, S. Akhtar, F. Henari, M. Consultations, I. Abdulrahman, B. Faisal, S. Arabia, Detection of Glucose using Gold Nanoparticles Prepared by Green Synthesis, 6 (2018) 1–10.
- [120] R. Vijayan, S. Joseph, B. Mathew, *Indigofera tinctoria* leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles and assessment of their anticancer, antimicrobial, antioxidant and catalytic properties catalytic properties, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 0 (2017) 1–11. doi:10.1080/21691401.2017.1345930.
- [121] A. Khan, R. Rashid, G. Murtaza, A. Zahra, Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery, *Pharm Res Trop. J. Pharm. Res. J. Cit. ReportsScience Ed.* 13 (2014) 1169–1169. doi:10.4314/tjpr.v13i7.23.
- [122] P. Ghosh, G. Han, M. De, C.K. Kim, V.M. Rotello, Gold nanoparticles in delivery applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1307–1315. doi:10.1016/j.addr.2008.03.016.
- [123] C. Iancu, Photothermal Therapy of Human Cancers (PTT) Using Gold Nanoparticles, *Biotechnol. Mol. Biol. Nanomedicine.* 1 (2013) 53–60. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.086.
- [124] C. Loo, A. Lin, L. Hirsch, M.-H. Lee, J. Barton, N. Halas, J. West, R. Drezek, Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer., *Technol. Cancer Res. Treat.* 3 (2004) 33–40.
- [125] J. Gao, X. Huang, H. Liu, F. Zan, J. Ren, Colloidal stability of gold nanoparticles modified with thiol compounds: bioconjugation and application in cancer cell imaging., *Langmuir.* 28 (2012) 4464–71. doi:10.1021/la204289k.
- [126] A.A.A. Aljabali, Y. Akkam, M.S. Al Zoubi, K.M. Al-Batayneh, B. Al-Trad, O.A. Alrob, A.M. Alkilany, M. Benamara, D.J. Evans, Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity, *Nanomaterials.* 8 (2018) 1–15. doi:10.3390/nano8030174.

- [127] H.M.M. Ibrahim, ScienceDirect Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8 (2015) 1–11. doi:10.1016/j.jrras.2015.01.007.
- [128] R. Geethalakshmi, D.V.L. Sarada, Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Trianthema decandra* extract and evaluation of their antimicrobial activities, *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2 (2010) 970–975. doi:10.1155/2011/573429.
- [129] J.U. Chandirika, G. Annadurai, Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Leaf Extract *Abutilon indicum*, *Glob. J. Biotechnol. Biochem.* 13 (2018) 7–11. doi:10.5829/idosi.gjbb.2018.13.01.12329.
- [130] L. Wang, Y. Wu, J. Xie, S. Wu, Z. Wu, Materials Science & Engineering C Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts, *Mater. Sci. Eng. C.* 86 (2018) 1–8. doi:10.1016/j.msec.2018.01.003.
- [131] S.K. Kailasa, T. Park, J. V Rohit, J.R. Koduru, Chapter 14. Antimicrobial activity of silver nanoparticles, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/B978-0-12-816504-1.00009-0.
- [132] B. Divya, K. Mruthunjaya, S.N. Manjula, *Parkinsonia aculeata*: A Phytopharmacological review, *Asian J. Plant Sci.* 10 (2011) 175–181. doi:10.3923/ajps.2011.175.181.
- [133] V.K. Bhatia, S.R. Gupta, T.R. Seshadri, C-glycosides of the leaves of *parkinsonia aculeata*, *Tetrahedron.* 22 (1966) 1147–1152. doi:10.1016/0040-4020(66)80091-1.
- [134] A.S. Khan, *Leguminous Trees and Their Medicinal Properties*, in: *Med. Important Trees*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 211–233. doi:10.1007/978-3-319-56777-8_9.
- [135] A. Andrade-Cetto, M. Heinrich, Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes, *J. Ethnopharmacol.* 99 (2005) 325–348. doi:10.1016/j.jep.2005.04.019.
- [136] S. Ahmed, Saifullah, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, Green synthesis of

- silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 9 (2016) 1–7. doi:10.1016/j.jrras.2015.06.006.
- [137] P. Paisan, P. Moret, *Introducción, Tecnol. Química.* (2010).
- [138] J. Hudzicki, Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, (2016) 1–23.
- [139] B.L. Hungund, C.H. Pathak, *A Survey of Plants in Gujarat , India , for Alkaloids , Saponins , and Tannins,* (1971) 1–11.
- [140] S. Sharma, A.P. Vig, Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of *parkinsonia aculeata* linn., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/756184.
- [141] V. V. Makarov, A.J. Love, O. V. Sinitsyna, S.S. Makarova, I. V. Yaminsky, M.E. Taliansky, N.O. Kalinina, “Green” nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants, *Acta Naturae.* 6 (2014) 35–44. doi:10.1039/c1gc15386b.
- [142] S. Shankar, J.W. Rhim, Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films, *Carbohydr. Polym.* 130 (2015) 353–363. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.018.
- [143] A.J. Kulandaisamy, J.B.B. Rayappan, Significance of Nanoparticles and the Role of Amino Acids in Structuring Them—A Review, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 18 (2018) 5222–5233. doi:10.1166/jnn.2018.15388.
- [144] S. Baset, H. Akbari, H. Zeynali, M. Shafie, Size measurement of metal and semiconductor nanoparticles via UV-Vis absorption spectra, *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* 6 (2011) 709–716.
- [145] H. Vergara-Castañeda, L.O. Granados-Segura, G. Luna-Bárcenas, D.J. McClements, M.G. Herrera-Hernández, N. Arjona, A.R. Hernández-Martínez, M. Estevez, H. Pool, Gold nanoparticles bioreduced by natural extracts of arantho (*Kalanchoe daigremontiana*) for biological purposes: physicochemical, antioxidant and antiproliferative evaluations, *Mater. Res. Express.* 6 (2019) 055010. doi:10.1088/2053-1591/ab0155.
- [146] S. Li, Y. Shen, A. Xie, X. Yu, L. Qiu, L. Zhang, Q. Zhang, M. Grätzel, M. Okuda, Y. Kobayashi, K. Suzuki, K. Sonoda, T. Kondoh, A. Wagawa, A. Kondo, H.

Yoshimura, J. Dai, M.L. Bruening, C.B. Murray, S. Sun, H. Doyle, T. Betley, A. Tao, F. Kim, Y. Sun, Y. Xia, P. Yang, Y. Shiraishi, N. Toshima, Y. Sun, Y. Yin, B.T. Mayers, T. Herricks, Y. Xia, B. Yin, H. Ma, S. Wang, S. Chen, N.M. Dimitrijevic, D.M. Bartels, C.D. Jonah, K. Takahashi, T. Rajh, A. Callegari, D. Tonti, M. Chergui, L. Zhang, Y.H. Shen, A.J. Xie, S.K. Li, B.K. Jin, Q.F. Zhang, A. Swami, P.R. Selvakannan, R. Pasricha, M. Sastry, R.R. Naik, S.J. Stringer, G. Agarwal, S. Jones, M.O. Stone, M.N. Nadagouda, R.S. Varma, P.K. Vemula, U. Aslam, V.A. Mallia, G. John, J.L. Gardea-Torresdey, E. Gomez, J.R. Peralta-Videa, J.G. Parsons, H. Troiani, M.J. Yacaman, D. Rautaray, A. Sanyal, A. Bharde, A. Ahmad, M. Sastry, S.S. Shankar, A. Rai, A. Ahmad, M. Sastry, S.S. Shankar, A. Ahmad, M. Sastry, O. Collera-Zuniga, F.G. Jimenez, R.M. Gordillo, B.H. Jagadeesh, T.N. Prabha, K. Srinivasan, L.C. Gruen, S. Senapati, A. Ahmad, M.I. Khan, M. Sastry, R. Kumar, Y.G. Sun, Y.N. Xia, H. Borchert, E. V. Shevchenko, A. Robert, I. Mekis, A. Kornowski, G. Grubel, H. Weller, N. Bouropoulos, S. Weiner, L. Addadi, A. Gole, C. Dash, V. Ramakrishnan, S.R. Sainkar, A.B. Mandale, M. Rao, M. Sastry, A.E. Andreeva, I.R. Karamancheva, K. Kashiwagi, K. Uchiyama, F. Kurashima, J. Anzai, T. Osa, A. Zille, P. Ramalho, T. Tzanow, R. Millward, A. Cavaco-Paulo, C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, X.S. Fang, C.H. Ye, X.S. Peng, Y.H. Wang, Y.C. Wu, L.D. Zhang, J.T. McCann, D. Li, Y. Xia, B. Mayers, Y. Xia, U. Jeong, P.H.C. Camargo, Y.H. Lee, Y. Xia, F. Kim, S. Connor, H. Song, T. Kuykendall, P. Yang, X.S. Fang, C.H. Ye, L.D. Zhang, J.X. Zhang, J.W. Zhao, P. Yan, X.S. Fang, C.H. Ye, L.D. Zhang, Y.H. Wang, Y.C. Wu, X.S. Fang, L.D. Zhang, C.J. Murphy, A.M. Gole, S.E. Hunyadi, C.J. Orendorff, M. Yamamoto, Y. Kashiwagi, M. Nakamoto, Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract, *Green Chem.* 9 (2007) 852. doi:10.1039/b615357g.

- [147] X. Huang, H. Wu, X. Liao, B. Shi, J.J. Storhoff, R. Elghanian, R.C. Mucic, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, T. Li, L.P. Guo, Z.X. Wang, C. Marsden, E. Taarning, D. Hansen, L. Johansen, S.K. Klitgaard, K. Egeblad, C.H. Christensen, N.L. Rosi, C.A. Mirkin, J.W. Liu, Y. Lu, P.K. Jain, X. Huang, I.H. El-Sayed, M.A. El-

Sayed, M.C. Daniel, D. Astruc, M.P. Melancon, W. Lu, Z. Yang, R. Zhang, Z. Cheng, A.M. Elliot, J. Stafford, T. Olson, J.Z. Zhang, K. Yamaguchi, H. Asakawa, M. Moeremans, G. Daneels, J.D. Mey, S. Kundu, H. Liang, X.L. Zhou, E. I. Khoury, L.T. Qu, L.M. Dai, Q. Li, N. Toshima, T. Yonezawa, J.F. Zhou, J. Ralston, R. Sedev, M. Watzky, R. Finke, J. Rothe, J. Hormes, H. Bonnemann, W. Brijoux, K. Siepen, X.P. Sun, S.J. Dong, E.K. Wang, C. Note, S. Kosmella, J. Koetz, M.E. Garcia, L.A. Baker, R.M. Crooks, K. Esumi, A. Suzuki, N. Aihara, K. Usui, K. Torigoe, A. Henglein, K. Zhu, L.Q. Huang, J. Zhu, Z.Y. Zhuang, S.M. Mohsen, A.S.M. Ammar, L. Manzocco, D. Mastrocola, M.C. Nicoli, C.W. Oo, M.J. Kassim, A. Pizzi, M. Ferrer, R. Reina, O. Rossell, M. Seco, K. Esumi, A. Suzuki, A. Yamahira, K. Torigoe, S. Szunerits, R. Boukherroub, J.G.G. II, J.D. Swalen, W. Rechberger, A. Hohenau, A. Leitner, X. Zhang, H. Shi, B.Q. Xu, G.J. Hutchings, M.S. Hall, A.F. Carley, P. Landon, B.E. Solsona, C.J. Kiely, A. Herzing, M. Makkee, J.A. Moulijn, A. Overweg, J.C. Fierro-Gonzalez, J. Guzman, B.C. Gates, D. Parajuli, H. Kawakita, K. Inoue, K. Ohto, K. Kajiyama, Y.H. Kim, Y. Nakano, J.C. Liu, F. He, E. Durham, E. Durham, D. Zhao, C.B. Roberts, T. Pietsch, D. Appelhans, N. Gindy, B. Voit, A. Fahmi, S. Kallithraka, C. Garcia-Viguera, P. Bridle, J. Bakker, K. Esumi, T. Matsumoto, Y. Seto, T. Yoshimura, C.W. Oo, M.J. Kassim, A. Pizzi, Y. Nakano, K. Takeshita, T. Tsutsumi, One-step, size-controlled synthesis of gold nanoparticles at room temperature using plant tannin, *Green Chem.* 12 (2010) 395–399. doi:10.1039/B918176H.

[148] S. Francis, S. Joseph, E.P. Koshy, B. Mathew, Green synthesis and characterization of gold and silver nanoparticles using *Mussaenda glabrata* leaf extract and their environmental applications to dye degradation, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 17347–17357. doi:10.1007/s11356-017-9329-2.

[149] A. Chahardoli, N. Karimi, F. Sadeghi, A. Fattahi, Green approach for synthesis of gold nanoparticles from *Nigella arvensis* leaf extract and evaluation of their antibacterial, antioxidant, cytotoxicity and catalytic activities, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 46 (2018) 579–588. doi:10.1080/21691401.2017.1332634.

- [150] S. Iravani, Green synthesis of metal nanoparticles using plants, *Green Chem.* 13 (2011) 2638. doi:10.1039/c1gc15386b.
- [151] K.S. Siddiqi, A. Husen, R.A.K. Rao, A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties, *J. Nanobiotechnology.* 16 (2018) 14. doi:10.1186/s12951-018-0334-5.
- [152] K. Adavallan, N. Krishnakumar, Mulberry leaf extract mediated synthesis of gold nanoparticles and its anti-bacterial activity against human pathogens, (n.d.). doi:10.1088/2043-6262/5/2/025018.
- [153] F. Thielbeer, K. Donaldson, M. Bradley, Zeta Potential Mediated Reaction Monitoring on Nano and Microparticles, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 144–150. doi:10.1021/bc1005015.
- [154] S. Kaviya, J. Santhanalakshmi, B. Viswanathan, J. Muthumary, K. Srinivasan, Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2011) 594–598. doi:10.1016/J.SAA.2011.03.040.
- [155] W.L.X.X.Q. Shi, Y. Chen, Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, (2011) 135–141. doi:10.1007/s10534-010-9381-6.