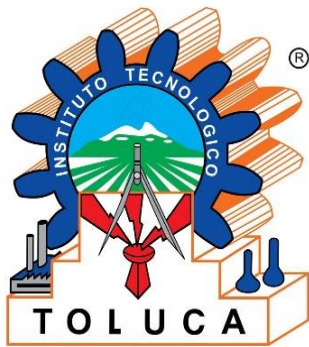




SEP

SES

TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y TITANIO FITOSINTETIZADAS CON *Mentha piperita* Y *Chamaemelum nobile*”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

P R E S E N T A:

SALOMÓN ALBERTO MONDRAGÓN ROMÁN

Número de Control: M21281382

DIRECTOR:

DRA. MARÍA SONIA MIREYA MARTÍNEZ GALLEGOS

CO-DIRECTOR:

DR. PABLO SAMUEL SCHABES RETCHKIMAN

Metepec, Estado de México, junio de 2023.



Metepec, Edo. de México, 22/junio/2023

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

Por este medio comunicamos a usted que la comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada "COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y TITANIO FITOSINTENIZADAS CON MENTHA PIPERITA Y CHAMAEMELUM NOBILE", que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta el C. Salomón Alberto Mondragón Román con número de control M21281382 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Dra. María Sonia Mireya Martínez Gallegos
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Pablo Samuel Schabes Retchkiman
CODIRECTOR DE TESIS

Dra. Ma. Guadalupe Macedo Miranda
REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier Illescas Martínez
REVISOR DE TESIS

ccp. Archivo
JLGR/RCR



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, Metepec, Edo. de México, C.P.52149. Tels. Dirección:
722 208 72 05, Subd. Académica: 722 208 7207, Subd. de Planeación: 208 7206, Subd. Administrativa:
722 208 7208, Conmut.: 722 208 72 00, e-mail: info@toluca.tecnm.mx. tecnm.mx | toluca.tecnm.mx



**2023
Francisco
VILLA**



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Toluca
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Metepec, Edo. de México, 22/junio/2023
DEPI-3200-MCIAM-88/2023

**SALOMON ALBERTO MONDRAGON ROMAN
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE**

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado **"Comparación entre la actividad microbiciada de nanopartículas de plata y titanio fitosintetizadas con Mentha piperita y Chamaemelum nobile"**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
"Educación, integridad y ciencia"

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

ccp. Archivo
JLGR/RCR



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, Metepec, Edo. de México, C.P.52149. Tels. Dirección:
722 208 72 05, Subd. Académica: 722 208 7207, Subd. de Planeación: 208 7206, Subd. Administrativa:
722 208 7208, Conmut. 722 208 72 00, e-mail: info@toluca.tecnm.mx, tecnm.mx | toluca.tecnm.mx



**2023
Francisco
VILLA**

Dedicatorias

Le agradezco a la vida por tantas oportunidades que me ha dado, a mis tutores y compañeros de trabajo que me apoyaron durante este periodo, a los profesores que me formaron como maestro en Ciencias.

A mis padres por proporcionarme la educación y el amor que me permitió salir adelante.

Al Instituto Tecnológico de Toluca por abrirme las puertas.

Al apoyo del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica del Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM

A CONACYT por su apoyo con una beca de investigación.

A las personas que me acompañaron en este camino con su amor.

A Kashy por su compañía.

“Si he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes.”

Issac Newton

Resumen

Esta investigación consiste en tres etapas metodológicas: la fitosíntesis de nanopartículas metálicas, su caracterización y las pruebas de su actividad microbiciada. Se realizó la fitosíntesis de nanopartículas metálicas usando como precursores metálicos soluciones de nitrato de plata y óxido de titanio 0.1 M con un ajuste de pH a 4, las cuales se mezclaron por separado con extractos de las plantas menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Chamaemelum nobile*), formando una suspensión resultante que contiene las fitomoléculas de las plantas que fungen como agentes reductores y estabilizadores junto con el precursor metálico correspondiente que en conjunto favorecen la formación de las nanopartículas metálicas de Ag y Ti.

Se obtuvo el espectro UV-Vis de las muestras de nanopartículas metálicas para identificar el punto máximo de absorción óptica, cuya longitud de onda está asociada a la excitación del plasmón de resonancia superficial localizado y cuyo rango es característico de los nanomateriales, para el caso de las nanopartículas de titanio con menta y manzanilla se observó un punto máximo de absorción a 340 nm y 321 nm respectivamente, y para el caso de plata con menta y manzanilla de 350 nm y 313 nm.

La caracterización por FTIR permitió identificar grupos funcionales presentes en las fitomoléculas existentes en los extractos de biomasa de menta y manzanilla; se identificaron las bandas a 3500 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} y 1150 cm^{-1} , que indica la presencia de vibraciones de tensión de grupos O-H, vibraciones de tensión de -CH y vibraciones de tensión de C-O respectivamente presentes en fitomoléculas como polifenoles.

Se caracterizaron las nanopartículas por medio de microscopía electrónica de transmisión, las nanopartículas de plata-menta obtuvieron 26 nm de diámetro, estructura cristalina hexagonal, de tarjeta cristalográfica 72-2108. Las nanopartículas de plata-manzanilla un diámetro de 6 nm, estructura cristalina hexagonal y tarjeta cristalográfica 19-1155, ambos con una fase de composición de Ag_2O .

Las nanopartículas de titanio del sistema titanio-menta obtuvieron nanopartículas de diámetro de 68 nm, estructura cristalina ortorrómbica y tarjeta cristalográfica 16-0617. Por último, el sistema titanio-manzanilla obtuvo las nanopartículas de mayor tamaño, diámetro de 160 nm, estructura cristalina tetragonal y tarjeta cristalográfica 71-0650 ambas con fase de composición TiO_2 .

Se realizaron pruebas microbiológicas con el método de diluciones sucesivas para identificar la capacidad bactericida de las nanopartículas, utilizando las bacterias patógenas modelo, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias Gram negativa y Gram positiva, respectivamente; además, se cuantificó la disminución en porcentaje de las unidades formadoras de colonias (UFC) con respecto a una muestra sin tratamiento de nanopartículas. En este sentido, y para determinar la influencia de cada planta en la formación de nanopartículas, se realizó la determinación de concentración de compuestos fenólicos totales utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton, 1974), misma que fue mayor en manzanilla (56.15) a la de menta (50.45 mg/L), resultado que se observó como una mayor capacidad bactericida respecto a la fitosíntesis con hojas de menta.

Por último, es importante destacar que la síntesis de nanopartículas metálicas de plata utilizando biomasa de menta y manzanilla es un método de síntesis viable que permite obtener nanopartículas metálicas de plata con alta capacidad bactericida (>90%), contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, y resultados aceptables contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (>80%); para el caso de las nanopartículas de titanio el porcentaje de reducción de UFC en ensayos bactericidas fue inferior (>70%).

Aunque es importante establecer el hecho de que la fitosíntesis al depender su reducción de factores tan complejos como las biomoléculas de un sistema biológico, tiene como desventaja que a pesar de ser replicable el tamaño de las nanopartículas no es homogéneo, sin embargo, las ventajas y el hecho de ser un método ambientalmente amigable lo hacen una opción para la síntesis de nanopartículas metálicas.

Abstract

This research consists of three methodological stages: phytosynthesis of metallic nanoparticles, their characterization and testing of their microbicidal activity. Phytosynthesis of metallic nanoparticles was performed using as metallic precursors silver nitrate and titanium oxide solutions 0.1 M with a pH adjustment to 4, which were mixed separately with extracts of the plants peppermint (*Mentha piperita*) and chamomile (*Chamaemelum nobile*), forming a resulting suspension containing the plant phytomolecules that act as reducing and stabilizing agents together with the corresponding metal precursor that together favor the formation of Ag and Ti.

The UV-Vis spectrum of the metallic nanoparticle samples was obtained to identify the maximum point of optical absorption, whose wavelength is associated with the excitation of the localized surface resonance plasmon and whose range is characteristic of nanomaterials, for the case of titanium nanoparticles with mint and chamomile a maximum absorption point was observed at 340 nm and 321 nm respectively, and for the case of silver with mint and chamomile of 350 nm and 313 nm.

FTIR characterization allowed the identification of functional groups present in the phytomolecules existing in the mint and chamomile biomass extracts; bands at 3500 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1050 and 1150 cm^{-1} were identified, indicating the presence of O-H group stress vibrations, -CH stress vibrations and C-O stress vibrations respectively present in phytomolecules such as polyphenols.

The nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy, the silver-mint nanoparticles obtained 26 nm in diameter, hexagonal crystal structure, crystallographic card 72-2108. The silver-chamomile nanoparticles a diameter of 6 nm, hexagonal crystal structure and crystallographic card 19-1155, both with a phase composition of Ag_2O .

The titanium nanoparticles of the titanium-mint system obtained nanoparticles with a diameter of 68 nm, orthorhombic crystalline structure and crystallographic card 16-0617. Finally, the titanium-chamomile system obtained the largest nanoparticles,

diameter of 160 nm, tetragonal crystalline structure and crystallographic card 71-0650 both with TiO₂ phase composition.

Microbiological tests were performed with the serial dilution method to identify the bactericidal capacity of the nanoparticles, using the model pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, Gram negative and Gram positive bacteria, respectively; in addition, the decrease in percentage of colony forming units (CFU) with respect to a sample without nanoparticle treatment was quantified. In this sense, and to determine the influence of each plant on the formation of nanoparticles, the concentration of total phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton, 1974), which was higher in chamomile (56.15) than in mint (50.45 mg/L), a result that was observed as a greater bactericidal capacity with respect to phytosynthesis with mint leaves.

Finally, it is important to highlight that the synthesis of metallic silver nanoparticles using mint and chamomile biomass is a viable synthesis method that allows obtaining metallic silver nanoparticles with high bactericidal capacity (>90%), against Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, and acceptable results against Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* (>80%); for the case of titanium nanoparticles the percentage of CFU reduction in bactericidal assays was lower (>70%).

Although it is important to establish the fact that phytosynthesis depends on factors as complex as the biomolecules of a biological system, it has the disadvantage that despite being replicable, the size of the nanoparticles is not homogeneous; however, the advantages and the fact that it is an environmentally friendly method make it an option for the synthesis of metallic nanoparticles.

Índice

Dedicatorias	4
Resumen.....	5
Abstract.....	7
Índice.....	9
Índice de figuras	11
Índice de tablas.....	13
Índice de abreviaturas	15
Introducción	16
1. Fundamentos	18
1.1. Historia de las nanopartículas	18
1.2. Nanociencias y nanotecnología	20
1.3. Nanomateriales	21
1.4. Fitorreducción de nanopartículas metálicas a partir de extractos de plantas.....	23
1.5. Menta (<i>Mentha piperita</i>).....	24
1.6.-Manzanilla (<i>Chamaemelum nobile</i>).....	25
1.7. Características y aplicaciones de la plata (Ag) y titanio (Ti)	26
1.8. Espectroscopía.....	27
1.9. Espectrofotometría UV-VIS	27
1.10. Plasmón de resonancia superficial localizado	28
1.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	28
1.12. Compuestos fenólicos en plantas.....	29

1.13 Determinación de fenoles totales por el ensayo con reactivo Folin -Ciocalteu.....	30
1.14 Bacterias	31
1.15 <i>Escherichia coli</i>	33
1.16 <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2. Metodología	37
2.1. Procesamiento de la biomasa	38
2.2. Preparación de soluciones de precursores metálicos	39
2.3. Proceso de obtención de extracto de biomasa	39
2.4. Síntesis de nanopartículas.	39
2.5.-Caracterización de nanopartículas por espectroscopía UV-vis.....	40
2.6. Microscopía electrónica de transmisión	40
2.7.-Pruebas de actividad microbica	41
2.8. Siembra de cepas control.	43
2.9. Ensayo de diluciones sucesivas.	44
2.10. Estudio de la actividad antimicrobiana.	44
2.11. Determinación de fenoles totales por medio del ensayo con reactivo Folin-Ciocalteu (FC).....	45
3. Resultados	47
3.1. Procesamiento de la biomasa	47
3.2. Preparación de soluciones de precursores metálicos	48
3.3. Fitosíntesis de nanopartículas.	49
3.4. Caracterización de nanopartículas	50

3.4.1.-Espectroscopía UV-vis	50
3.4.2. Espectroscopía infrarroja FTIR.....	54
3.4.3.-TEM.....	58
3.4.3.1.-Menta AgNps.....	58
3.4.3.2.-Manzanilla AgNps.....	59
3.4.3.3.-MentaTiNps	60
3.4.3.4.-ManzanillaTiNps	61
3.5.-Determinación de fenoles totales	62
3.6.-Pruebas de actividad bactericida	63
3.6.1.-Pruebas confirmativas microbiológicas	64
3.6.2.-Cuenta de cepas bacterianas	66
3.6.3.-Determinación del porcentaje de inhibición UFC	67
Conclusiones.....	71
Referencias.....	75

Índice de figuras

Figura 1.1. Enfoques de síntesis de nanopartículas.....	19
Figura 1.2: Nanomateriales según su cristalinidad.....	22
Figura 1.3. Esquema de reacción del reactivo Folin-Ciocalteu.....	31
Figura 1.4. Esquema de la pared celular de bacterias Gram + y Gram -.	33
Figura 1.5. Micrografía SEM de <i>E. coli</i>	34

Figura 2.1. Proceso de síntesis de nanopartículas.....	40
Figura 2.2. Diagrama de caracterización de nanopartículas por TEM. .	41
Figura 2.3. Diagrama de ensayos microbiológicos por prueba bactericida de nanopartículas.	43
Figura 2.4. Diagrama del método de diluciones sucesivas realizado, utilizando NPs de plata y titanio.	45
Figura 3.1. Diagrama de obtención de extractos acuosos de biomasa.	47
Figura 3.2. Diagrama de preparación de soluciones precursoras metálicas al 0.1 M	48
Figura 3.3. Diagrama de síntesis de nanopartículas, baño ultrasónico y sedimentadas en centrífuga..	49
Figura 3.4. Espectro de absorción de nanopartículas de plata fitosintetizadas con manzanilla.	51
Figura 3.5. Espectro de absorción de nanopartículas de plata fitosintetizadas con menta. .	51
Figura 3.6. Espectro de absorción de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con manzanilla.	52
Figura 3.7. Espectro de absorción de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta.	52
Figura 3.8. Diagrama de propuesta de mecanismo de fitosíntesis de nanopartículas de plata.	55
Figura 3.9. FTIR de nanopartículas de plata fitosintetizadas con menta y manzanilla.	55
Figura 3.10. Diferencia de señales FTIR de nanopartículas de plata fitosintetizadas con menta y manzanilla.....	56
Figura 3.11. FTIR de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta y manzanilla.	57

Figura 3.12. Diferencia de señales FTIR de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta y manzanilla.....	58
Figura 3.13. Micrografía de nanopartículas de plata fitosintetizadas con extracto de menta.	59
Figura 3.14. Micrografía de nanopartículas de plata fitosintetizadas con extracto de manzanilla.	60
Figura 3.15. Micrografía de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con extracto de menta.....	61
Figura 3.16. Micrografía de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con extracto de manzanilla.	61
Figura 3.17. Curva de calibración de estándares para el ensayo de determinación de fenoles totales a partir del reactivo Folin-Ciocalteu.....	62
Figura 3.18. Fotografía en microscopio optico a 100x en inmercion de <i>Escherichia coli</i>	65
Figura 3.19. Fotografía en microscopio optico a 100x en inmercion de <i>S. aureus</i>	66
Figura 3.20. Porcentaje de inhibicion de los tratamiento de NPs de plata en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> utilizando como biomasa.....	69
Figura 3.21. Porcentaje de inhibicion de los tratamiento de NPs de plata en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> utilizando como biomasa menta y manzanilla.	70

Índice de tablas

Tabla 1.1. Estudios científicos de síntesis de nanopartículas metálicas fitosintetizadas con especies del género <i>Mentha</i>	24
Tabla 1.2. Estudios científicos de síntesis de nanopartículas metálicas fitosintetizadas con especies del género <i>Chamemelum nobile</i>	25

Tabla 1.3: Parámetros de supervivencia de la bacteria <i>E. coli</i> .	34
Tabla 1.4: Parámetros de supervivencia de la bacteria <i>S. aureus</i> .	36
Tabla 2.1: Reactivos y equipos utilizados	37
Tabla 3.1. Biomosas obtenidas (hojas)	47
Tabla 3.2. pH de soluciones de precursores metálicos previo ajuste de pH	48
Tabla 3.3. Picos de absorbancias registrados por UV-VIS para nanopartículas de plata y titanio fitosintetizadas.	53
Tabla 3.4: Concentracion de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico y compuestos oxidantes en extractos de manzanilla y menta apartir del ensayo con el reactivo Folin-Ciocalteau.	63
Tabla 3.5: Resultados de ensayos confirmativos para <i>E. coli</i> y <i>S.aureus</i> .	65
Tabla 3.6: Cuenta en placa de las UFC/mL de los inoculos con dilucion 1×10^{-7} de las cepas bacterianas.	66
Tabla 3.7: Cuenta en placa de las UFC/mL de los inoculos 1×10^{-5} a 1×10^{-7} a partir de la sintesis de nanopartículas de plata y titanio utilizando las especies menta y manzanilla como agentes reductores.	67

Índice de abreviaturas

NP: Nanopartículas metálicas.

AgNP: Nanopartículas metálicas de plata.

TiNP: Nanopartículas metálicas de titanio.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

HRTEM: Microscopía de energía de transmisión de alta resolución.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

SPR: Plasmón de resonancia superficial

FC: Folin-Ciocalteu

Introducción

La nanotecnología es la ciencia encargada de la investigación, producción y desarrollo de materiales con dimensiones que se encuentran comprendidas entre 1 y 100 nm; por su tamaño comparten características entre el mundo cuántico y el físico, lo que aunado al incremento que tiene el área superficial de los nanomateriales, le permiten tener mejoras en sus características (Huang & El-Sayed, 2010).

Los métodos de síntesis verdes son amigables con el medio ambiente y se han vuelto cada vez más populares en la química (Fahmy *et al.*, 2020); la necesidad de encontrar procesos que consuman menos energía, recursos o que sean menos contaminantes ha impulsado a la comunidad científica a encontrar nuevas metodologías. Específicamente en la producción de nanopartículas, los métodos “verdes” de síntesis ayudan a la eliminación del uso de reductores como el borohidruro de sodio que genera residuos peligrosos, entre otros, mismos que son reactivos muy costosos y ecológicamente no compatibles por los desechos contaminantes que producen (Rauwel *et al.*, 2015).

La fitosíntesis de nanopartículas, consiste en el aprovechamiento de las biomoléculas existentes en las plantas como agentes reductores y estabilizadores (Sadeghi & Gholamhoseinpoor, 2015); las ventajas que brinda el uso de plantas para crear extractos para el proceso de fitosíntesis son la facilidad de acceso a las plantas, seguridad de manejo, así como el hecho de que poseen una gran cantidad de agentes activos que promueven la reducción de iones metálicos. Se han realizados múltiples estudios en los cuales se han utilizado diversos tipos de plantas (Kharissova *et al.*, 2013). En este proyecto de investigación se propone sintetizar nanopartículas metálicas de plata y titanio a partir del método de fitosíntesis empleando extractos de hojas de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Chamaemelum nobile*); las nanopartículas fitosintetizadas se van a analizar por espectrofotometría UV-Vis, FTIR, microscopía electrónica de transmisión (TEM), por último, se realizarán pruebas de

actividad microbicida frente a cepas de *Escherichia coli* comparando su efecto bactericida a través del método de diluciones sucesivas (Hedges, 2002).

En el apartado 1 se incluyen los fundamentos en los que se destacan un resumen histórico de la nanotecnología y las nanopartículas, así como los principios que fundamentan las técnicas de caracterización utilizadas en este proyecto; asimismo una descripción de las especies vegetales menta y manzanilla, de los polifenoles como principales biomoléculas que participan en la reducción durante la fitosíntesis y por último la descripción de las técnicas microbiológicas utilizadas como pruebas para la determinación de la capacidad bactericida de las nanopartículas sintetizadas.

En el apartado 2 se describe la metodología utilizada para la recuperación de biomasa a partir de hojas de menta y manzanilla, la fitosíntesis utilizando como precursores metálicos la plata y el titanio, la descripción metodológica para la preparación de muestras para las técnicas de caracterización, la determinación de Polifenoles totales, así como la descripción técnica de las diferentes pruebas microbiológicas necesarias para realizar pruebas bactericidas a partir de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En el apartado 3 se describen los resultados obtenidos en la síntesis de nanopartículas, la concentración de polifenoles totales, técnicas de caracterización de las nanopartículas, primeramente a través del plasmón obtenido por medio de espectrofotometría UV-Vis, la identificación de los grupos funcionales presentes en las fitomoléculas por medio de espectroscopía IR, la obtención de micrografías de las nanopartículas y su indexación por medio de un TEM; por último los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas, con el porcentaje de reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) con los tratamientos de nanopartículas en las bacterias.

Por último, se escriben las conclusiones tomando en cuenta los resultados obtenidos metodológicamente, analizando la relación que existe entre la concentración de polifenoles totales y el tamaño de las nanopartículas con la capacidad bactericida obtenido.

1. Fundamentos

1.1. Historia de las nanopartículas

Históricamente, los primeros vestigios del uso de nanopartículas datan del siglo cuatro A.C., por los Romanos, quienes realizaron interesantes ejemplos del uso de nanopartículas, uno de ellos es “La copa de Licurgo”, en la cual se encontraron nanopartículas de plata y oro dispersas en forma coloidal, creando así un efecto “dicroico” en el vidrio, el cual torna de color verde a rubí dependiendo de la incidencia de la luz en el objeto, ya sea si la fuente de luz proviene de la parte trasera o frontal de la copa. En el año 1990, los científicos le realizaron pruebas por medio de microscopia de transmisión de electrones (TEM) y difracción de rayos X, se llegó a la conclusión que el dicroísmo de la copa era dado por nanopartículas de entre 50-100 nm de oro y plata, siendo este también el primer uso de nanopartículas metálicas descubierto por parte de la humanidad (Bayda, 2019).

Otro uso de nanopartículas fue identificado en los vitrales de las iglesias medievales, en las cuales al pasar la luz se observan colores rojos y amarillos intensos producidos por la presencia de nanopartículas metálicas encontradas dentro de este vidrio (Agrawal *et al.*, 2022); asimismo existen evidencias del uso de nanopartículas de oro y cobre en el acabado de cerámica desde el siglo VII que fueron encontradas en pueblos islámicos y en Europa (Pradell *et al.*, 2007).

A partir del 2001, uno de los principales enfoques en los que se han dado importantes avances científicos y tecnológicos, ha sido en las nanociencias y la nanotecnología debido a que se han desarrollado nanopartículas con propiedades y características novedosas derivadas de la disposición de los átomos en escalas que van de 1 a 100 nm, los cuales pueden diferir de tamaño del material del que están formados y mostrar otras características debido a su estructura o disposición (Govindarajan, 2016).

En la actualidad existen diversos métodos con los que se obtienen nanopartículas, estos se pueden realizar de dos maneras; una es a partir de materia a gran escala con

procesos principalmente mecánicos, procesos térmicos, pulverización catódica entre otros, y la otra forma es a partir de átomos o moléculas en procesos como la biorreducción, la deposición química de vapor, el sol-gel entre otros (Bayda, 2019).

Las nanopartículas tienen dos vertientes para su producción, por un lado, el acercamiento “Top-down” que implica la descomposición de materiales hasta llegar a partículas de tamaños nanométricos; por otro lado, la aproximación “Bottom-up” hace referencia a la construcción de nanoestructuras ya sea átomo por átomo o molécula a molécula a través de métodos físicos o químicos.

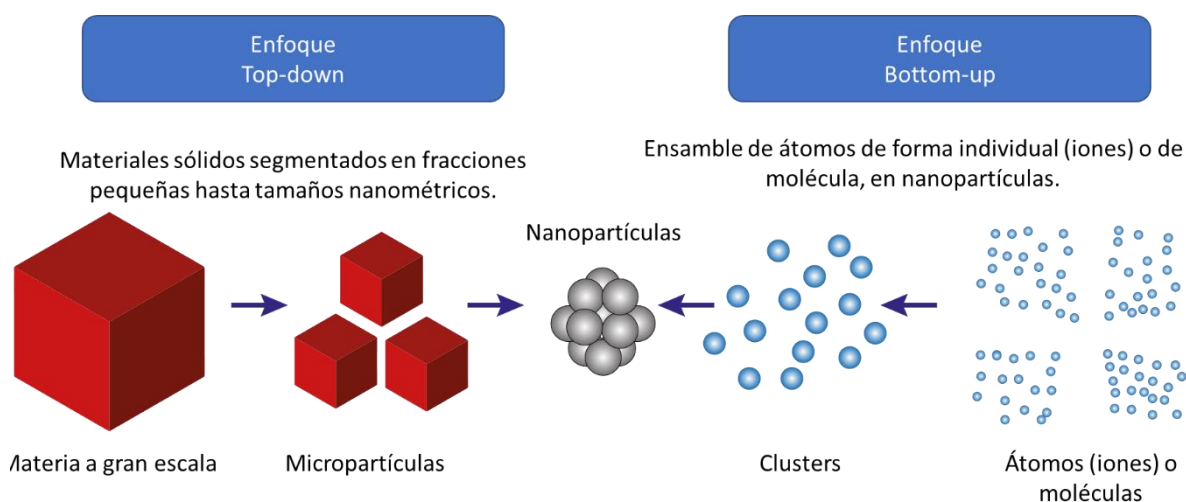


Figura 1.1. Enfoques de síntesis de nanopartículas.

La síntesis de nanopartículas metálicas ha ganado un gran interés en las dos últimas décadas por sus propiedades y el potencial que estas le brindan, además el hecho de que pueden ser aplicables en múltiples campos científicos. Métodos para sintetizar nanopartículas como la fitosíntesis, tienen la capacidad de obtener nanopartículas de formas y tamaños diversos dentro del rango nanométrico; también, son amigables con el ser humano y con el medio ambiente.

La biorreducción es un método que se utiliza para la síntesis de nanopartículas metálicas, se basa en las biomoléculas existentes en organismos vivos que tienen la capacidad de servir como agentes reductores y estabilizadores; se puede realizar a

través de extractos de plantas, bacterias, hongos o enzimas (Ettadili *et al.*, 2022). A la utilización de extractos de plantas se le llama fitosíntesis de nanopartículas y es una forma simple, medioambientalmente amigable, libre de contaminantes y de bajo costo (Kulkarni, 2014).

Las nanopartículas metálicas de plata y oro han sido las más estudiadas por su capacidad bactericida, antiinflamatoria y en la actualidad por su potencial para ser usadas como sistemas de suministro de medicamentos en la medicina (Agrawal *et al.*, 2022); las nanopartículas de plata poseen características únicas y mejoran la eficiencia de la plata iónica; existen muchos mecanismos atribuidos a la actividad antimicrobiana de la plata (Sim *et al.*, 2018).

Por otra parte, el uso de nanopartículas de titanio también ha sido desarrollado, se han estudiado sus aplicaciones médicas por ser considerado un compuesto microbicida, por ser químicamente estable, no tóxico y económico, lo que le brinda excelentes propiedades antifúngicas y antibacterianas contra bacterias Gram positivas y negativas (Dicastillo, 2020).

1.2. Nanociencias y nanotecnología

El prefijo “nano” proviene del prefijo griego “enano”, usado para hacer referencia a algo diminuto. En cuanto a su uso en escalas de medición, el prefijo nano, es usado para describir a la mil millonésima parte de un metro es decir 10^{-9} metros (Mehlhorn, 2016). Para el entendimiento de la nanociencia y la nanotecnología es necesario distinguirlas correctamente, definiendo a la nanociencia como el estudio de estructuras, partículas o moléculas en escalas nanométricas en un rango entre 1–100 nanómetros (nm), es decir, la construcción del conocimiento generado a través del método científico en el uso de estas estructuras.

Por otra parte, la tecnología que utiliza estas nanoestructuras o moléculas nanométricas para realizar aplicaciones a través del uso de dispositivos es llamada la nanotecnología. El auge de las nanociencias comenzó a partir de principios del año

2000 con las primeras aplicaciones en nanotecnología, las cuales han tenido impacto en múltiples campos de la ciencia, como la de los materiales, física, ciencias ambientales, medicina entre otros (Mansoori *et al.*, 2005).

1.3. Nanomateriales

Los nanomateriales difieren en sus dimensiones, formas, tamaños, composición y porosidad; existen diversas formas de clasificarlos, un ejemplo es como nanomateriales naturales, incidentales y bioinspirados, así como en función de su origen. De forma natural los nanomateriales pueden ocurrir durante procesos fisicoquímicos, biogeoquímicos o físicos propiciados por la naturaleza sin ningún vínculo o relación con actividades antropogénicas. Por otra parte, los nanomateriales accidentales han sido descubiertos de manera intencional de forma directa o indirecta por actividades antropogénicas, los cuales han ocurrido a través de procesos industriales creados por el humano. Así mismo, están los nanomateriales creados a través de metodologías de laboratorio o industriales, y por ultimo los nanomateriales bioinspirados son aquellos que tratan de emular a materiales naturales o pertenecientes a seres vivos, copiando aquellas características que son beneficiosas para el ser humano como lo pueden ser la hidrofobia de las superficies en algunas especies de plantas o insectos (Reinosa, 2013).

En otro aspecto, los nanomateriales también se pueden clasificar por su dimensionalidad (Wang *et al.*, 2020), que pueden ser de la siguiente manera:

Zero-dimensionales (0D): Son nanomateriales los cuales tienen todas sus dimensiones en la nanoescala es decir (<100 nm); un ejemplo de interés son las nanopartículas metálicas.

Unidimensionales (1D): Los nanomateriales unidimensionales tienen solo una dimensión (<100 nm), teniendo una relación de aspecto muy grande; los principales ejemplos son los nanotubos o nanofibras.

Bidimensionales (2D): Estos nanomateriales tienen dos dimensiones (<100 nm), el ejemplo más claro son los nanomateriales laminares (nanosheets).

Tridimensionales (3D): Los nanomateriales tridimensionales están compuestos por elementos de tamaño nanométrico en disposiciones en las cuales tienen tres dimensiones (>100 nm), son materiales complejos que conforman complejos estructurales tridimensionales.

Otra clasificación de los nanomateriales de importancia es a través de su cristalinidad, y son: cristalinos, semicristalinos y amorfos. En los nanomateriales cristalinos los átomos que componen el cristal se encuentran distribuidos de forma periódica. Por otra parte, los nanomateriales semicristalinos o también conocidos como policristalinos cuentan con múltiples regiones en las que se encuentran arreglos periódicos, siendo los últimos los amorfos, mismos que no cuentan con una distribución periódica.

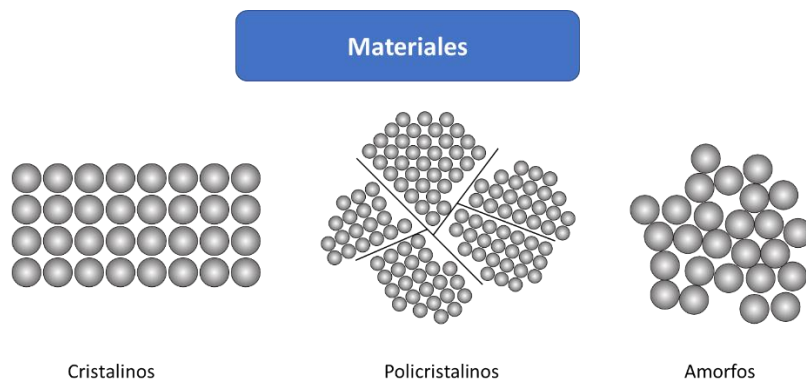


Figura 1.2: Nanomateriales según su cristalinidad.

Por último, una clasificación importante de los nanomateriales es en función de su porosidad; los nanomateriales se dividen en tres clases importantes de acuerdo con el tamaño de sus poros en microporosos, mesoporosos y macroporosos:

Microporosos: Son aquellas estructuras que tienen poros con tamaños <2 nm; por ejemplo: carbón activado, zeolitas.

Mesoporosos: Materiales con poros con tamaños entre 2 y 50 nm, como el sílice y óxidos de titanio.

Macroporosos: Materiales con poros mayores a >50 nm, tal es el caso de los materiales cerámicos.

1.4. Fitorreducción de nanopartículas metálicas a partir de extractos de plantas

Las plantas han demostrado tener la habilidad de adsorber, hiperacumular, y degradar de forma natural iones metálicos y iones de óxidos metálicos presentes en el medio ambiente (Kulkarni, 2014). De esta manera el uso de extractos de plantas utilizadas como agentes reductores y estabilizadores en la producción de nanopartículas metálicas ha demostrado ser una buena alternativa debido a su gran relación costo beneficio y el hecho de ser amigable con el medio ambiente.

Extractos de varias partes de plantas que incluyen la raíz, el tallo, las hojas, las semillas y los frutos han demostrado su efectividad para la preparación de nanopartículas. Se ha observado que el origen de la parte de la planta que se utiliza para la biorreducción tiene influencia directa en la caracterización de las NPs debido al cambio en las concentraciones y combinaciones de los agentes reductores orgánicos existentes en la planta.

Los agentes reductores en plantas incluyen diversos metabolitos solubles en agua, por ejemplo: los alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos, así como coenzimas. Debido a la gran cantidad de químicos involucrados, la biorreducción es un proceso complejo, pero que a la vez permite obtener nanopartículas con resultados replicables (Dobrucka, 2017).

La fitorreducción de iones metálicos a nanopartículas metálicas es un proceso rápido que puede realizarse en condiciones de temperatura y presión ambiente, ser fácilmente escalable y es amigable con el medio ambiente. Hasta este momento la síntesis de nanopartículas basada en extracto de plantas ha sido realizado para diversos metales como la plata, el oro, el hierro, el paladio, el litio, diversos óxidos metálicos como (ZnO, TiO₂, CuO), entre otros (Nasrollahzadeh, 2019).

1.5. Menta (*Mentha piperita*)

La menta es una planta que pertenece a la familia *Lamiaceae*, es un híbrido entre hierbabuena (*Mentha spicata*) y menta acuática (*Mentha acuatica*). Aunque su origen es del mediterráneo, es cultivada alrededor del mundo y es usada por su fragancia, su sabor y sus tradicionales aplicaciones médicas y farmacéuticas. El aceite de menta es uno de los aceites esenciales más producidos a nivel mundial (Işcan *et al.*, 2002). Tradicionalmente la menta es usada como té, forma parte de diversos platillos culinarios, y dentro de sus usos médicos, destaca su capacidad antiinflamatoria, antiespasmódica y analgésica. También ha sido usada para tratar las náuseas, la bronquitis, colitis entre otros; sus aceites esenciales son comúnmente utilizados como antipirético y antisépticos.

Las hojas de menta tienen elementos antioxidantes, antibacteriales y antifúngicos como el mentol, la mentona, el acetato de metilo, así como flavonoides, ácidos fenólicos como el cafeico y el rosmarínico, aminoácidos y terpenos. La interacción a nivel molecular entre estas moléculas y los iones metálicos es el principal factor para la síntesis de nanopartículas metálicas, e influyen en su composición, tamaño y forma. En el último año, se ha explorado el uso de las hojas de menta para obtener nanopartículas de oro (Mariychuk, 2021), plata y aluminato de cobalto (Gingasus *et al.*, 2021). El extracto de hojas de plantas del género *Mentha* es una opción viable para la fitorreducción de nanopartículas metálicas, como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1.1. Estudios científicos de síntesis de nanopartículas metálicas fitosintetizadas con especies del género *Mentha*.

Precursor	Composición	Especie	Tamaño (nm)	Referencia
HAuCl ₄	Au	<i>M. piperita</i>	10-50	(Mariychuk, 2021)

C ₄ H ₁₀ O ₆ Zn	ZnO	<i>M. spicata</i>	74.68 promedio	(Abdelkhalek <i>et al.</i> , 2020)
AgNO ₃	Ag	<i>M. asiatica</i>	8.31-14.4	(Ibrahim <i>et al.</i> , 2014)

1.6.-Manzanilla (*Chamaemelum nobile*)

Chamaemelum nobile comúnmente conocida como manzanilla es una planta de la familia *Asteraceae*. Posee capacidades antibacteriales, antifúngicas, insecticidas, antiinflamatorias, hipoalergénicas, antioxidantes, entre otros efectos (Al-Snafi, 2016). Se encuentra extensamente distribuida en Asia, Europa, África y América del Norte, es comúnmente cultivada alrededor del mundo. Su uso tradicional es a través de infusiones frías o calientes, utilizadas para mejorar la digestión, como antiespasmódico, para reducir el dolor causado por dismenorrea o como antiemético; así mismo se utilizan sus aceites esenciales como carminativo, y cólicos causados por espasmos intestinales.

Dentro de sus constituyentes se encuentran aceites volátiles, terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides y polisacáridos; en forma de infusión, *C. nobile* es una fuente de ácidos fenólicos y orgánicos (oxálico, quínico, málico, cítrico y fumárico) (Fauconnier, 1996). Dentro de sus usos para la síntesis de nanopartículas a través de extractos acuosos, *C. nobile* ha sido utilizada para la síntesis de nanopartículas; algunos estudios relevantes son los siguientes.

Tabla 1.2. Estudios científicos de síntesis de nanopartículas metálicas fitosintetizadas con especies del género *Chamaemelum nobile*.

Precursor	Composición	Especie	Tamaño (nm)	Referencia
-----------	-------------	---------	-------------	------------

AgNO ₃	Ag	<i>Chamaemelum nobile</i>	47.3 promedio	(Erjaee, 2017)
Zn[CH ₃ COO] ₂	Zn[OH] ₂	<i>Chamaemelum nobile</i>	36.8 promedio	(Ghaedi <i>et al.</i> , 2015)

1.7. Características y aplicaciones de la plata (Ag) y titanio (Ti)

Entre los metales de transición, la plata es un metal especialmente atractivo debido a la dependencia entre sus propiedades ópticas y alta eficiencia de la excitación de plasma con su forma, tamaño, dispersión y, además, su alta conductividad térmica y eléctrica. Estas propiedades han generado prometedoras aplicaciones de las nanopartículas de plata en catálisis para la oxidación selectiva de estireno, recubrimientos antimicrobianos amigables con el ambiente, sensores ópticos de tiempo real, fotocatalisis, impresiones electrónicas, fotónicas, entre otras (Chen *et al.*, 2007).

El titanio es un metal de transición, usado en la industria para diversas aplicaciones por sus propiedades como su alta resistencia mecánica combinada con una baja densidad, y una mejorada resistencia a la corrosión, también se encuentra en aplicaciones como: la medicina, la industria de los pigmentos, la joyería, la industria aeroespacial y la náutica. Este metal se encuentra en varios minerales incluido el rutilo y la ilmenita y se halla disperso alrededor de la corteza terrestre (Rack y Qaz, 2006).

Las nanopartículas de titanio han sido utilizadas para mejorar las propiedades electroópticas en dispositivos de cristal líquido; en cuanto a su uso en biosíntesis de nanopartículas metálicas, se han realizado múltiples estudios por el método de biorreducción, como la obtención de nanopartículas dióxido de titanio a partir de *Lactobacillus sp.* (Jha *et al.*, 2010), a través del uso de garbanzo (*Cicer arietinum*) (Kashale *et al.*, 2016), o *Echinacea purpurea* (Dobrucka, 2017).

1.8. Espectroscopía

La espectroscopía es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía radiante y conforma parte importante del estudio de los materiales.

El análisis del espectro electromagnético en la espectroscopía se basa en detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda, en relación con los niveles de energía implicados en una transición cuántica (Zhang, 2009).

Las diferentes técnicas suelen basarse en la medición de los siguientes fenómenos ópticos:

- La absorción
- La dispersión
- La emisión de luz

Mismos fenómenos que contienen información sobre las propiedades de los materiales.

Las técnicas más utilizadas dentro de la espectroscopía son:

- La absorción de luz (UV-vis)
- La fotoluminiscencia (PL)
- La absorción en el infrarrojo (IR)
- La dispersión Raman
- Dispersión dinámica de la luz

1.9. Espectrofotometría UV-VIS

La espectroscopia UV-visible es una de las técnicas ópticas más sencillas y útiles para estudiar las propiedades ópticas y electrónicas de los nanomateriales. Esta técnica se

basa en la medición de la absorción de la luz por parte de una muestra, normalmente utilizando espectrofotómetros UV (Zhang *et al.*, 2009).

Si la muestra en el UV-VIS (basándose en el principio de la ley de Beer) absorbe luz en alguna longitud de onda, la luz transmitida se reducirá. La intensidad de la luz transmitida se mostrará como una gráfica representada en función de la longitud de onda de la luz que enseña el espectro de absorción de la muestra, demostrando curvas en las que el pico máximo de absorbancia se encuentra generalmente en un rango entre 200 y 800 nm (Zhang *et al.*, 2009).

1.10. Plasmón de resonancia superficial localizado

Las propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas en la región visible están dominadas por la absorción de plasmones superficiales causada por la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción en respuesta al campo eléctrico de la radiación luminosa.

El plasmón de resonancia superficial localizado es una oscilación coherente de los electrones superficiales de conducción excitados por medio de radiación electromagnética. En metales el plasmón de resonancia superficial permite identificar de forma característica a los metales, utilizando espectroscopía UV-VIS (Willlets *et al.*, 2007).

1.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) por sus siglas en inglés, es una herramienta de caracterización de alta resolución espacial para la caracterización estructural y química. Un TEM moderno tiene la capacidad de obtener imágenes directas de los átomos de las muestras cristalinas a resoluciones cercanas a 0.1 nm, más pequeñas que la distancia interatómica.

Este tipo de análisis es extremadamente importante para caracterizar materiales. El TEM puede utilizarse para caracterizar nanomateriales y de esta manera obtener información sobre el tamaño de las partículas, la forma, la cristalinidad, etc.

El TEM funciona a partir de hacer pasar un haz de electrones sobre la muestra, la interacción entre el haz de electrones y la muestra genera electrones elástica e inelásticamente dispersos, junto con algunos electrones no dispersos (Zhang *et al.*, 2009).

Una de las características más importantes en la caracterización de un material es la determinación estructural. Dado que las nanoestructuras suelen ser demasiado pequeñas para ser visualizadas con microscopios ópticos convencionales, es importante utilizar herramientas adecuadas para caracterizar a nivel molecular la estructura, la superficie y el tamaño de los materiales en tamaños nanométricos.

Esto es importante no sólo para comprender sus propiedades fundamentales sino como también para realizar pruebas en la investigación de nuevos materiales. Existen varias técnicas experimentales que pueden utilizarse para caracterizar las propiedades estructurales y superficiales de los nanomateriales, ya sea directa o indirectamente (Rao *et al.*, 2010).

1.12. Compuestos fenólicos en plantas

Los compuestos fenólicos o polifenoles son moléculas de origen natural las cuales son sintetizados como metabolitos secundarios de las plantas, derivadas de las vías del shiquimato, su importancia en el reino vegetal es tal que existen especies de plantas a las cuales se les atribuyen la capacidad de sintetizar miles de compuestos fenólicos diferentes (Munin, 2011).

Diferentes especies de plantas tienen contenidos de polifenoles dependiendo diversas características de la planta, como la especie, el grado de madurez, la composición del suelo en que se encuentra, las condiciones ambientales a las que se somete, entre otras; asimismo, los compuestos fenólicos forman parte de las funciones fisiológicas

de diversas plantas y responden como mecanismos de defensa de estrés, a condiciones adversas y agresiones de patógenos e insectos (Manach *et al*, 2004).

Molecularmente la composición de los compuestos fenólicos se caracteriza por tener uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo enlazado, su diversidad estructural le permite tener desde compuestos simples hasta algunos de gran complejidad. La clasificación de estos compuestos fenólicos, en general, es la de flavonoides y no flavonoides, dentro del grupo de los flavonoides se pueden encontrar a los: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y chalconas; por otra parte, como parte los no flavonoides, se encuentran a los ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos, polifenoles volátiles, y otros compuestos como lignanos (Valencia *et al.*, 2017). Dentro de las fitomoléculas reportadas que influyen en la síntesis de nanopartículas, se asocia a los compuestos fenólicos como los principales actores, por su increíble capacidad de oxidar, convirtiéndolos en antioxidantes (Nasrollahzadeh, 2019).

1.13 Determinación de fenoles totales por el ensayo con reactivo Folin - Ciocalteu

Los fenoles son compuestos químicos de gran importancia y su estudio ha tenido un amplio auge por su excelente capacidad de oxidación. La determinación de fenoles totales en plantas se obtiene principalmente de dos formas, a través del ensayo de vainillina y con el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC). Este último es un método que se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, específicamente en la reacción del molibdato y el tungstato sódico que al reaccionar con el reactivo forman complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, de tungsteno y molibdeno de una coloración azul intensa (Avella, 2008).

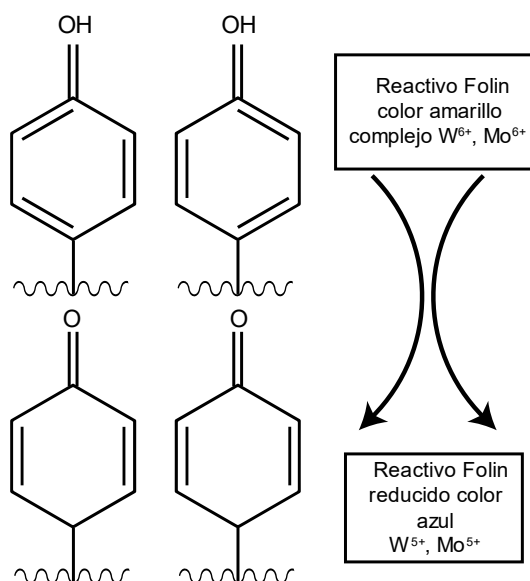


Figura 1.3. Esquema de reacción del reactivo Folin-Ciocalteu.

La determinación de fenoles totales y compuestos oxidantes, a partir del reactivo FC en extractos de plantas, se realiza a partir de equivalentes de ácido gálico utilizando patrones de reactivo FC y ácido gálico que, con la ayuda de un espectrofotómetro que lee la absorbancia a 765 nm en el espectrómetro de ultravioleta-visible, permite obtener una curva de calibración lineal para determinar la concentración de una muestra (Julkunen, 1985).

1.14 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares; son células procariotas (núcleo primitivo), es decir que no cuentan con una membrana nuclear; estos organismos pueden ser de diversos tamaños, pero en su gran mayoría microscópico (micrómetros).

Con respecto a la forma de las bacterias estas se clasifican en:

- Cocos: Bacterias que tienen una forma circular o ligeramente ovalada.
- Bacilos: Son bacterias con una morfología similar a una forma cilíndrica, elongadas.
- Vibrio: Estas son bacterias curvadas con una forma similar a la de una coma.

- Espirilos: Son bacterias con una forma helicoidal.
- Espiroquetas: Bacterias con una forma helicoidal flexible, forma que a su vez funge como un sistema de locomoción.

Para confirmar la morfología bacteriana, por su tamaño no se puede realizar a simple vista, se requiere del uso de microscopios electrónicos o, para el caso de un microscopio óptico de campo claro, se utiliza con un aumento de 100X utilizando aceite de inmersión. Con respecto a la forma de reproducción, las bacterias realizan fisión binaria, por lo que es muy fácil su proliferación cuando las condiciones son adecuadas.

La identificación bacteriana se puede realizar con preparaciones en fresco o con tinción. Las tinciones se basan en agregar una coloración a las estructuras bacterianas, y se basan en la afinidad que presentan algunos colorantes a estas estructuras bacterianas. Las tinciones pueden ser simples, diferenciales o especiales de tal forma que la tinción sea significativa; para este trabajo es relevante destacar las tinciones diferenciales como la tinción Gram o la tinción Ziehl Neelsen, que permiten observar a las bacterias a través de su coloración y además permiten diferenciarlas a través del uso de más de un colorante que actúa de forma distinta dependiendo del tipo de microorganismo.

Una de las principales formas de diferenciar las bacterias es a través de su pared celular; la gran concentración de los solutos dentro de las bacterias hace que tengan una alta presión osmótica intercelular, por lo que estos organismos requieren de una pared celular que soporte estas condiciones y permita mantener su morfología.

Los dos tipos de pared celular bacteriana son los Gram positivo y negativo nombrados de esta manera por su diferencia en la coloración de la pared, durante el método de tinción descubierto en el siglo XIX por el microbiólogo danés Hans Christian Joachim Gram (Hernández *et al.*, 2022).

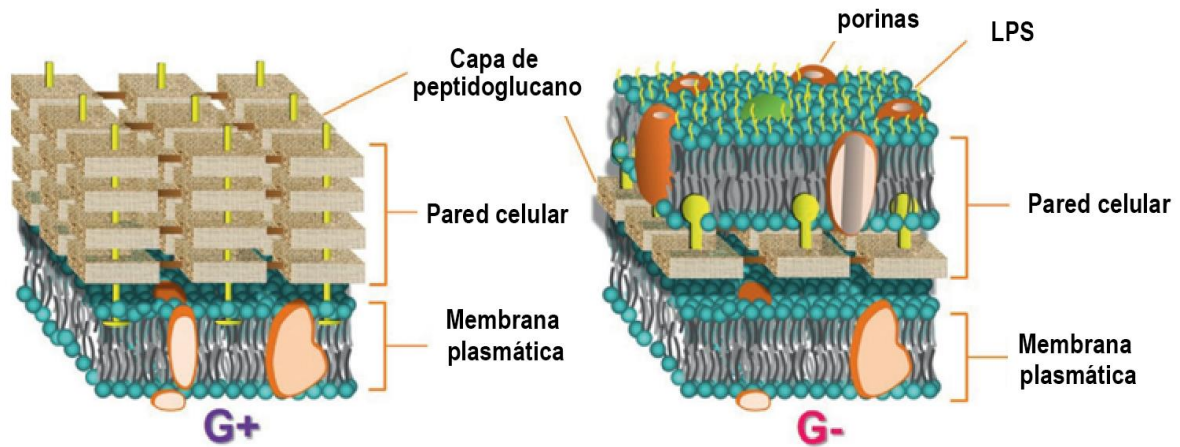


Figura 1.4. Esquema de la pared celular de bacterias Gram + y Gram -.

1.15 *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* es una parte importante de la microflora que se encuentra en el intestino de seres humanos y mamíferos de sangre caliente. Esta bacteria; sin embargo, también es patógena y es la causante de diversas enfermedades entre ellas la diarrea o la disentería entre sus seis patotipos, el nombre proviene de Theodor Escherich, el cual fue la primera persona en aislarla a partir de heces fecales en 1885 (Kaper *et al.*, 2004).

E. coli es una enterobacteria Gram-negativa de la familia *Enterobacteriaceae*, es un coliforme fecal, su tamaño tan pequeño requiere su observación en microscopio o en colonias bacterianas en medio de cultivo, estos organismos nativos del tracto gastrointestinal, pueden infectar y diseminarse en la sangre, sistema nervioso e hígado por lo que evitar la existencia de esta bacteria en vida libre es una necesidad, ya que su mecanismo de transmisión es a través de la vía “fecal-oral”; *E. coli* se encuentran en la materia fecal por lo que se puede encontrar como contaminación en agua o alimentos (Rock y Rivera, 2014).

E. coli ha sido muy estudiada a nivel molecular, es conocida como el “caballo de batalla de la biología molecular”; por su amplio estudio, *E. coli* ha sido utilizada como un bioindicador en ensayos de toxicología con las pruebas LD50 y EC50; ensayos que se comprueban en una siembra en placa a través de la disminución de las colonias bacterianas.



Figura 1.5: Micrografía SEM de *E. coli*. Fuente: Dennis Kunkel Microscopy
<https://www.denniskunkel.com/>

La bacteria *E. coli* tiene las siguientes características.

Tabla 1.3: Parámetros de supervivencia de la bacteria *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>	Parámetro
Temperatura óptima de crecimiento	35-40 °C
Temperatura mínima de supervivencia	7-8 °C
Temperatura máxima de supervivencia	46 °C

Actividad de agua mínima para crecimiento	0.95
Actividad de agua óptima para crecimiento	0.995
pH de crecimiento	4.4-10
pH óptimo de crecimiento	6 -7

1.16 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria la cual se identificó por primera vez en el año de 1880 en un absceso de infección humana; de igual manera en 1884 se identificó por primera vez como una fuente de contaminación alimenticia.

Desde entonces *S. aureus* es conocida como una bacteria patógena muy frecuente y un común residente de los seres humanos y animales, siendo aproximadamente que entre un 20 a 50% de las personas han sido portadoras a largo plazo, principalmente por encontrarse en la flora de la piel o encontrarse en las fosas nasales.

S. aureus es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa sin movilidad, la cual no es formadora de esporas y con una morfología esférica pequeña formando desde pares hasta racimos con forma de uva; a pesar de no ser un formador de esporas *S. aureus* tiene la capacidad de sobrevivir a un amplio rango de temperaturas, así mismo, tiene la capacidad de sobrevivir a potenciales condiciones secas y con estrés ambiental, como es el caso de su presencia en las fosas nasales, en la piel humana o en superficies en las cuales puede sobrevivir (Motarjemi *et al.*, 2013).

Tabla 1.4: Parámetros de supervivencia de la bacteria *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Parámetro
Temperatura optima de crecimiento	30-37 °C
Temperatura mínima de supervivencia	7 °C
Temperatura máxima de supervivencia	48.5 °C
pH de crecimiento	4.2-9.3
pH óptimo de crecimiento	7-7.5

2. Metodología

Para la realización metodológica de este trabajo se requirió de los siguientes equipos y reactivos:

Tabla 2.1: Reactivos y equipos utilizados

No	REACTIVO	MARCA
1	Nitrato de plata (AgNO_3) 99.0%	Sigma Aldrich
2	Oxido de titanio (TiO_2) 99.89%	Sigma Aldrich
3	Solución buffer pH 4 JT5606-1	J.T. Baker
4	Ácido nítrico 70.0%	J.T. Baker
5	Carbonato de sodio	Fermont
6	Ácido gálico	Sigma Aldrich
7	Etanol 96%	
8	Agua desionizada	
9	Agar de tripticaseína	BD Bioxon
10	Agar sal y manitol	BD Bioxon
11	Agar eosina azul de metilo	BD Bioxon
12	Medio MIO	BD Bioxon
13	Caldo de cultivo de tripticaseína	BD Bioxon
14	Cloruro de sodio 99.0%	J.T Baker

No	Equipo	MARCA Y MODELO
1	Potenciómetro de bolsillo Hanna	Hanna HI98130
2	Balanza analítica OHAUS	OHAUS Frontier 5714
3	UV-Vis Thermoscientific evolution array	Thermoscientific
4	Baño ultrasónico	DTN SB-5200
5	Base para filtro 0.45 µm	Whatman
6	Microscopio electrónico de transmisión	JEOL JEM-2010F FasTem
7	Rejillas de soporte de cobre recubiertas con carbón y Formvar de 300 mesh.	

2.1. Procesamiento de la biomasa

Se obtuvieron 20 plantas maduras de *Chamaemelum nobile* (manzanilla) y 20 más de *Mentha piperita* (menta) de huerto, la selección de plantas maduras se realizó para comprobar la concentración de polifenoles totales en el estado de madurez, ya que la concentración de polifenoles varía dependiendo la etapa del ciclo de vida en el que se encuentra la planta, así como el estrés causado por factores abióticos (Sierra, 2015); estas plantas posteriormente fueron lavadas con agua corriente hasta dejar el agua clara para eliminar los residuos existentes en la biomasa.

Una vez limpia la biomasa se dejó secar a temperatura ambiente en una capa de papel, en un cuarto oscuro durante 30 días. Posteriormente, se seccionaron las hojas de las plantas, mismas que se llevaron a un horno de secado Riossa H-33, extendidas sobre papel aluminio, a una temperatura de 50 °C $\pm$ 5 °C por 24 h.

Una vez retirado el contenido hídrico se procedió a triturar las hojas de las plantas secas en un mortero de ágata y tamizar a 100 mesh (149 μm) hasta obtener un polvo fino.

Se observó que la biomasa de manzanilla tiene un color verde oliva y una textura ligeramente no homogénea, mientras que la biomasa de menta es de color verde oscuro y cuenta con una textura homogénea. Por último, las biomásas fueron guardadas en contenedores de vidrio en la oscuridad para su posterior uso.

2.2. Preparación de soluciones de precursores metálicos

Se prepararon 100 mL de soluciones de AgNO_3 a 0.1 M y TiO_2 a 0.1 M con agua desionizada. El pH se obtuvo con un potenciómetro portátil Hanna HI98130, calibrado con soluciones buffer pH 7 JT5608-1 y pH 4 JT5606-1 de JT Baker. Posteriormente, a cada solución metálica se le modificó el pH a 4 empleando una solución de HNO_3 0.15 M.

2.3. Proceso de obtención de extracto de biomasa.

Para poder obtener un extracto acuoso de cada una de las biomásas obtenidas (manzanilla o menta), primero, se prepararon 200 mL de disolución etanol agua al 80% v/v; en un frasco de polipropileno, se utilizaron 25 mL de esta solución, a los cuales se le añadieron, por separado, 125 mg de polvo de cada una de las biomásas. Cada una de las mezclas se dejan reposar por 15 min a 4 °C en la oscuridad, el extracto obtenido de color verde se filtró con una membrana de nitrocelulosa 0.45 μm (Whatman).

2.4. Síntesis de nanopartículas.

En tubos de polipropileno de 15 ml se mezclaron volúmenes iguales de cada una de las soluciones metálicas y extracto vegetal (5:5 mL). Una vez mezclados, los 4 tubos con solución se colocaron dentro del baño ultrasónico durante 15 min y 20 °C; una vez terminado el tiempo se dejaron reposar por 5 min más. Por último, los tubos de polipropileno se centrifugaron de nuevo a 5000 rpm durante 20 min.

Las muestras se separaron por decantación; por un lado, queda el sobrenadante y por otra, el del precipitado este último fue destinado a confinamiento y el sobrenadante se mantuvo en refrigeración a 4 °C en frascos ámbar para su posterior caracterización.

FITOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

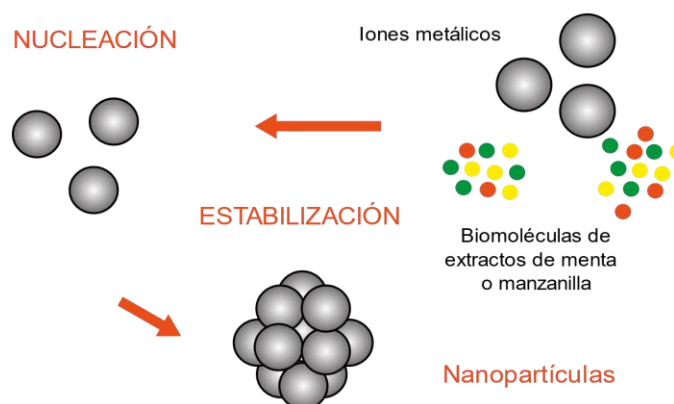


Figura 2.1. Proceso de síntesis de nanopartículas.

2.5.-Caracterización de nanopartículas por espectroscopía UV-vis

La respuesta óptica de los metales Ag y Ti de las nanopartículas, se realizó por UV-Vis tomando un barrido en el rango de 200 a 900 nm (λ), utilizando el espectrofotómetro UV-Vis con celdas de cuarzo y como blanco agua desionizada.

2.6. Microscopía electrónica de transmisión

Se realizó la preparación de las muestras a analizar utilizando rejillas de soporte de cobre recubiertas con carbón y Formvar de 300 mesh, las cuales se manipularon con pinzas de precisión. A cada una de estas rejillas se les agregó una gota del sobrenadante, obtenido en el apartado anterior, por separado. En el sobrenadante se encuentran las nanopartículas de Ag o Ti. Una vez colocada la muestra sobre las rejillas, se dejaron en desecador por dos días para eliminar la humedad existente en

ellas. Los análisis se realizaron utilizando el microscopio analítico de resolución atómica JEOL JEM-2010F FasTem en el Instituto de Materiales de la UNAM, el cual está equipado con un cañón de emisión de campo, con una resolución de 82 pm en modo STEM, también cuenta con un detector EDS que mide la química elemental, todo ello permitió observar la estructura atómica de las nanopartículas sintetizadas.

Las micrografías fueron indexadas para obtener la distancia interplanar de las estructuras cristalinas de las nanopartículas e identificar el material cristalino correspondiente al sistema sintetizado, para esto se utilizó el software GSM 3 Gatan DigitalMicrograph versión 3.51, con el cual se analizaron las micrografías en formato .dm4 y .tiff. Por último, la distancia interplanar se comparó con tarjetas cristalográficas obtenidas del software PCPDFWIN versión 2.2.

CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA

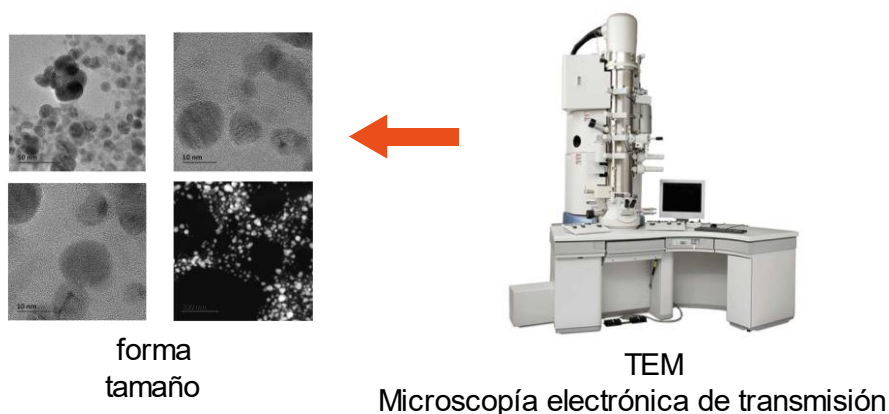


Figura 2.2: Diagrama de caracterización de nanopartículas por TEM. Fuente: Elaboración propia, micrografías propias.

2.7.-Pruebas de actividad microbici

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las NPs de plata y titanio obtenidas a partir de menta y manzanilla. Para el estudio se emplearon los microorganismos modelo:

Escherichia coli (Bacteria Gram negativa), que son microorganismos ampliamente utilizados en experimentos de actividad bacteriana y se asocian con la contaminación por materia fecal en el agua, así como el microorganismo *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva), conocido como el estafilococo dorado, bacteria que causa infecciones cutáneas y en mucosas que puede causar neumonía. Estas bacterias fueron seleccionadas por ser patógenos comunes en seres humanos fácilmente encontradas como fuente de contaminación en cuerpos de agua y alimentos, así como por su diferenciación Gram.

Para comprobar las cepas bacterianas, se realizaron diversas pruebas microbiológicas que permitan confirmar el género bacteriano, así como la clase bacteriana. Se realizaron cultivos de las cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* en tubos de Agar de tripticaseína (TSA), los cuales fueron resembrados en placas Petri con TSA utilizando la técnica de estría cruzada misma técnica que se realiza con un barrido con asa de inoculación bacteriológica sobre el medio de cultivo para la obtención de colonia típicas, las cuales fueron identificadas morfológicamente de forma macroscópica.

Así mismo se realizó la técnica de clasificación bacteriana de Tinción Gram, para identificar si las bacterias son Gram positivo o negativo en el microscopio óptico, con lo que se confirmó el Gram de cada una de las cepas utilizadas.

Se realizaron pruebas confirmativas de las cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*; a partir de estas cepas se realizaron siembras en los medios de cultivo selectivos (medios que permiten el crecimiento de un grupo bacteriano mientras inhibe el crecimiento de otros grupos), los medios selectivos seleccionados para esta investigación y afines a las bacterias seleccionadas fueron los siguientes: sal y manitol (para *Staphylococcus*), Eosina azul de metileno (medio selectivo de bacterias coliformes y enterobacterias), MIO (medio selectivo de confirmación de movilidad bacteriana), así como en reactivo de Kovacs (producción de indol en bacterias Gram negativas).

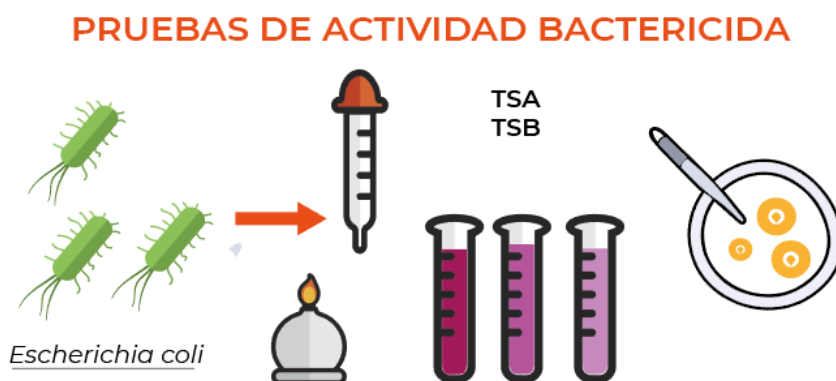


Figura 2.3: Diagrama de ensayos microbiológicos por prueba bactericida de nanopartículas.

2.8. Siembra de cepas control.

Se prepararon tubos microbiológicos con TSA (Bioxon) con la técnica de plaqueo de pico de flauta a 45°, esta técnica de siembra de estría permite una preservación de las cepas bacterianas viables y a partir de ellas poder realizar resiembras; en estos tubos se sembró una asada de la cepa *E. Coli* y *S. aureus* y se incubaron de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C.

A partir de estos cultivos, se realizaron resiembras en TSA (Bioxon), para lo que se hizo una preparación de agar en agua desionizada siguiendo las instrucciones del fabricante, poniéndolo a hervir para posteriormente esterilizarlo en frascos microbiológicos a 121 °C ± 1 °C a una presión de 1.5 ± 0.25 kg/cm³ durante 15 min en autoclave, con el objetivo de tener un medio de cultivo estéril a una temperatura mayor a 45 °C para su posterior preparación. En placas Petri las cuales fueron previamente esterilizadas a 170 °C por 2 h en horno de calor seco, se vertió el TSA hasta la gelificación a 45 °C, y una vez solidificado se realizaron las resiembras de las cepas en con la técnica de estría cruzada para obtener colonias típicas, las cuales se incubaron de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C. Las resiembras se realizaron para poder mantener muestras bacterianas viables y realizar resiembras en caldo de cultivo (TSB) para los ensayos de actividad microbicida por el método de diluciones sucesivas.

A partir de estos cultivos se realizan resiembras en caldo de soya tripticaseína (TSB, Bioxon), en tubos con TSB previamente preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y esterilizados en autoclave. Se siembra una asada de la cepa control en aproximadamente 10 mL de caldo TSB en tubo de ensaye y se incuba de 18 a 24 h a 36 ± 1 °C, con el objetivo de tener el mayor número de bacterias de las cepas de *E. Coli* y *S. aureus*.

2.9. Ensayo de diluciones sucesivas.

Se preparó un inóculo, basándose en la técnica microbiológica de diluciones sucesivas, tomando como base la Norma Oficial Mexicana (NOM-110-SSA1-1994), se efectúan diluciones de la cepa, tomando un mililitro de la suspensión bacteriana en TSB (homogenizar previamente en vortex), y se transfiere a un tubo de ensaye que contenga 9 mL de solución salina estéril al 0.85%, obteniendo de esta manera la primera dilución la cual corresponde a 1×10^{-1} unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

Se prosigue con las diluciones hasta llegar a tener 7 diluciones, donde cada una de estas diluciones representa un 1/10 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) que la anterior, de forma que al llegar a la última dilución representa un 1×10^{-7} bacterias que las existentes en el inóculo original, estas diluciones se homogenizan cada vez con la ayuda del agitador de tubos vortex, el volumen de muestra o la dilución elegida para la siembra es aquella en que se sospecha que se tendrá un número de colonias que podrán ser contadas y no se superponen entre unas y otras.

2.10. Estudio de la actividad antimicrobiana.

A partir de las diluciones 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} se colocó 1 mL del inóculo de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*, de manera independiente en cajas Petri por duplicado, se adicionó 1 mL de las soluciones de NPs metálicas previamente preparadas de plata-menta, plata-manzanilla, titanio-menta y titanio-manzanilla, dándoles un tiempo de contacto de 15 min. Consecutivamente, se adicionaron 10 mL de medio preparado de TSA, homogeneizado perfectamente, y cada una de esta serie

de experimentación microbiológica se realizó por triplicado. Se incluyeron controles: controles positivos sin nanopartículas que serán el punto de comparación de UFC, y de igual manera, se tomaron en cuenta controles solo con nanopartículas para comprobar la posible existencia de contaminación bacteriana; posteriormente, se dejaron solidificar y se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h.

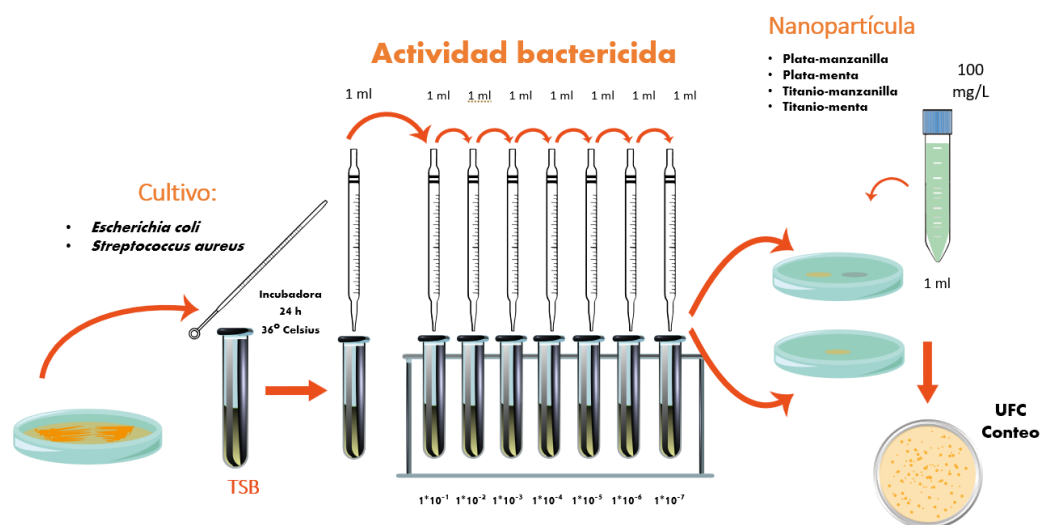


Figura 2.4. Diagrama del método de diluciones sucesivas realizado, utilizando NPs de plata y titanio.

Una vez concluido el período de incubación, se contabilizaron las UFC/mL, de cada una de las diluciones, teniendo en consideración que las NPs inhibieran el desarrollo bacteriano o que eliminaran el 90% de las bacterias presentes en medio, comparándolo con el control positivo.

2.11. Determinación de fenoles totales por medio del ensayo con reactivo Folin-Ciocalteu (FC)

En la fitosíntesis de nanopartículas se reporta que el principal agente reductor en las fitomoléculas de los extractos de plantas son los compuestos fenólicos (flavonoides, terpenos, polifenoles), mismos que por su alta capacidad de oxidación son considerados antioxidantes; se escogió el método de determinación de fenoles totales

y compuestos antioxidantes de Singleton, utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton, 1974).

Se realizó la determinación de los fenoles totales en los extractos de manzanilla y menta, utilizando el reactivo FC, que, por medio de una reacción de oxidación, permite obtener óxidos azules de tungsteno y molibdeno, en equivalentes de ácido gálico en mg/L cuyos resultados se pueden leer en una curva de calibración.

La curva de calibración se realizó a partir de una disolución stock de ácido gálico de 1 mg/mL se realizaron 7 patrones de concentraciones conocidas (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.7, 1.0 y 1.2 mL) así como un blanco y se aforaron a 10 mL en matraces.

Así mismo se realizaron disoluciones de carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro al 10% con agua desionizada aforados a 10 mL; como último preparativo, se realizaron diluciones 1/5 de los extractos de menta y manzanilla previamente obtenidos para facilitar la lectura de las muestras preparadas, estas diluciones se tomarán para la obtención de la concentración de fenoles totales.

A continuación, se realizaron los patrones para la determinación de FC, esta vez en tubos de ensayo de 10 mL en los cuales y en el orden siguiente se agregaron: 0.5 mL del reactivo FC con un color amarillo característico, 0.5 mL del patrón de ácido gálico correspondiente, 1 mL de carbonato de sodio al 10% y 8 mL de agua desionizada. Se aplicó el mismo procedimiento para preparar los extractos de manzanilla y menta, agregando 0.5 mL en sustitución de los 0.5 mL del patrón de ácido gálico, teniendo así un blanco 7 patrones y 2 muestras.

Por último, se realizó una curva de calibración utilizando el blanco y los 7 patrones de ácido gálico, misma que permitió determinar la concentración de equivalentes de ácido gálico en las muestras preparadas en este trabajo.

3. Resultados

3.1. Procesamiento de la biomasa

La adecuación de la biomasa (hojas) de las especies *Chamaemelum nobile* y *Mentha piperita* se presentó sin complicaciones, las condiciones establecidas para su obtención permitieron la recuperación de la biomasa de las hojas en su totalidad; sin embargo, las hojas de manzanilla al ser sésiles y de un tamaño pequeño requirieron un mayor tiempo para su obtención con respecto a las de menta, misma situación que ocurrió con la pulverización en mortero de ágata; ambas biomásas se tamizaron en un tamiz de laboratorio con malla de 100 mesh para obtener un tamaño de partícula de 149 μm , el diagrama general del proceso realizado es el siguiente:



Figura 3.1. Diagrama de obtención de extractos acuosos de biomasa.

Se utilizaron 20 plantas maduras de las especies *Chamaemelum nobile* y *Mentha piperita* se pudieron obtener las siguientes cantidades de biomasa de las hojas.

Tabla 3.1. Biomásas obtenidas (hojas)

Especie	Cantidad de biomasa en polvo obtenido (hojas)
<i>Chamaemelum nobile</i>	24.5 g

<i>Menta piperita</i>	49.5 g
-----------------------	--------

3.2. Preparación de soluciones de precursores metálicos

Las soluciones preparadas de AgNO_3 0.1 M y TiO_2 0.1 M con agua desionizada, presentaron los siguientes valores de pH previos al ajuste:

Tabla 3.2. pH de soluciones de precursores metálicos previo ajuste de pH

Precursor	Concentración mol/L	pH
AgNO_3	0.1	4.81
TiO_2	0.1	6.83

El ajuste de pH 4 de estas soluciones se realizó con ácido nítrico al 0.1 M.

La preparación de las soluciones de precursores metálicos se realizó de forma general de acuerdo con el siguiente diagrama:

Preparación de soluciones precursoras

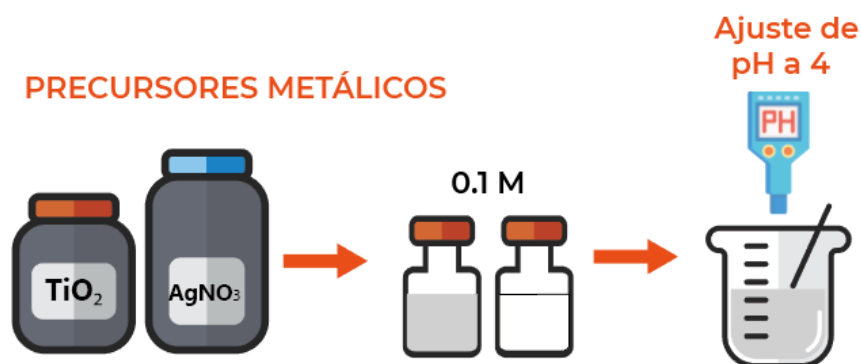


Figura 3.2. Diagrama de preparación de soluciones precursoras metálicas al 0.1 M

3.3. Fitosíntesis de nanopartículas.

Una forma inicial para confirmar la formación de nanopartículas es a través de un cambio de coloración, una vez que el extracto de biomasa y la solución de precursores metálicos entran en contacto comienza el proceso de reducción de los metales en forma iónica, formando nanopartículas metálicas a través de procesos de nucleación y estabilización, observables cuando se comienzan a mezclar las partes de la síntesis, mismas que en una suspensión coloidal absorben y transmiten parte del espectro de radiación UV-visible, lo que le permiten tener una coloración característica y visible de acuerdo a su tamaño y forma (Gonzales *et al.*, 2014); en general se ha reportado que una suspensión de nanopartículas de plata esféricas tienen una coloración que va del amarillo al café dependiendo de su concentración (Gabriela *et al.*, 2017), y las de titanio tienen una coloración amarilla (Sivaranjani *et al.*, 2016). Las nanopartículas sintetizadas para esta investigación presentaron una coloración café para el caso de plata y verde-amarillo para el titanio. La metodología se realizó de acuerdo con el siguiente diagrama.

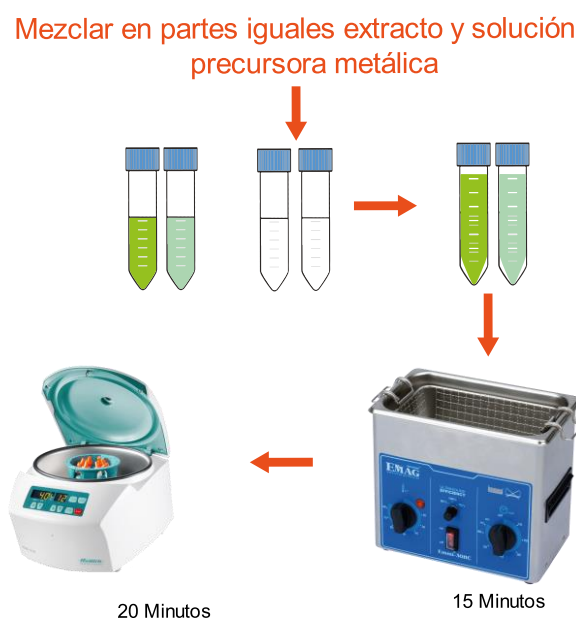


Figura 3.3: Diagrama de síntesis de nanopartículas, baño ultrasónico y sedimentadas en centrífuga.

3.4. Caracterización de nanopartículas

Para el caso de la caracterización de los dos tipos de nanopartículas metálicas se realizaron tres pruebas, la espectrofotometría UV-VIS para la detección del plasmón de resonancia superficial localizado, la espectroscopía IR con un equipo con el que, a partir de la medición de las elongaciones intermoleculares, se puede determinar la presencia de grupos funcionales orgánicos. Por último, la caracterización por medio de la microscopía electrónica de transmisión permite obtener micrografías que ayudarán a determinar el tamaño, así como identificar el cristal sintetizado.

3.4.1.-Espectroscopía UV-vis

Las pruebas en UV-VIS, requirieron de una dilución 1/2 de la suspensión de nanopartículas ya que mostraron errores derivados a una alta concentración que no permitiera el cumplimiento de la ley de Beer-Lambert, esto debido principalmente a que en concentraciones superiores a 0.02 M las moléculas comienzan a solaparse o a encontrarse tan juntas que por interacciones electrostáticas provocan errores de medición.

En la Figura 3.4 se presenta la respuesta óptica (plasmón) de las nanopartículas de plata obtenidas con manzanilla y se observa el pico de absorción de las nanopartículas en 313 nm. En la Figura 3.5 se presentan dos picos visibles, de 260 y 350 nm, correspondientes a nanopartículas de plata sintetizadas con menta. Se observa un desplazamiento hipsocrómico, se presume por la existencia del grupo auxocromo (-OH) en las biomoléculas de las plantas de menta y manzanilla (Oh *et al.*, 2021).

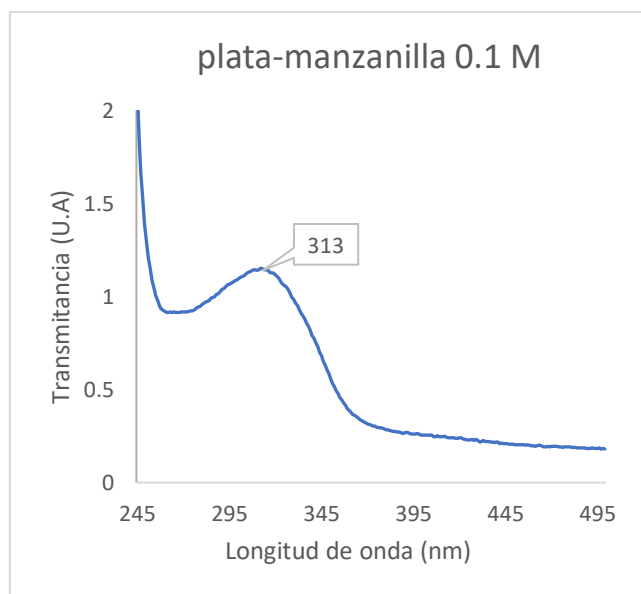


Figura 3.4. Espectro de absorción de nanopartículas de plata fitosintetizadas con manzanilla.

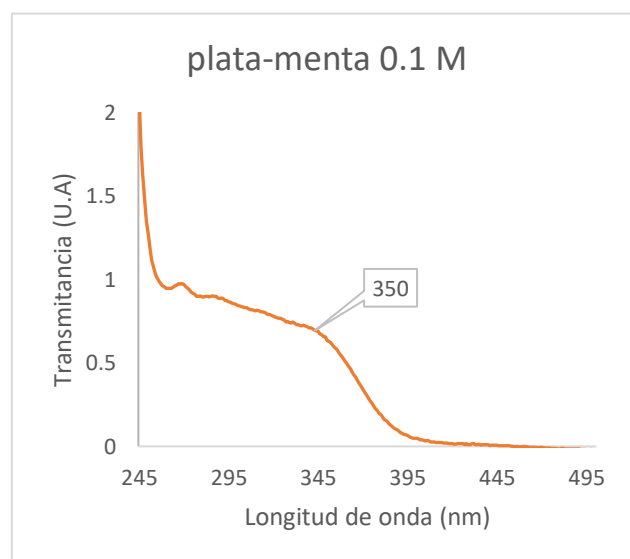


Figura 3.5. Espectro de absorción de nanopartículas de plata fitosintetizadas con menta.

Por parte, de las nanopartículas de titanio se observa en la Figura 3.6 que corresponde a las nanopartículas titanio-manzanilla, un máximo pico de absorción en 321 nm; de una manera similar, el máximo pico de absorción en la Figura 3.7 que corresponde a

titanio-menta es de 340 nm, ambos picos identificados corresponden al rango del plasmón de resonancia superficial identificado para el titanio en los trabajos de fitosíntesis de nanopartículas de titanio de Rafique y Amanulla (Rafique *et al.*, 2019; Amanulla *et al.*, 2019).

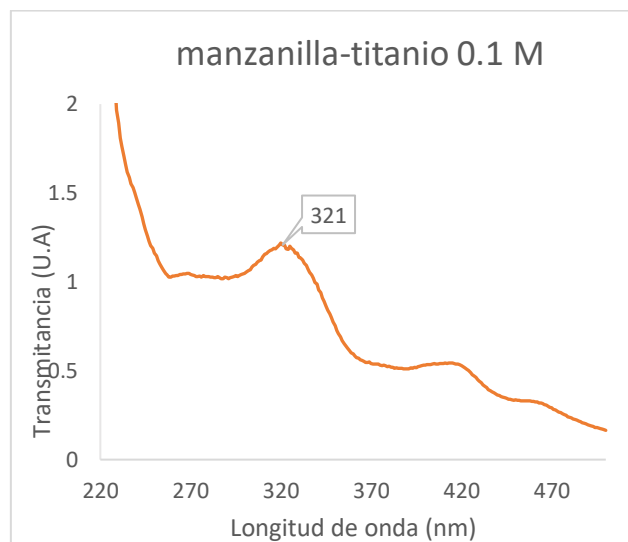


Figura 3.6. Espectro de absorción de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con manzanilla.

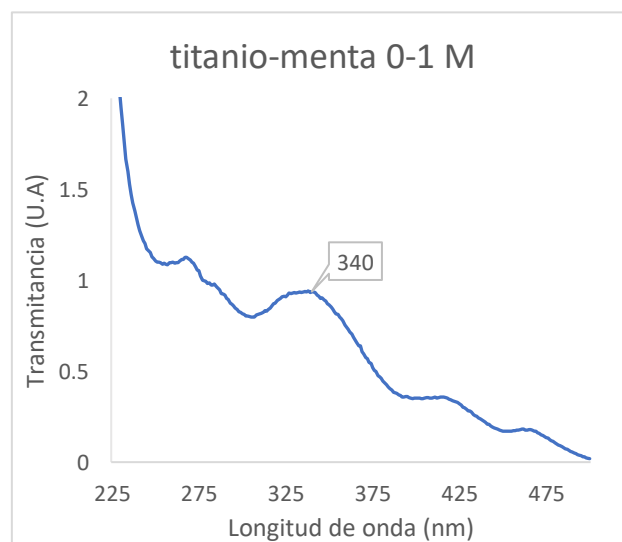


Figura 3.7. Espectro de absorción de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta.

En la Tabla 3.3 se presentan los datos del plasmón de resonancia superficial obtenidos para nanopartículas de Ti y Ag sintetizadas con otras plantas. Se observa que las nanopartículas de Ag fitosintetizadas en este trabajo, se encuentran desplazadas hipsocrómicamente a una longitud de onda más baja (340 nm) que en otros trabajos (420 nm). Se ha reportado el cómo diversos factores como el pH o el intervalo de tiempo de síntesis provocan desplazamientos en el plasmón obtenido, observando desplazamientos, mismo comportamiento que se reporta en trabajos a pH 4 (Silva, 2016); En el caso de las nanopartículas de Ti se observa que los plasmones detectados para las TiNPs de este trabajo son similares a otros que se reportan en la literatura (Martínez *et al.*, 2010).

Tabla 3.3. Picos de absorbancias registrados por UV-VIS para nanopartículas de plata y titanio fitosintetizadas.

Planta	Nanopartícula	Longitud de onda nm SPR	Referencia
<i>Chamaemelum nobile</i>	Ag	350	Este trabajo
<i>Menta piperita</i>	Ag	313	Este trabajo
<i>Allium sativum</i>	Ag	400	(Calle <i>et al.</i> , 2014)
<i>Eichhornia crassipes</i>	Ag	278	(Silva, 2016)
<i>Opuntia sp</i>	Ag	420	(Ledezma <i>et al.</i> , 2014)
<i>Crataegus gracilior</i>	Ag	500	(Ronquillo <i>et al.</i> , 2013)

<i>Citrus sinensis</i>	Ti	315	(Amanulla <i>et al.</i> , 2019)
<i>Syzygium cumini</i>	Ti	356	(Sethy <i>et al.</i> , 2020)
<i>Ludwigia octovalvis</i>	Ti	390	(Ramasamy <i>et al.</i> , 2021)
<i>Chamaemelum nobile</i>	Ti	321	Este trabajo
<i>Menta piperita</i>	Ti	340	Este trabajo
<i>Melia azedarach</i>	Ti	330	(Rafique <i>et al.</i> , 2019)

3.4.2. Espectroscopía infrarroja FTIR

Las suspensiones que contenían las nanopartículas metálicas se analizaron por espectroscopía infrarroja ya que es importante identificar los principales grupos funcionales que fungieron como agentes estabilizadores y que a su vez conforman el recubrimiento en las nanopartículas, de acuerdo a la figura 3.8 el mecanismo sugerido de síntesis de nanopartículas establecido por Reddy y colaboradores se fundamenta en como las fitomoléculas actúan como agentes reductores y estabilizadores principalmente con -OH que interaccionan con los iones metálicos. En la Figura 3.9 se presenta el IR de la suspensión de las nanopartículas de plata fitosintetizadas con manzanilla y menta. La vibración en 3500 cm^{-1} indica la presencia de grupos O-H, característicos de los polifenoles, mismas que se identifican en otros estudios de fitosíntesis de nanopartículas a partir de plata (Reddy *et al.*, 2021). La banda de absorción presente en 2900 cm^{-1} se relaciona a vibraciones de estiramiento de -CH principalmente relacionado a compuestos aromáticos (Kumari *et al.*, 2015). La

presencia de las nanopartículas de plata se asocia a la banda en 1340 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de $-\text{NO}_3$ proveniente del nitrato de plata (Reddy *et al.*, 2021). Los picos a 1050 y 1150 cm^{-1} representan las vibraciones de estiramiento del C-O de los compuestos aromáticos cuya presencia se asocia a los extractos vegetales de menta y manzanilla.

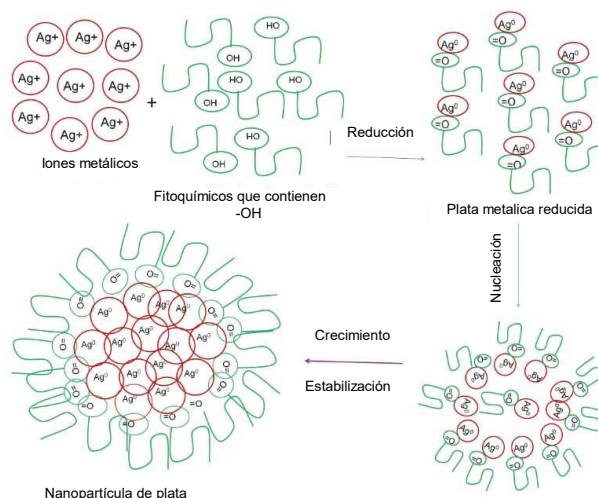


Figura 3.8. Diagrama de propuesta de mecanismo de fitosíntesis de nanopartículas de plata.

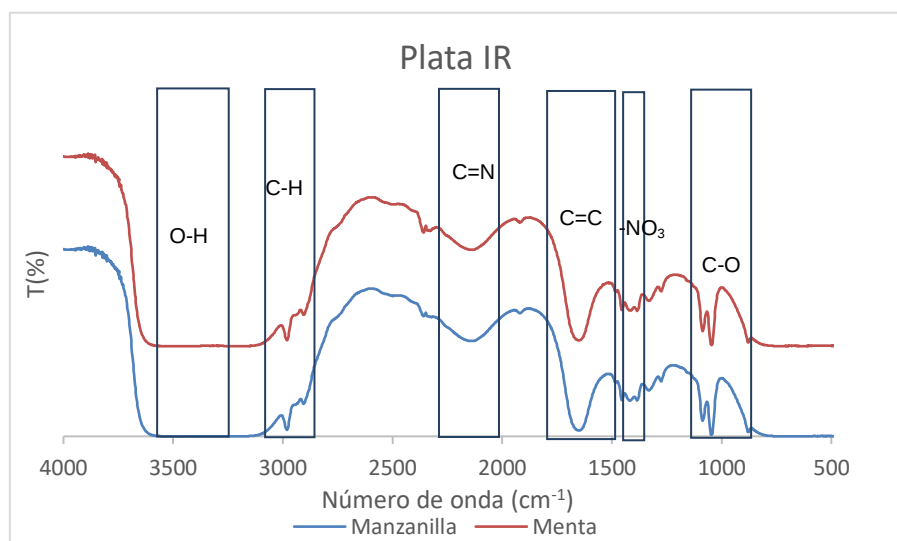


Figura 3.9. FTIR de nanopartículas de plata fitosintetizadas con menta y manzanilla.

Así mismo se realizó una diferencia de las señales producidas en el IR correspondiente a cada una de las suspensiones de menta y manzanilla para obtener nanopartículas de plata. Las diferencias se presentan en la Figura 3.10, donde los picos de mayor tamaño pertenecen a una variación mayor entre las bandas representativas de los grupos funcionales relacionados con las fitomoléculas de las plantas, a 3500 cm^{-1} para grupos O-H, a 1340 para las AgNPs formadas y, por último, a 1050 y 1150 cm^{-1} para la vibración C-O. Las diferencias entre las suspensiones pueden indicar que cada extracto vegetal influye en la formación de las nanopartículas, en este caso plata, respecto a la longitud de onda que produce el plasmón de cada suspensión, de ahí las variaciones entre plasmones presentadas en la tabla 3.3, o al tamaño, forma y composición de cada tipo de nanopartícula metálica, como se verá en la caracterización por microscopía de transmisión, por lo que es importante observar la importancia de los extractos de las plantas durante la síntesis de las nanopartículas.

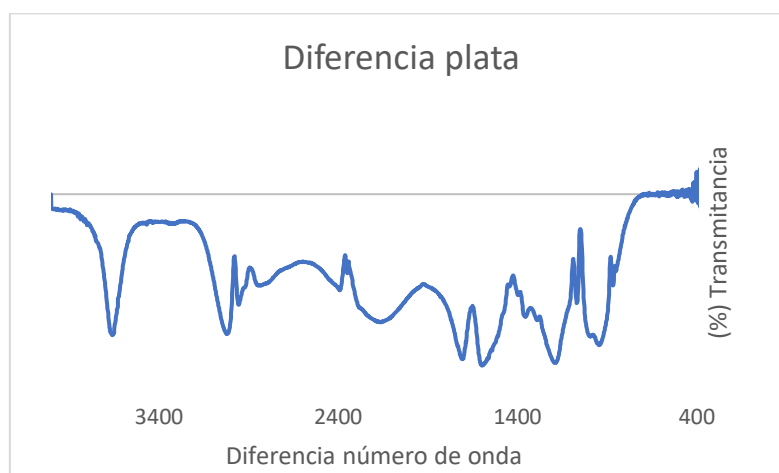


Figura 3.10: Diferencia de señales FTIR de nanopartículas de plata fitosintetizadas con menta y manzanilla.

En la Figura 3.10 el IR de la suspensión de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con manzanilla y menta, se puede observar una vibración a 3500 cm^{-1} representando la presencia de grupos O-H, grupos comunes en polifenoles encontrados en especies de plantas como flavonoides o taninos, se observan estos picos similares en trabajos de fitosíntesis con titanio, las bandas que se presentan en 2240 cm^{-1} indican la

presencia del grupo nitrilo ($\text{C}=\text{N}$). Para las nanopartículas de Ti, su formación se confirma con las bandas observadas entre $530\text{-}540\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a O-Ti-O en la región de la huella dactilar por debajo de los 1000 cm^{-1} (Ngoepe *et al.*, 2020).

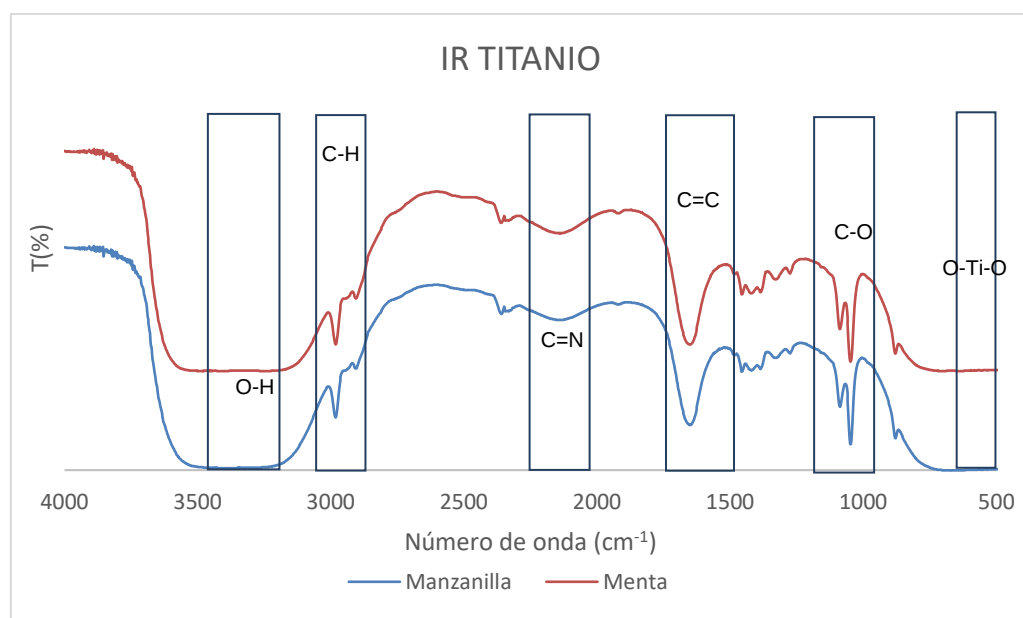


Figura 3.11: FTIR de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta y manzanilla.

De igual manera se realizó diferencia entre los IR correspondientes a la formación de nanopartículas de titanio en suspensión, también fotosintetizados con menta y manzanilla.

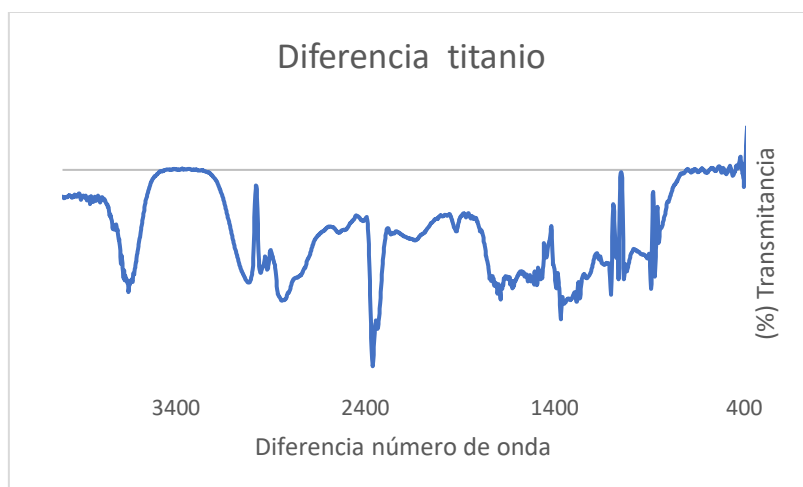


Figura 3.12: Diferencia de señales FTIR de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta y manzanilla.

De manera similar a la figura 3.11, las principales variaciones entre los espectros FT-IR de las suspensiones de las TiNPs corresponden a 3400 cm^{-1} para los grupos O-H, en 2240 cm^{-1} para nitrilo, y $530\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ para O-Ti-O. Las diferencias observadas confirman que al cambiar el tipo de extracto utilizado para la síntesis de nanopartículas cambia la longitud de onda del plasmón de la suspensión.

3.4.3.-TEM

Como parte de la caracterización de las nanopartículas sintetizadas se realizó un análisis por TEM (apartado 2.6) para obtener micrografías y obtener la distancia interplanar para determinar a qué estructura cristalina pertenece las nanopartículas sintetizadas de acuerdo a los sistemas obtenidos (manzanilla-TiNPs, menta-TiNPs, manzanilla-AgNPs, menta-Ag-NPs).

3.4.3.1.-Menta AgNps

En las nanopartículas de plata fitosintetizadas con el extracto de menta se observaron nanopartículas monodispersas con una aparente forma esférica, que cuentan con un promedio de 26 nm de diámetro, así mismo se identificó a través de su indexación por

medio de la FFT (Fast Fourier transform), que las nanopartículas detectadas tienen una estructura hexagonal con composición Ag_2O de óxido de plata (Tarjeta cristalográfica 72-2108).

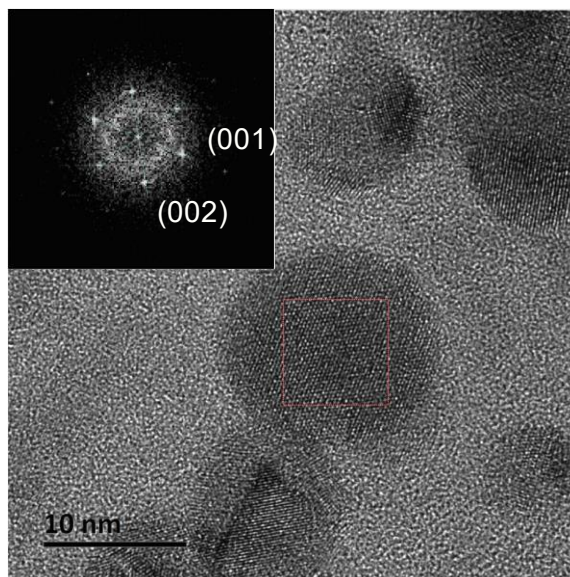


Figura 3.13: Micrografía de nanopartículas de plata fitosintetizadas con extracto de menta.

3.4.3.2.-Manzanilla AgNps

Para el caso de las nanopartículas de plata fitosintetizadas a partir del extracto de manzanilla se pueden observar nanopartículas con una aparente forma esférica, cuentan con un promedio de 6 nm de diámetro, las NPs sintetizadas tienen una estructura hexagonal con composición Ag_2O de óxido de plata (Tarjeta cristalográfica 19-1155).

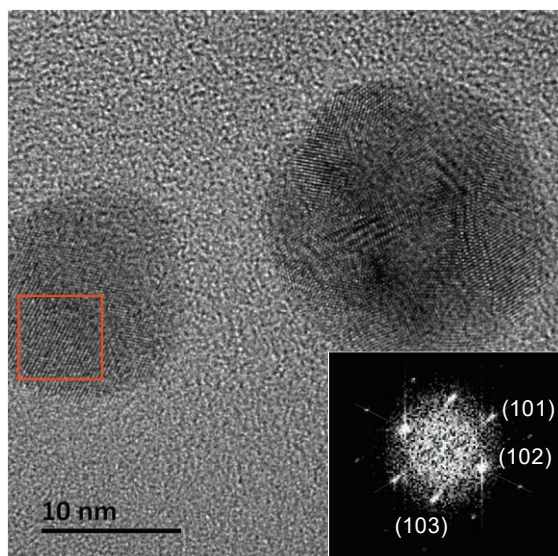


Figura 3.14: Micrografía de nanopartículas de plata fitosintetizadas con extracto de manzanilla.

3.4.3.3.-MentaTiNps

Las nanopartículas de titanio fitosintetizadas con menta, mostraron un tamaño mayor, estas se muestran aglomeradas y cuentan con una apreciable forma esférica, el tamaño promedio de las nanopartículas fue de 68 nm de diámetro, no obstante, se observaron por un lado TiNPs de hasta 407 nm de diámetro y, por otro lado, TiNPs de hasta 20 nm de diámetro, lo que indica la formación de nanopartículas de tamaños muy variados. Con respecto a la indexación, las TiNPs detectadas cuentan con una estructura ortorrómbica, con una composición de TiO_2 que corresponde a la tarjeta cristalográfica 16-0617.

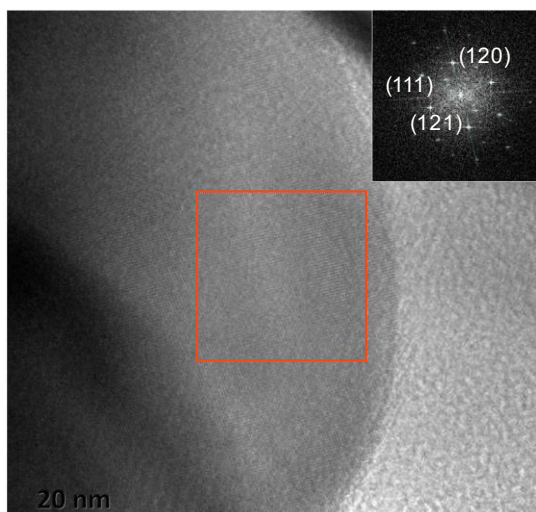


Figura 3.15: Micrografía de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con extracto de menta.

3.4.3.4.-ManzanillaTiNps

Por último, las nanopartículas de titanio fitosintetizadas con manzanilla muestran una aglomeración, con tendencia esféricas y un tamaño promedio de 160 nm en las TiNPs detectadas. El material sintetizado corresponde a la tarjeta cristalográfica 71-0650, con una estructura cristalina tetragonal, en fase de composición TiO_2 .

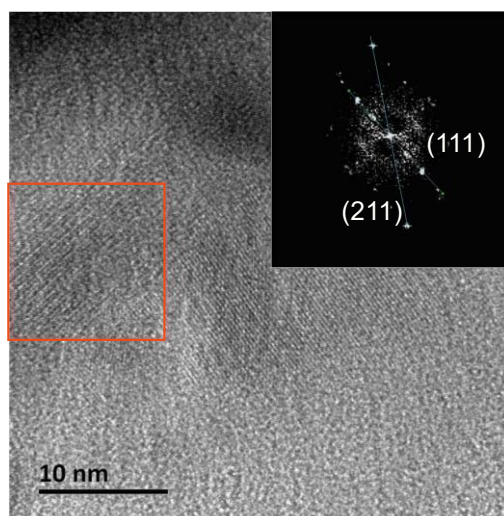


Figura 3.16: Micrografía de nanopartículas de titanio fitosintetizadas con extracto de manzanilla.

3.5.-Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales y compuestos oxidantes se realizó a través del método establecido por Singleton en 1974, a partir de la oxidación del complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico. Para esta determinación, se realizó un factor de dilución 1/5 de los extractos de manzanilla y menta, mismo que se tomará en cuenta para la determinación final de fenoles totales.

Una vez realizados los estándares y blancos con el reactivo F-C, ácido gálico, así como carbonato de sodio para mantener un pH básico, que permita la formación de los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico que al formar óxidos se observa una coloración azulada; se realizó una curva de calibración la cual es la siguiente:

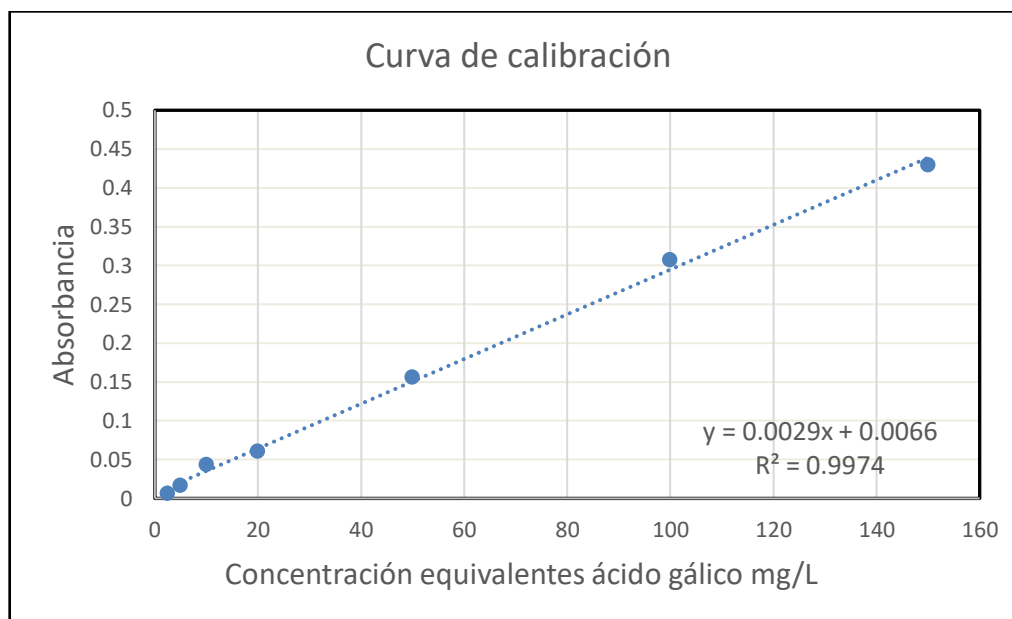


Figura 3.17: Curva de calibración de estándares para el ensayo de determinación de fenoles totales a partir del reactivo Folin-Ciocalteu.

A partir de esta curva de calibración, se obtuvo la concentración en mg/L en equivalentes ácido gálico de los extractos de la biomasa de manzanilla y menta. Se realizó esta curva de calibración en biomasa recuperada directamente de plantas sanas y maduras, así como la de plantas bajo régimen de estrés, para determinar de

forma comparativa la concentración de compuestos fenólicos existentes. Se utilizó la biomasa de plantas sin estresar para la síntesis de nanopartículas.

Tabla 3.4: Concentración de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico y compuestos oxidantes en extractos de manzanilla y menta a partir del ensayo con el reactivo Folin-Ciocalteu.

manzanilla estresada	71.95 mg/L	manzanilla	56.15 mg/L
menta estresada	57.35 mg/L	menta	50.45 mg/L

Se puede observar de forma evidente que cuando las plantas fueron sometidas a estrés (15 días de estrés de déficit hídrico y estrés por temperatura), la biomasa obtenida a partir de las hojas muestra un notable incremento en la concentración de los fenoles totales. Este resultado es similar a los reportes de la literatura, en los que se asocia la cantidad de fenoles como agentes que se sintetizan como diversos mecanismos de defensa ante el estrés abiótico en plantas (Manach *et al*, 2004).

Esta diferencia en la concentración de fenoles totales se espera se vea reflejada en futuros ensayos microbiológicos, por la relación directa de los fenoles como agentes reductores durante la síntesis de nanopartículas.

3.6.-Pruebas de actividad bactericida

Las pruebas de actividad bactericida a partir del método de diluciones sucesivas, con base en la norma (NOM-110-SSA1-1994), se realizó utilizando las bacterias modelo *E. coli* y *S. aureus*, con una solución de partida a una concentración de 100 mg/L, con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio de las nanopartículas comparándolo con el control positivo (crecimiento bacteriano en agar TSA por 24 horas); el efecto bactericida de las NPs fue notorio a partir de las diluciones 1×10^{-5} de todos los sistemas sintetizados, por otra parte el conteo de UFC de *S. aureus* y *E. coli* de las diluciones

1×10^{-1} a la 1×10^{-4} mostró un crecimiento elevado de bacterias, que no permitía el conteo de las UFC ya que se formaron capas uniformes de bacterias o superposición de colonias bacterianas que impedían el conteo.

3.6.1.-Pruebas confirmativas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas confirmativas de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se realizaron de acuerdo con lo descrito en la metodología en el punto 2.7. Con respecto al cultivo de agar sal y manitol, la prueba tuvo crecimiento en la cepa de *S. aureus* con una coloración amarilla característica de este microorganismo. El *S. aureus* es una especie coagulasa positiva por lo que es un fermentador de manitol, mismo que forma colonias amarillas en el agar sal y manitol, así mismo se pudo observar morfológicamente colonias típicas redondas, de bordes lisos, convexas, de 2-3 mm de diámetro, húmedas, brillantes, color amarillo-dorado, con un borde fino amarillo, en cuanto a *Escherichia coli* no existió el crecimiento en este agar.

En cuanto a la prueba con agar de Eosina azul de metilo igual, en *E. coli*, existió un crecimiento con colonias típicas de color morado metálico (colonias medianas, circulares, convexas, moradas, contorno verde-metálico, bordes redondeados), mismas que permiten conformar la fermentación de lactosa, este medio es selectivo de cultivo de bacilos Gram negativo principalmente enterobacterias por lo que permite aseverar que la cepa es una bacteria Gram negativa, bacilo y que fermenta lactosa, como lo es la especie *Escherichia coli*, por otra parte al ser un medio selectivo el azul de metileno inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas por lo que en el cultivo de *S. aureus* no existió crecimiento.

Con respecto a la prueba de motilidad, los cultivos en medio semisólido MIO (motilidad, indol y ornitina), permitieron determinar la movilidad flagelar de *E. coli*, por la presencia de un crecimiento con turbidez alrededor del área de inoculación. Con respecto al uso de reactivo de Kovacs, se pudo observar la producción de indol por la formación de un anillo rojo en la superficie del tubo de siembra, por último, en *S. aureus*, el crecimiento

bacteriano solo se dio en la zona de inoculación por lo que no existe movilidad, y la prueba de indol dio negativa al formarse una superficie amarilla-anaranjada.

La tabla 3.5 resume los ensayos realizados:

Tabla 3.5: Resultados de ensayos confirmativos para *E. coli* y *S. aureus*.

Especie bacteriana	Agar sal y manitol	Eosina y azul de metileno	MIO	Indol (Reactivo Kovacs)
<i>Escherichia coli</i>	Sin crecimiento	Con crecimiento	Movilidad confirmada	Indol positivo
<i>S. aureus</i>	Con crecimiento	Sin crecimiento	Sin movilidad	Indol negativo

En cuanto a la tinción diferencial de Gram, se pudieron observar, que para la cepa de *E. coli*, se desarrolla una coloración rosa y bacterias con forma de bacilo como se observa en la figura 3.18, así mismo, para el caso de *S. aureus* se puede observar una tinción azul-morada y bacterias con una forma de coco en la figura 3.19, ambos resultados confirman el Gram y la forma bacteriana esperadas.

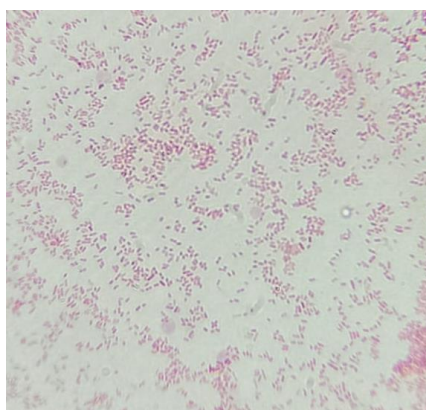


Figura 3.18: Fotografía en microscopio óptico a 100x en inmersión de *Escherichia coli*.



Figura 3.19: Fotografía en microscopio óptico a 100x en inmersión de *S. aureus*.

3.6.2.-Cuenta de cepas bacterianas

Para el conteo de cepas bacterianas, la concentración de las UFC/mL se obtuvo multiplicando las UFC*el inverso de la dilución del inóculo, los datos se representan en la Tabla 3.6, en promedio:

Tabla 3.6: Cuenta en placa de las UFC/mL de los inóculos con dilución 1×10^{-7} de las cepas bacterianas.

Muestra	Dilución	UFC/m/L
<i>E. coli</i>	1×10^{-7}	1.44×10^9
<i>S. aureus</i>	1×10^{-7}	3.3×10^8

En correspondencia a las cantidades de UFC m/L se observa que el rango de UFC se encuentra en el orden de 10^8 para *E. coli* y 10^9 para *S. aureus*, similar con otros trabajos identificados con rangos de 10^6 hasta 10^9 (Pal *et al.*, 2007), es importante aclarar que la cantidad de las UFC m/L depende mucho de la cepa con la que se trabaja.

3.6.3.-Determinación del porcentaje de inhibición UFC

Se realizó el ensayo de diluciones sucesivas para determinar el porcentaje de inhibición de las UFC, las pruebas se realizaron por triplicado. Se agregó 1 mililitro de cada una de las suspensiones de NPs, para las diluciones 1×10^{-5} a 1×10^{-7} , se dejó un tiempo de contacto de 15 minutos colocando en caja Petri primero el mililitro de NPs, y posteriormente un mililitro de inóculo en la misma área dejándolos un tiempo de contacto de 15 minutos, para posteriormente colocar TSA y homogeneizar perfectamente, este procedimiento se realizó por duplicado.

Los resultados de las UFC con respecto a las diluciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.7: Cuenta en placa de las UFC/mL de los inóculos 1×10^{-5} a 1×10^{-7} a partir de la síntesis de nanopartículas de plata y titanio utilizando las especies menta y manzanilla como agentes reductores.

<i>E. coli</i> AgNPs	Inicial	menta	manzanilla
Dilución del inóculo	UFC/mL	Concentración NP 100 mg/L	Concentración NP 100 mg/L
Sin dilución	Incontable	Incontable	Incontable
1×10^{-5}	Incontable	402	262
1×10^{-6}	511	72	95
1×10^{-7}	144	28	23
<i>S. aureus</i> AgNPs	Inicial	menta	manzanilla
Sin dilución	Incontable	Incontable	Incontable

1×10^{-5}	461	15	23
1×10^{-6}	245	4	5
1×10^{-7}	33	2	1
<i>E. coli</i> TiNPs	Inicial	menta	manzanilla
Sin dilución	Incontable	Incontable	Incontable
1×10^{-5}	Incontable	504	624
1×10^{-6}	511	200	124
1×10^{-7}	144	59	42
<i>S. aureus</i> TiNPs	Inicial	menta	manzanilla
Sin dilución	Incontable	Incontable	Incontable
1×10^{-5}	461	358	286
1×10^{-6}	245	122	106
1×10^{-7}	33	10	9

La tabla 3.7 muestra que existe una evidente disminución de las UFC existentes, con respecto al aumento de las diluciones sin el tratamiento de nanopartículas, en los tratamientos con nanopartículas se observa que las AgNP muestran una mejor actividad microbiciada que las TiNP con ambas plantas, así mismo, se puede observar que a pesar del cambio de metal, Ag o Ti, en ambos casos se observa el mismo

comportamiento, las AgNP tienen un mejor efecto microbicida que las de TiNP en ambas cepas, y este efecto mejora aún más cuando se usa la cepa de *S. aureus*.

El efecto inhibitorio se observa en la Figura 3.20, para las AgNPs se inhibe un porcentaje mayor de cepas de *S. aureus*, utilizando nanopartículas obtenidas con manzanilla se observa un resultado dado el tamaño de las nanopartículas sintetizadas con plata como precursor metálico (3.4.3.1 y 3.4.3.2). Como se presenta en los resultados de Folin-Ciocalteu, la manzanilla dispone de una cantidad mayor de compuestos fenólicos, mismos que se relacionan con la eficiencia de las fitosíntesis al tener una mayor cantidad de moléculas que pueden interactuar en procesos de reducción y estabilización

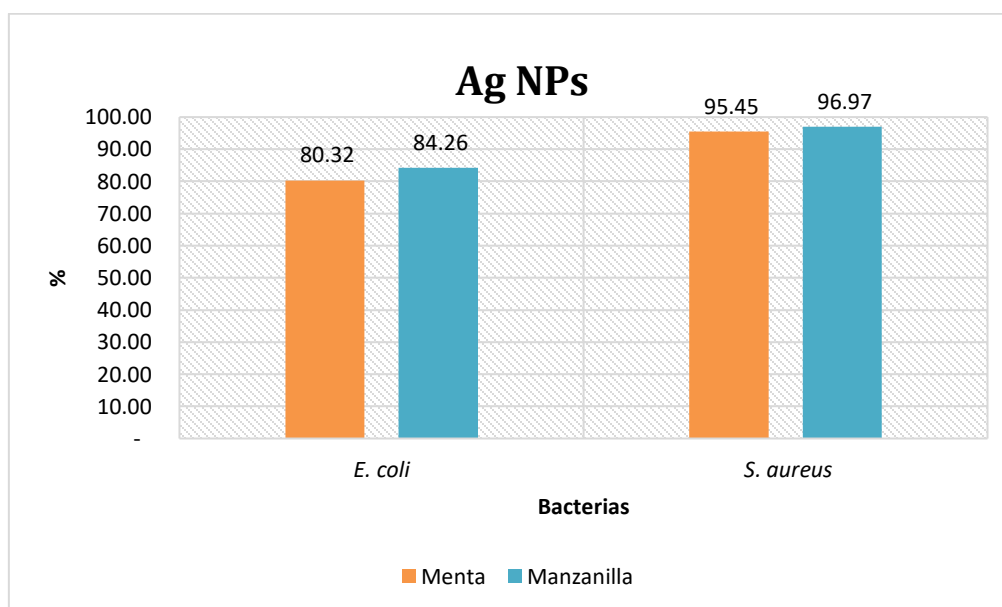


Figura 3.20: Porcentaje de inhibición de los tratamientos de NPs de plata en *E. coli* y *S. aureus* utilizando como biomasa

En el caso de la cepa de *S. aureus* que son Gram positiva, estas suelen presentar solo una membrana exterior, por lo tanto, la entrada de las nanopartículas al interior de los microorganismos encuentra menos dificultad que para el caso de las cepas *E. coli* que, al ser Gram negativa, tiene una doble membrana lo que puede dificultar la entrada de las nanopartículas al interior de las cepas para inhibir su crecimiento.

Un comportamiento similar se puede observar en el tratamiento con nanopartículas de titanio que se muestra en la Figura 3.21, aunque el efecto bactericida en general es menor con respecto al obtenido con las nanopartículas de plata, esta situación se relaciona al tamaño de estas nanopartículas, estudios sobre la fitosíntesis de titanio han determinado que el pH de síntesis se relacionó con el tamaño de las nanopartículas obtenidas, a menor pH el tamaño de las nanopartículas es mayor y a mayor pH se han reportado tamaños menores, esto se relaciona con la creencia que a menor pH la agregación de las nanopartículas de es favorecida sobre el fenómeno de nucleación lo que propicia obtener nanopartículas de mayor tamaño (Edison *et al.*, 2016).

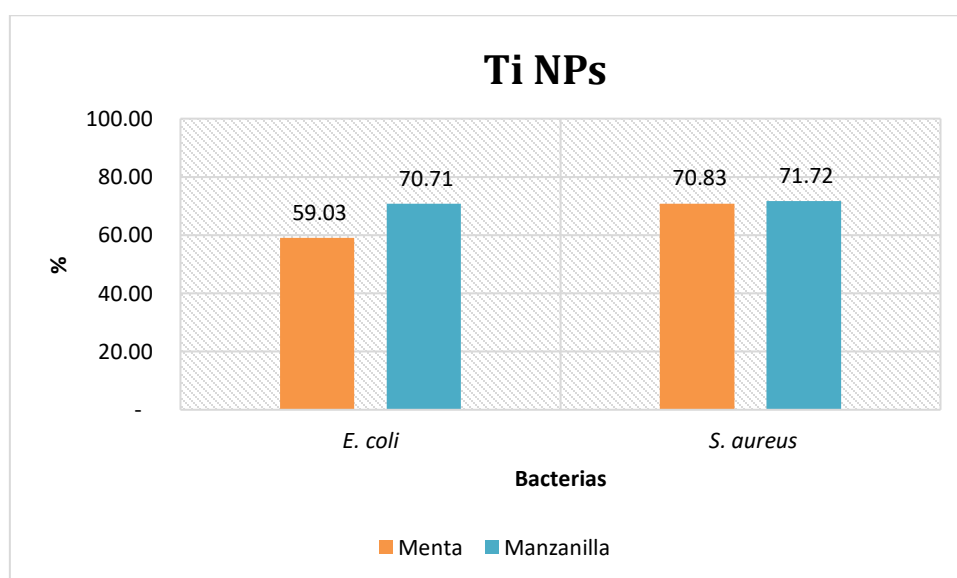


Figura 3.21: Porcentaje de inhibición de los tratamientos de NPs de plata en *E. coli* y *S. aureus* utilizando como biomasa menta y manzanilla.

Conclusiones

Las conclusiones que se obtienen de la realización de este proyecto son las siguientes:

- La fitosíntesis de nanopartículas metálicas de plata y titanio a partir de extractos de las plantas manzanilla y menta, es un método amigable con el medio ambiente.
- La síntesis de suspensiones de nanopartículas se llevó a cabo de acuerdo con lo esperado, mostrando como indicador de la correcta síntesis un cambio en la coloración, correspondiente a la interacción de la luz visible con las nanopartículas en una suspensión, mostrando para las nanopartículas de plata un color café, y para las de titanio una coloración amarilla.
- La identificación del plasmón de resonancia superficial por medio de espectroscopía de UV-Vis, se identificó para el titanio en un rango de los 340 nm tanto para las TiNPs sintetizadas con menta y manzanilla, sin embargo, para el caso de la plata (350 nm) tanto para las nanopartículas sintetizadas con menta y manzanilla se observa la existencia de un desplazamiento hipsocrómico, comportamiento que se relaciona al pH de síntesis e identificado en otros trabajos con mismas condiciones.
- La caracterización por FTIR permitió identificar los grupos funcionales relacionados con las biomoléculas existentes en los extractos de biomasa de menta y manzanilla, en ambos extractos se identificaron las bandas a 3500 cm^{-1} que indica la presencia de vibraciones de tensión de grupos O-H, característicos de los polifenoles, la banda de absorción a 2900 cm^{-1} se relaciona a vibraciones de tensión de -CH, así como los identificados a 1050 y 1150 cm^{-1} que representan las vibraciones de tensión de C-O de los compuestos aromáticos presentes en las fitomoléculas.
- La presencia de las nanopartículas de plata se asocia a la banda en 1340 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de $-\text{NO}_3$ proveniente del nitrato de plata y por consecuente prueba de la reducción y presencia de nanopartículas de plata; por

otra parte, la banda de absorción a $530\text{-}540\text{ cm}^{-1}$, corresponde a O-Ti-O en la región de la huella dactilar por debajo de los 1000 cm^{-1} para las nanopartículas de titanio.

- Las micrografías obtenidas por medio de TEM, permitieron identificar la estructura de los sistemas sintetizados, así como el diámetro promedio; para las nanopartículas de plata-menta se obtuvo un tamaño de 26 nm de diámetro, se determinó una estructura hexagonal y una composición como Ag_2O indexado como la tarjeta cristalográfica 72-2108. Para las nanopartículas de plata-manzanilla el diámetro fue de 6 nm con una estructura hexagonal de fase de composición Ag_2O y una tarjeta cristalográfica 19-1155.
- Para el caso de las nanopartículas de titanio ambos sistemas mostraron un tamaño de partícula mayor, para el sistema titanio-menta se obtuvieron nanopartículas con diámetros de 68 nm con tendencia a la aglomeración, fase de composición de TiO_2 y una tarjeta cristalográfica 16-0617. Por último, el sistema titanio-manzanilla obtuvo las nanopartículas de mayor tamaño, aglomeradas y con un diámetro de 160 nm, de estructura tetragonal fase de composición TiO_2 y con la tarjeta cristalográfica 71-0650. El tamaño de las nanopartículas se relaciona directamente a la capacidad bactericida obtenida, siendo los sistemas con titanio los que presentaron la menor capacidad bactericida (70%).
- Las pruebas microbiológicas tuvieron resultados notoriamente visibles a partir de las diluciones 10^{-5} , de acuerdo con el porcentaje de inhibición de las UFC, se concluye que el tratamiento con NPs de plata tuvo en general una mayor capacidad bactericida logrando porcentajes mayores al 95 % ante la bacteria *S. aureus*, y teniendo eficiencias mayores al 80% en *E.coli*.
- Las nanopartículas de titanio por otra parte presentaron porcentajes de inhibición bacteriana entre el 59 y el 71 %, siendo los más discretos los obtenidos con *E. coli* utilizando como biomasa menta.

- Por parte de la concentración de polifenoles y compuestos oxidantes a través del método del ensayo de Folin-Ciocalteu, se obtuvo una concentración mayor en la biomasa de manzanilla 56.15 mg/L con respecto a los obtenidos en la biomasa de menta 50.45 mg/L.
- Se puede observar como la concentración de polifenoles presentes en los extractos de la biomasa de menta y manzanilla tienen una relación con la capacidad bactericida de las nanopartículas sintetizadas; la concentración de polifenoles totales en la biomasa de las hojas de manzanilla fue 5.7 mg/L superior a la de menta, ya que los polifenoles son los principales compuestos reductores durante la fitosíntesis una mayor concentración de estos compuestos brinda una mayor cantidad de grupos -OH que están disponibles para la reducción de iones metálicos, aunado al hecho de que los polifenoles actúan de igual manera durante la estabilización de las nanopartículas; estos hechos permiten proponer que el uso de extracto de hojas de manzanilla como agente reductor obtuvo una mayor capacidad bactericida respecto a la menta debido a esta concentración mayor de polifenoles en su biomasa.
- Por otra parte, cabe resaltar el hecho de que los tratamientos de nanopartículas tanto de plata como de titanio tuvieron una mejor capacidad bactericida en la bacteria Gram positiva *S. aureus*, este hecho se debe a las características fisiológicas que diferencian a los tipos bacterianos ya que las bacterias Gram positivas cuentan con una pared celular compuesta por una capa de peptidoglucano exterior y una membrana plasmática, comparada con la pared celular de las Gram negativas que cuentan con una membrana lipídica exterior que cuenta con mecanismos de filtración conocidos como lipopolisacáridos (LPS), así como también una capa de peptidoglucanos y una membrana plasmática, estos mecanismos le brindan a las bacterias Gram negativas mayor resistencia sobre las Gram positivas lo que explicaría una menor capacidad bactericida en bacterias Gram negativas.

- Aunque es importante denotar que la reducción en la fitosíntesis depende de factores tan complejos como las fitomoléculas de un sistema biológico, y que a su vez le brinda la desventaja que tener tamaños de partícula no homogéneos, también podemos resaltar las ventajas y el hecho que al ser un método ambientalmente amigable, convierten a la fitosíntesis una opción para la síntesis de nanopartículas metálicas.

Referencias

Abdelkhalek, A., & Al-Askar, A. A. (2020). Green synthesized ZnO nanoparticles mediated by *Mentha spicata* extract induce plant systemic resistance against Tobacco mosaic virus. *Applied Sciences*, 10(15), 5054, doi.org/10.3390/app10155054 .

Agrawal A, Jai SD. A Review on Silver Nanoparticles from *Lycurgus Cup* as Drug Delivery System. *Int J Adv Res Med Chem* 2022; 4(1): 1-6.

Alba, J., Ortega, J. L., Álvarez, G., Cervantes, M., Ruiz, E., Urtiz, N., & Martínez, A. (2013). Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica. *Química Viva*, 12(3), 215-233. E-ISSN: 1666-7948

Al-Snafi, A. E. (2016). Medical importance of *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*)-a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 6(2), 89-95. E-ISSN: 2248 – 9185

Amanulla, A. M., & Sundaram, R. J. M. T. P. (2019). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using orange peel extract for antibacterial, cytotoxicity and humidity sensor applications. *Materials Today: Proceedings*, 8, 323-331. DOI:10.1016/J.MATPR.2019.02.118

Avella, D. M. G., García, C. A. O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Memorias del simposio de metrología. universidad autónoma de querétaro. centro nacional de querétaro*.

Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Jeevanandam, J., Hussien, E. A., Mekkawy, S. A., Mostafa, M., ... & Bechelany, M. (2022). Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. *Nanomaterials*, 12(2), 177. DOI: 10.3390/nano12020177

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. DOI: 10.3390/molecules25010112

Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In *Natural polymer drug delivery systems*. Springer, Cham, 33-93. DOI: 10.1007/978-3-319-41129-3_2

Calle, L. C., & Londoño, M. E. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *Revista Soluciones de Postgrado*, 6(12), 129-140. DOI: <http://dx.doi.org/10.14508/sdp.2014.6.12.129-140>

Canizal, G., Schabes-Retchkiman, P.S., Pal, U., Liu, H.B. & Ascencio, J.A. (2006) Controlled synthesis of ZnO nanoparticles by bioreduction. *Materials Chemistry and Physics*, 97, 321–329, DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.08.015.

Chen M., F. X. (2007). Silver Nanoparticles Capped by Oleylamine: Formation, Growth and Self-Organization. *American Chemical Society*, 5296-5304. DOI:10.1021/la700553d

Dicastillo, C. L., Correa, M. G., Martínez, F. B., Streitt, C., & Galotto, M. J. (2020). Antimicrobial effect of titanium dioxide nanoparticles. In *Antimicrobial Resistance-A One Health Perspective*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.90891

Dobrucka R. Synthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles Using *Echinacea purpurea* Herba. *Iran J Pharm Res*. 2017 Spring;16(2):756-762. PMID: 28979329; PMCID: PMC5603885.

Erjaee, H., Rajaian, H., & Nazifi, S. (2017). Synthesis and characterization of novel silver nanoparticles using *Chamaemelum nobile* extract for antibacterial application. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(2), 2504. DOI:10.1088/2043-6254/aa690b

Ettadili, F. E., Aghris, S., Laghrib, F., Farahi, A., Saqrane, S., Bakasse, M., ... & El Mhammedi, M. A. (2022). Recent advances in the nanoparticles synthesis using plant extract: Applications and future recommendations. *Journal of Molecular Structure*, 1248, 131538. DOI: 0.1016/j.molstruc.2021.131538

Fahmy, S. A., Preis, E., Bakowsky, U., & Azzazy, H. M. E. S. (2020). Platinum nanoparticles: Green synthesis and biomedical applications. *Molecules*, 25(21), 4981. DOI:10.3390/molecules25214981

Fauconnier, M. L., Jaziri, M., Homes, J., Shimomura, K., & Marlier, M. (1996). *Anthem. nobilis* L.(Roman Chamomile): in vitro culture, micropropagation, and the production of essential oils. In *Medicinal and aromatic plants IX* (pp. 16-37). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-08618-6_2

Fuentes, J. D. P. C., Gordo, D. M., Reyes, S. P. P., & González, O. E. C. (2016). Efecto del estado de maduración sobre el contenido de polifenoles totales en frutos de *Solanum marginatum*. *I3+*, 3(2), 86-97.

Gabriela, Á. M., Gabriela, M. D. O. V., Luis, A. M., Reinaldo, P. R., Michael, H. M., Rodolfo, G. P., & Roberto, V. B. J. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using mint leaf extract (*Mentha piperita*) and their antibacterial activity. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 9(11), 914-923. DOI: 10.1166/ase.2017.2076

Ghaedi, M., Naghiha, R., Jannesar, R., & Mirtamizdoust, B. (2015). Antibacterial and antifungal activity of flower extracts of *Urtica dioica*, *Chamaemelum nobile* and *Salvia officinalis*: Effects of Zn [OH] 2 nanoparticles and Hp-2-minh on their property. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 32, 353-359. DOI: 10.1016/j.jiec.2015.09.007

Gingasu, D., Mindru, I., Culita, D. C., Marinescu, G., Somacescu, S., Ianculescu, A., & Vasile, B. S. (2021). *Mentha piperita*-mediated synthesis of cobalt aluminate nanoparticles and their photocatalytic activity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 32(8), 11220-11231. DOI: 10.1007/s10854-021-05791-z

González, A. L., Noguez, C., Beránek, J., & Barnard, A. S. (2014). Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(17), 9128-9136. DOI:10.1021/jp5018168.

Govindarajan, M. (2016). Green synthesized silver nanoparticles: a potential new insecticide for mosquito control. In *Nanoparticles in the Fight Against Parasites* (pp. 99-153). Springer, Cham. DOI 10.1007/978-3-319-25292-6

Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*, 2277, 2502. ISSN 2277-2502

Hedges, A. J. (2002). Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International journal of food microbiology*, 76(3), 207-214. DOI:10.1016/S0168-1605(02)00022-3.

Hernández Calvo, P., Calvo Sánchez, N., & Muñoz Bellido, J. L. (2022). General Characteristics of Bacteria. In *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 481–491). Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-12-818731-9.00219-6

Huang, X., El-Sayed, M.A., 2010. Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* 1, 13–28. DOI:10.1016/j.jare.2010.02.002.

Ibrahim, M. M., Hazani, A. A., Al-Homidan, A., Shehata, A., El-Gaaly, G. A., Al-Jafari, A., & Moubayed, N. (2014). Synthesis of eco-friendly silver nanoparticles using plant extracts and assessment of their antimicrobial activity. *PLENARY LECTURES*, 124.

Iqbal, P., Preece, J. A., & Mendes, P. M. (2012). Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials*. DOI:10.1002/9780470661345.smc195

Işcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(14), 3943-3946. DOI: 10.1021/jf011476k

Julkunen-Tiito, Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 33 No.2, 1985, 213-217.

Jyoti, K., Baunthiyal, M., & Singh, A. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3), 217-227.

K. Jha and K. Prasad. (2010). Biosynthesis of metal and oxide nanoparticles using *Lactobacilli* from yoghurt and probiotic spore tablets. *Biotechnology Journal*, 5(3), 285–291. DOI: 10.1002/biot.200900221

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140. DOI: 10.1038/nrmicro818

Kashale, A. A., Gattu, K. P., Ghule, K., Ingole, V. H., Dhanayat, S., Sharma, R., & Ghule, A. V. (2016). Biomediated green synthesis of TiO_2 nanoparticles for lithium ion battery application. *Composites Part B: Engineering*, 99, 297-304. DOI:10.1016/j.compositesb.2016.06.015

Kharissova, O.V., Dias, H. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., and Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 2013, vol. 31, no 4, p. 240-248. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.01.003

Klekotko, M., Matczyszyn, K., Siednienko, J., Olesiak-Banska, J., Pawlik, K., & Samoc, M. (2015). Bio-mediated synthesis, characterization and cytotoxicity of gold nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(43), 29014-29019. DOI:10.1039/C5CP01619C

Kulkarni, N., & Muddapur, U. (2014). Biosynthesis of metal nanoparticles: a review. *Journal of Nanotechnology*, 2014. DOI: 10.1155/2014/510246

Kumar, V., & Yadav, S. K. (2009). Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology &*

Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 84(2), 151-157. DOI: 10.1002/jctb.2023

Ledezma, A., Romero, J., Hernández, M., Moggio, I., Arias, E., Padrón, G., ... & Torres, S. (2014). Síntesis biomimética de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) y su electrohilado polimérico. *Superficies y vacío*, 27(4), 133-140. ISSN 1665-3521

Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.

Mansoori, G. A., & Soelaiman, T. F. (2005). Nanotechnology—an introduction for the standards community. *Journal of ASTM International*, 2(6), 1-22. DOI: 10.1520/JAI13110

Mariychuk, R., Smolková, R., Bartošová, V., Eliašová, A., Grishchenko, L. M., Diyuk, V. E., & Lisnyak, V. V. (2021). The regularities of the *Mentha piperita* L. extract mediated synthesis of gold nanoparticles with a response in the infrared range. *Applied Nanoscience*, 1-13. DOI: 10.1007/s13204-021-01740-8

Martinez-Gutierrez, F., Olive, P. L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanchez, E. M., ... & Av-Gay, Y. (2010). Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), 681-688. doi:10.1016/j.nano.2010.02.001.

Mehlhorn, H. (2016). Nanoparticles–Definitions. In *Nanoparticles in the fight against parasites* (pp. 1-14). Springer, Cham. DOI 10.1007/978-3-319-25292-6

Motarjemi, Y., Moy, G., & Todd, E. (Eds.). (2013). *Encyclopedia of food safety*. Academic Press. ISBN 9780123786135.

Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829. Doi:10.3390/pharmaceutics3040793.

Munive-Olarte, A., Rosano-Ortega, G., Schabes-Retchkiman, P., Martínez-Gallegos, M. S. M., El Kassis, E., González-Pérez, M., & Pacheco-García, F. Assessment of Biomass of Leaves of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as Reducing Agents for the Synthesis of Nanoparticles of Gold and Silver. *International Journal of Advanced Engineering, Management and Science*, 3(4), 239822. DOI:10.24001/ijaems.3.4.14

Narayanan, M., Vigneshwari, P., Natarajan, D., Kandasamy, S., Alsehli, M., Elfasakhany, A., & Pugazhendhi, A. (2021). Synthesis and characterization of TiO₂ NPs by aqueous leaf extract of *Coleus aromaticus* and assess their antibacterial, larvicidal, and anticancer potential. *Environmental Research*, 111335. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111335

Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Plant-mediated green synthesis of nanostructures: mechanisms, characterization, and applications. In *Interface science and technology x*, 33-93. DOI: 10.1016/B978-0-12-813586-0.00006-7

Ngoepe, N. M., Mathipa, M. M., & Hintsho-Mbita, N. C. (2020). Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles for the photodegradation of dyes and removal of bacteria. *Optik*, 224, 165728. DOI:10.1016/j.ijleo.2020.165728

Oh, H., Kim, M., Park, Y., Ryu, S., & Song, H. (2021). Abnormal hypsochromic shifts of surface plasmon scattering by atomic ordering in gold–copper intermetallic nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 125(36), 19936-19946. DOI:10.1021/acs.jpcc.1c06555.

Pal S., Kyung Y. & MyongJ. (2007)"Does de antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle?, a study of the gram

negative bacterium *Escherichia coli*”, *Applied Microbiology*, Vo. 73, No. 6, pp. 1712-1720.

Pradell, T., Climent-Font, A., Molera, J., Zucchiatti, A., Ynsa, M. D., Roura, P., & Crespo, D. (2007). Metallic and nonmetallic shine in luster: An elastic ion backscattering study. *Journal of Applied Physics*, 101(10), 103. DOI:10.1063/1.2734944

Rack, H. J., & Qazi, J. I. (2006). Titanium alloys for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 26(8), 1269-1277. DOI: 10.1016/j.msec.2005.08.032

Rafique, M., Jahangir, J., Amin, B. A. Z., Bilal Tahir, M., Nabi, G., Isa Khan, M. & Sadaf, I. (2019). Investigation of photocatalytic and seed germination effects of TiO₂ nanoparticles synthesized by *Melia azedarach* L. leaf extract. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 29(6), 2133-2144. DOI: 10.1007/s10904-019-01173-5

Ramasamy, K., Dhavamani, S., Natesan, G., Sengodan, K., Sengottayan, S. N., Tiwari, M. & Perumal, V. (2021). A potential role of green engineered TiO₂ nanocatalyst towards enhanced photocatalytic and biomedical applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(30), 41207-41223. DOI: 10.1007/s11356-021-13530-4

Rao, D. S., Muraleedharan, K., & Humphreys, C. J. (2010). TEM specimen preparation techniques. *Microscopy: science, technology, applications and education*, 2, 1232.

Rauwel, P., Küünal, S., Ferdov, S., & Rauwel, E. (2015). A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015. DOI: 10.1155/2015/682749

Reddy, N. V., Li, H., Hou, T., Bethu, M. S., Ren, Z., & Zhang, Z. (2021). Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Perilla frutescens* leaf extract:

characterization and evaluation of antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 15. DOI: 10.2147/IJN.S265003

Reinosa, J. J., Romero, J. J., Miguel, A., del Campo, A., & Fernández, J. F. (2013). Inorganic hydrophobic coatings: surfaces mimicking the nature. *Ceramics International*, 39(3), 2489-2495. DOI: 10.1016/j.ceramint.2012.09.007

Rock, C., & Rivera, B. (2014). *La Calidad del Agua, E. coli y su Salud*. College of Agriculture and life Sciences, 1.

Ronquillo de Jesús, E., Aguilar Méndez, M. A., Guzmán Mendoza, J., & San Martín Martínez, E. (2013). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando extractos de plantas*. [Tesis de doctorado, Instituto Politecnico Nacional]. <http://hdl.handle.net/123456789/1156>

Sadeghi, B., & Gholamhoseinpoor, F. (2015). A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 310-315. DOI: 10.1016/j.saa.2014.06.046

Schabes-Retchkiman, P. S., Canizal, G., Herrera-Becerra, R., Zorrilla, C., Liu, H. B., & Ascencio, J. A. (2006). Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Optical materials*, 29(1), 95-99. DOI: 10.1016/j.optmat.2006.03.014

Schröfel, A., Kratošová, G., Šafařík, I., Šafaříková, M., Raška, I., & Šor, L. M. (2014). Applications of biosynthesized metallic nanoparticles—a review. *Acta biomaterialia*, 10(10), 4023-4042. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.05.022

Sethy, N. K., Arif, Z., Mishra, P. K., & Kumar, P. (2020). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles from *Syzygium cumini* extract for photo-catalytic removal of lead (Pb) in explosive industrial wastewater. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 171-181. DOI:10.1515/gps-2020-0018

Sharma, N., Kumar, J., Thakur, S., Sharma, S., & Shrivastava, V. (2013). Antibacterial study of silver doped zinc oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Drug Invention Today*, 5(1), 50-54. DOI: 10.1016/j.dit.2013.03.007

Sierra, A. J. (2015). Los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales para superar situaciones de estrés abiótico. *Terralia*, (102), 44-52. ISSN 1138-6223.

Silva, A. (2016). Biosíntesis de nanopartículas de plata y pruebas de actividad microbica, [Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Toluca].

Silva, A., Martínez-Gallegos, S., Rosano-Ortega, G., Schabes-Retchkiman, P., Vega-Lebrún, C., & Albiter, V. (2017). Nanotoxicity for *E. Coli* and characterization of silver quantum dots produced by biosynthesis with *Eichhornia crassipes*. *Journal of Nanostructures*, 7(1), 1-12. DOI:10.22052/JNS.2017.01.001

Sim, W., Barnard R., Blaskovich M., & Ziora Z. (2018). Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007-2017). *Antibiotics*, 7(4), 93. DOI: 10.3390/antibiotics7040093

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.

Sivaranjani, V., & Philominathan, P. J. W. M. (2016). Synthesize of Titanium dioxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves and evaluation of wound healing activity. *Wound Medicine*, 12, 1-5. DOI:10.1016/j.wndm.2015.11.002

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (16), 15-29. ISSN: 1390-1869.

Velázquez-Hernández, M., Schabes-Retchkiman, P., Illescas, J., Macedo, M. G., González-Juárez, J. C., & Martínez-Gallegos, S. (2019). Ag, Zn and Cu nanoparticles synthesized from *Eichhornia crassipes* leaf extracts and their application in phenol photocatalytic degradation. *MRS Advances*, 4(59-60), 3251-3258. DOI:10.1557/adv.2019.411

Wang, Z., Hu, T., Liang, R., & Wei, M. (2020). Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. *Frontiers in chemistry*, 8, 320. DOI10.3389/fchem.2020.00320

Willems, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58, 267-297. DOI:10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607

Zhang M, Zhang K, De Gusseme B, Verstraete W. (2012). Biogenic silver nanoparticles 1636 (bio-Ag0) decrease biofouling of bio-Ag0/PES nanocomposite membranes. *Water Res*, 46, 2077–87. DOI: 10.1016/j.watres.2012.01.015

Zhang, J. Z. (2009). Optical properties and spectroscopy of nanomaterials. World Scientific. ISBN-13 978-981-283-664-9.

Zhang, J. Z. (2009). Optical properties and spectroscopy of nanomaterials. Editorial: World Scientific, Primera edicion.