

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I

Biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de la flor

***Jacaranda mimosifolia* con potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm**

**en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado
de Jalisco (CIATEJ) en Guadalajara**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ingeniería en biotecnología, Karen Verduzco Chavira

Profesor PAP: Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona, Dr. Eduardo Padilla Camberos,

Dra. Blanca Alma Valdivia Urdiales, Dra. Gabriela Porras Quevedo

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2022

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP.....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1.Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto.....	5
1.2 Caracterización de la organización	7
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	7
1.4. Planeación de alternativa(s)	10
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora.....	13
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos.....	48
1.7. Bibliografía y otros recursos	49
1.8. Anexos generales	53
2. Productos.....	56
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia	57
3.1 Sensibilización ante las realidades	57
3.2 Aprendizajes logrados	58

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El PAP *Biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de la flor de Jacaranda mimosifolia con potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm* aborda la problemática de la formación de biofilm en los procesos alimentarios. Su objetivo es obtener nanopartículas de plata con potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm usando extracto de la flor de *J. mimosifolia*. Los objetivos específicos son realizar y optimizar la biosíntesis de nanopartículas, caracterizar y evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de las nanopartículas obtenidas.

Se encontró que las condiciones óptimas para la biosíntesis son pH del extracto herbal de 12, nitrato de plata 10mM y temperatura de reacción de 90°C. Se caracterizaron las nanopartículas obtenidas por espectrofotometría, FTIR, DLS y TEM y se encontró que las nanopartículas son esféricas y tienen un tamaño de ~24.2nm. Se evaluó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas en *S. enterica*, *E. coli*, *P. areuginosa* y *S. aureus* mediante la mínima concentración inhibitoria (entre 1.3 y 2.7µg/mL) y la mínima concentración bactericida (entre 5.3 y 10.7µg/mL). Finalmente, se evaluó la actividad antibiofilm de las nanopartículas usando el método de cristal violeta y se encontró que para *S. aureus* y *P. areuginosa*, las nanopartículas inhiben >95% la formación de biofilm a una concentración de 5.4µg/mL. El proyecto generó un reporte extenso con información detallada sobre la metodología seguida y los resultados obtenidos, que servirá para la continuación de este proyecto y un artículo para publicación en el que se presentarán los resultados más relevantes del proyecto, así como los de otras investigaciones relacionadas.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP se desarrolla en el área de Biotecnología Médica y Farmacéutica del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.) bajo la tutela de la Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona y el Dr. Eduardo Padilla Camberos, quienes son investigadores en dicho centro de investigación. El trabajo es de tipo experimental y se llevará a cabo en los laboratorios del propio CIATEJ.

El objetivo general de este PAP es obtener nanopartículas de plata con potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm usando extracto de la flor de *Jacaranda mimosifolia*. Los objetivos específicos son:

- Realizar y optimizar la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) usando extracto de la flor de *Jacaranda mimosifolia*.
- Caracterizar las nanopartículas obtenidas usando espectrofotometría, dispersión de la luz (FTIR y DLS) y Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas.
- Evaluar la actividad antibiofilm de las nanopartículas obtenidas.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Las nanopartículas (NPs) son partículas cuyo tamaño oscila entre 1 y 100nm, son imperceptibles para el ojo humano y solo están constituidas por un par de cientos de átomos. Las NPs pueden exhibir propiedades muy diferentes a los materiales macroscópicos [1].

Existen tres principales propiedades de las NPs: son muy móviles en su estado libre, tienen áreas superficiales específicas muy grandes y pueden exhibir efectos cuánticos; dichas propiedades han despertado gran interés en la comunidad científica. Las NPs se pueden clasificar de acuerdo con su tamaño, forma, propiedades materiales, manera en la que fueron producidas o su aplicación [1]

Las NPs existen en la naturaleza, pero también se pueden fabricar por métodos físicos, químicos o biológicos. A pesar de que la mayoría de las NPs comercialmente disponibles están sintetizadas por métodos químicos, los métodos biológicos son los que mayor atención reciben en la actualidad ya que atienden a la necesidad emergente de desarrollar procesos

más sustentables, que se apeguen a los principios de la química verde, disminuyendo los requerimientos energéticos y el uso de sustancias tóxicas tanto para el ser humano como para el medio ambiente [2].

La tecnología basada en NPs se centra en mejorar la eficacia, sustentabilidad, velocidad y especificidad de procesos ya existentes, esto es posible ya que este tipo de tecnología usa una menor cantidad de material que los procesos tradicionales. Algunas aplicaciones de las NPs incluyen baterías, polímeros, empaques para alimentos, suministro de fármacos, agentes antimicrobianos y anticancerígenos [1].

Algunas dificultades que se pueden presentar al trabajar con NPs son que al impregnar otros materiales estas pueden perder sus propiedades, tienden a aglomerarse y es difícil resuspenderlas, lo cual también provoca que pierdan sus propiedades. Otro reto es la caracterización de las NPs obtenidas, ya que para analizarlas directamente es necesaria microscopía electrónica, lo cual es complicado y costoso; sin embargo, existen métodos indirectos que obtienen información analizando matemáticamente la luz dispersada por las NPs [1].

Las nanopartículas metálicas (MNPs) tienen un núcleo compuesto por algún metal inorgánico u óxido metálico, son de particular interés por sus potenciales aplicaciones en la vida cotidiana. Cada vez se desarrollan más métodos para su producción a gran escala y cada vez más productos incluyen MNPs en sus formulaciones, las AgNPs son las MNPs más estudiadas y usadas [3].

Usando el modelo clásico de cristalización para modelar la síntesis de MNPs, es necesario disolver la sal metálica en un solvente para que esta se disocie y posteriormente agregar algún agente reductor para que los iones metálicos se reduzcan y se dé la nucleación produciendo una suspensión coloidal de MNPs [4]. Los agentes reductores pueden ser químicos o biológicos. Entre estos últimos están los extractos herbales son un excelente agente reductor y estabilizador para AgNPs ya que tienen glucósidos, compuestos fenólicos y flavonoides, entre otros compuestos orgánicos. Una gran cantidad de especies vegetales han sido utilizadas en la biosíntesis, sin embargo, la investigación de nuevos agentes reductores y

métodos de biosíntesis es de suma importancia ya que las propiedades de las NPs están fuertemente influenciadas por su forma, tamaño, sal precursora y moléculas coordinadas [5].

Jacarandamimosifolia es un árbol de hasta 20m de alto que tiene abundantes flores moradas, es originario de Brasil y se cultiva en regiones tropicales como planta de ornato. Las flores de esta planta tienen un alto contenido en compuestos polifenólicos, y de acuerdo con Aguirre-Becerra *et al* [6], estos compuestos pueden fungir como reductores en la biosíntesis de AgNPs.

1.2 Caracterización de la organización

El CIATEJ es un centro de investigación que pertenece a la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación del Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACYT). El centro tiene más de 40 años realizando investigación, desarrollo tecnológico e innovación, además de ofrecer servicios tecnológicos y de formación. El objetivo del centro es impulsar el desarrollo del país en los sectores agropecuario, alimentos, bebidas, salud, medio ambiente y energía sustentable [7].

El centro cuenta con cinco áreas, Biotecnología Médica y Farmacéutica, Biotecnología Vegetal, Tecnología Ambiental, Tecnología Alimentaria y Biotecnología Industrial. El área de Biotecnología Médica y Farmacéutica, donde se realiza el PAP, busca atender las demandas y retos del sector médico y farmacéutico en México [7].

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La industria alimentaria es una de las industrias más grandes del mundo, con mayor generación de empleos y que se dedica a producir, procesar, empacar y distribuir la comida que consume la gran mayoría de la población mundial [8]. Varios microorganismos se pueden desarrollar bajo las condiciones de los procesos alimentarios, ya sea en los productos o en los equipos, llegando a formar biofilm [9].

Los biofilms o biopelículas son ecosistemas microbiológicos complejos formados de una o más especies que residen en una matriz constituida principalmente de polisacáridos, proteínas y DNA exógeno [9]. La formación de estas estructuras les permite adherirse a superficies y proporciona protección y mayor disponibilidad de nutrientes para los microorganismos [10].

Los biofilms representan una problemática para la industria alimentaria ya que pueden alterar las características sensoriales del producto, dañar los equipos y representar riesgos para los consumidores. Los biofilms pueden ser producidos por bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Echerichia coli* O157:H7 [10], [11].

La industria alimentaria busca garantizar la inocuidad de sus procesos y eliminar biofilms, es una tarea retadora, ya que muchos de los agentes antibiofilm pueden ser tóxicos para los consumidores o dañar los equipos [9]. Actualmente se usan diversas técnicas, pero cada una tiene diferente efectividad, ventajas y desventajas, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos antibiofilm usados comúnmente en la industria alimentaria [9].

Tratamiento	Métodos	Ventajas	Desventajas
Sanitización (tratamiento químico)	<ul style="list-style-type: none"> • Cloro: ClO₂ acuoso, NaOCl. • H₂O₂, H₂O₂/ácido acético • O₃ • Amonio cuaternario 	Efectivo, barato	Resistencia
Disrupción enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas: serin proteasas, tripsina, proteinasa K • Glicosidasas: amilasas, dextranasa, pectinasa • Liasas • DNAsa 	Biodegradables, baja toxicidad	Alto costo
Recubrimiento con nanopartículas	Nanopartículas metálicas: plata, oro, óxido de zinc, óxido de cobre, óxido de hierro, óxido de titanio, óxido de magnesio.	Efectivas, no se genera resistencia	Tecnología en desarrollo

	Materiales de carbono: fulerenos, nanotubos		
	Nanocomposites: cisteina, ditiotreitól, b-mercaptoetanol		
Biosurfactantes	Lichensina, surfactina, fengycina, iturina	Afecta al desarrollo de biofilm y a la comunicación entre células	Podría afectar a las características del producto
Bacteriógafos	Listex P100, Salmofresh, ScoShield	Seguros, efectivos.	Difícil manufactura, difícil permeabilidad, no es amplio espectro
Bacteriocinas	Nisin, lactocinas, garvicina	No representa riesgo	Requieren más investigación
Inhibidores de <i>Quorum sensing</i>	Enzimas, ligando competitivos, sRNAs, paraoxonasas	Menos presión selectiva	Require más investigación.
Aceites esenciales	Aceites esenciales provenientes de plantas como eucalipto o canela	El consumidor tiene una buena percepción de estos	Algunos de estos aceites son irritantes para la piel o ciertos órganos
Alta presión hidrostática	HHP, 300-900MPa	No hay ningún riesgo de modificar las propiedades organolépticas o nutricionales del producto	No es efectivo para endoesporas
Plasma no térmico	Gas parcialmente ionizado a baja temperatura	Muy efectivo, no altera las características de los productos	Alto costo, reducido a escala laboratorio
Fotocatálisis	Nanopartículas de óxidos de titanio o zinc junto con luz visible o UV	Efectivo en superficies de acero inoxidable o vidrio	Tecnología en desarrollo

Las nanopartículas de plata (AgNPs) pueden ser una potencial solución a la problemática del biofilm, ya que poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro. Hoy en día, las AgNPs son el nanomaterial más usado para tratar productos médicos, textiles, almacenamiento de alimentos, superficies y productos de higiene personal para que tengan propiedades antimicrobianas [12]. Incluso existen trabajos como el de [17] en el que se reportan AgNPs sintetizadas con extractos herbales con actividad antibiofilm.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Se identificaron distintas problemáticas relacionadas con el control de microorganismos, tales como la formación de biofilm y la desinfección de vegetales y se propuso trabajar con nanopartículas de distintos metales (Cu, Ag, Ti), así como diferentes extractos herbales (pitaya, jacaranda, primavera). Finalmente, se identificó una gran área de oportunidad en el área de biofilm ya que es una problemática vigente que aqueja a varias industrias y se decidió orientarlo al biofilm en la industria alimentaria, ya que es una de las industrias más grandes en México y el mundo. También se optó por trabajar con la flor de jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) porque es una planta fácil de cultivar que produce una gran cantidad de flores. En cuanto al metal para las nanopartículas, se realizaron pruebas preliminares con algunos metales (titanio y cobre) sin el éxito esperado. Por lo tanto, los asesores PAP sugirieron usar la plata (Ag) pues tienen experiencia en la biosíntesis de AgNPs y se dispone de los reactivos y equipo necesarios.

Se realizará la fitosíntesis de AgNPs usando extracto de la flor de *J. mimosifolia* y posteriormente se hará un diseño de experimentos para encontrar las condiciones óptimas de la biosíntesis usando parámetros encontrados en la literatura. Las JAgNPs (nanopartículas de plata sintetizadas usando extracto de *J. mimosifolia*) serán caracterizadas por métodos directos e indirectos. Después, se realizarán pruebas microbiológicas para evaluar la actividad bacteriostática y bactericida de las JAgNPs; finalmente, se realizarán pruebas para evaluar la actividad antibiofilm de las JAgNPs. En la Tabla 2 se muestra el cronograma de

actividades para la realización del PAP y en la Tabla 3 se muestran las abreviaciones utilizadas en dicho cronograma.

Tabla 2. Cronograma de actividades para la realización del PAP.

		CRONOGRAMA															
Nombre de la actividad	Recursos	Duración (días)	Ago			Sep			Oct			Nov			Dic		
			Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
Confirmación de la presencialidad de la estancia	AA	3	■														
Registro en el centro de investigación	DP, AA	4	■														
Selección del proyecto	AA, AP	2		■													
Desarrollo del protocolo para Ti y Cu	AP, AD, TP	4		■													
Pruebas preliminares con Ti	EF, BM	3			■												
Pruebas preliminares con Cu	EF, BM	7				■											
Desarrollo del protocolo para JAgNPs	AD, AP, TP	4					■										
Preparación de material para JAgNPs	B, R	1						■									
Biosíntesis preliminar JAgNPs	EF, BM	2							■								
Optimización biosíntesis JAgNPs	EF, SG, BM	2								■							
Preparación de inóculos para pruebas antimicrobianas	MOS, CFL, I, B, R	2									■						
Preparación de material para pruebas antimicrobianas	AC, CFL, B, R	1										■					
Población inicial	MOS, CFL, I	2											■				
MIC	MOS, CFL, JAgNPs, I	2												■			
MBC	MOS, CFL, JAgNPs, I	2													■		

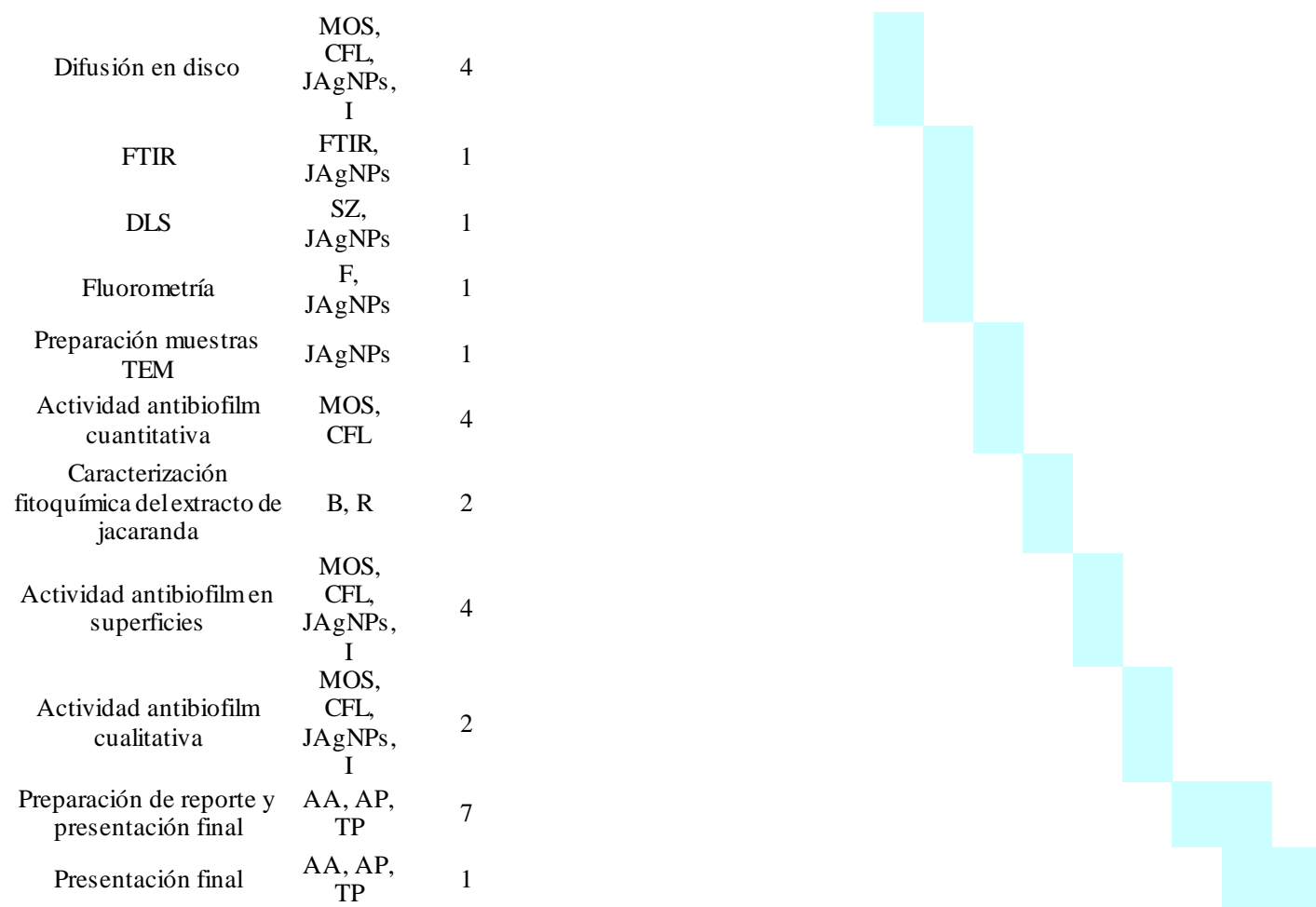


Tabla 3. Abreviaturas mencionadas en el cronograma de actividades.

ABREVIATURAS	
AA	Asesoría Dra. Adriana Vallejo
AP	Asesoría Dr. Eduardo Padilla
DP	Dirección de posgrados
EF	Espectrofotómetro
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier
F	Fluorómetro
ZS	Zeta Sizer
CFL	Campana de flujo laminar
I	Incubadora
AC	Autoclave
MOS	Microorganismos
TP	Trabajo personal
SG	StatGraphics

JAgNPs	Nanopartículas de plata biosíntetizadas con extracto de jacaranda
BM	Baño maría
B	Balanza, analítica
R	Reactivos

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

MÉTODOS

Preparación del extracto herbal

Se pesó 1g de flor de *J. mimosifolia* previamente deshidratada y pulverizada y se agregó a 100mL de agua destilada hirviendo. Se dejó la preparación en ebullición durante 5 minutos y posteriormente se filtró usando un filtro Sartorius stedim 292.

Caracterización fitoquímica del extracto herbal

Se realizaron distintas pruebas cualitativas para determinar la presencia o ausencia de ciertos compuestos en el extracto de *J. mimosifolia*. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

a) Determinación de flavonoides

El contenido de flavonoides por cloruro de aluminio fue determinado de acuerdo con Marinova [15]. Se añadió 1mL de extracto de *J. mimosifolia*, agua destilada o solución estándar de quercetina (6.25 mg/mL) a un matraz aforado de 10mL que contenía 4mL de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 0.3mL de NaNO₂ al 5%. Después de 5 minutos se agregaron 0.3mL de AlCl₃ al 10%, para finalmente un minuto después agregar 2mL de NaOH 1M y aforar a 10mL con agua destilada. Se interpretó como presencia de flavonoides un cambio en la coloración a naranja, usando como referencia quercetina como control positivo y agua destilada como control negativo.

b) Determinación de fenoles

El contenido de fenoles fue determinado por el método del Folin-Ciocalteu de acuerdo con Marinova [15]. Se añadió 1mL de extracto de *J. mimosifolia*, agua destilada o solución estándar de ácido gálico (10mg/mL) a un matraz aforado que contenía 9mL de agua destilada. Posteriormente, se añadió 1mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La solución se mantuvo en agitación constante por 5 minutos para después añadir 10mL al 7% de Na₂CO₃ y aforar a 25mL con agua destilada y mantener en agitación por 90 minutos a temperatura ambiente. Se interpretó como presencia de fenoles un cambio de coloración tomando como referencia ácido gálico como control positivo y agua destilada como control negativo.

c) Determinación de taninos

La determinación de taninos fue llevada a cabo de acuerdo con Ezeonu *et al* [16]. Se añadieron 5mL de extracto de *J. mimosifolia* o agua destilada a un tubo de ensayo con 0.15mL de FeCl₃ al 1% y se mantuvo en agitación por 5 minutos. Los cambios en la coloración fueron comparados con el control negativo (agua destilada), interpretando como presencia de taninos el desarrollo de color café verdoso o azul oscuro.

d) Determinación de fobotaninos

La determinación de fobotaninos fue llevada a cabo de acuerdo con Ezeonu *et al* [16]. Se añadieron 6mL de extracto de *J. mimosifolia* o agua destilada a un tubo de centrifuga de 15mL con 3mL de HCl al 1%. Posteriormente la mezcla fue llevada a ebullición. La presencia de precipitados color rojo fueron interpretados como presencia de fobotaninos, se usó como control negativo agua destilada.

e) Determinación de saponinas

La determinación de saponinas fue llevada a cabo de acuerdo con Ezeonu *et al* [16]. Se añadieron 10mL de extracto de *J. mimosifolia*, detergente o agua destilada a un tubo de centrifuga de 50mL con 5mL de agua destilada. La mezcla fue agitada vigorosamente por 5 minutos. La formación de espuma estable o persistente fue tomada como presencia de

saponinas. Como control positivo se utilizó detergente para trastes y como control negativo agua destilada.

f) Determinación de glucósidos

El contenido de glucósidos fue determinado por el método de Fehling de acuerdo con Ezeonu *et al* [16] con modificaciones. Se añadieron 0.5mL del extracto de *J. mimosifolia*, glucosa o agua destilada a un tubo de centrifuga de 15mL para posteriormente añadir 1mL del reactivo A y reactivo B de Fehling (Anexo I) a la mezcla. Después la solución fue llevada a ebullición por 5 minutos. El desarrollo de una coloración roja se interpretó como presencia de glucósidos mientras que el color azul fue interpretado como negativo. Se usó agua destilada como control negativo y glucosa como control positivo.

g) Determinación de alcaloides

El contenido de alcaloides fue determinado por el método de Dragendorff de acuerdo con Rivas *et al* [18] con modificaciones. Se mezclaron 0.1mL del extracto con 0.9mL del reactivo de Dragendorff (Anexo II) en un tubo Eppendorf y se dejó reposar por 10 minutos. La formación de un precipitado fue interpretada como positivo a la presencia de alcaloides. Como controles se utilizaron berberina 100mg/mL (control positivo) y agua destilada (control negativo).

Biosíntesis de JAgNPs

Se realizó una primera biosíntesis usando el método reportado por Padilla-Camberos *et al* [13]. Se preparó una disolución de AgNO₃ 2mM y se mezcló con el extracto en una proporción 1:20, se colocó en baño maría a 90°C durante 30 minutos y se dejó reposar en la oscuridad toda la noche antes de medir absorbancia.

Posteriormente se trabajó con las condiciones optimizadas pH=12, [AgNO₃]=10mM y T=90°C y, basado lo reportado en la Tabla 4, se usó una proporción extracto/AgNO₃ 1:10. La mitad de estas AgNPs se guardaron así para su posterior uso (AgNPs crudas) y la otra

mitad se centrifugó a 12,108g por 30min, de descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet a una concentración de ~200µg/mL en agua destilada.

Optimización de la biosíntesis de JAgNPs

Se hizo un diseño de experimentos (DOE) Box-Behnken de tres factores: temperatura, pH y concentración de nitrato de plata sobre una variable de respuesta: absorbancia usando el programa StatGraphics. En la Tabla 4 se presentan las condiciones de biosíntesis citadas por diferentes investigadores, mismas que se tomaron como base para definir los parámetros para el DOE que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. Comparación de distintas condiciones usadas para sintetizar biológicamente AgNPs.

Referencia	Temperatura (°C)	pH (extracto)	Concentración sal (mM)	Precursor	Planta utilizada	Proporción extracto-sal
Uddin <i>et al</i> , 2012	80	-	1	AgNO ₃	hojas de té negro	1:2, 1:1, 3:2
Nkkala <i>et al</i> , 2013	TA	-	1	AgNO ₃	raíz de <i>A. calmus</i>	1:5
Nabikhan <i>et al</i> , 2010	Ebullición	-	10	AgNO ₃	callo de <i>Sesuvium portulacastrum</i>	1:10
Mariselvam <i>et al</i> , 2014	36	-	1	AgNO ₃	<i>Cocos nucifera</i>	1:10
Sadeghi <i>et al</i> , 2015	-	-	1	AgNO ₃	<i>Pistacia atlantica</i>	1;10
Padilla-Camberos <i>et al</i> , 2021	90	8	2	AgNO ₃	cásaca de pitaya	1:20
Narayanan & Park, 2014	90	7.5	1	AgNO ₃	<i>Brassica rapa</i>	1:5
Zargar <i>et al</i> , 2011	25	-	1	AgNO ₃	<i>Vitex negundo</i>	1:1
Prasad & Elumalai, 2011	60-80	-	1	AgNO ₃	<i>Moringa olifera</i>	1:10
Monda <i>et al</i> , 2011	40	8.5 y 12.5	5	AgNO ₃	Swietenia mahogani	-
Kathiravan <i>et al</i> , 2014	28	-	1	AgNO ₃	hoja de <i>Melia dubia</i>	1:10, 2:10, 3:10, 4:10

Veerasamy <i>et al</i> , 2011	75	7	1	AgNO ₃	hoja de <i>Garcinia Mangostana</i>	1:5
Vijayaraghavan <i>et al</i> , 2012	28	7	1	AgNO ₃	<i>Trachyspermum ammi</i> , <i>Papaver somniferum</i>	-

Tabla 5. Factores para el DOE.

Factor	Bajo	Alto	Unidades	Continua
Temperatura	60	90	°C	Si
pH	6	12		Si
[AgNO ₃]	1	10	mM	Si

Caracterización de JAgNPs

a) Espectrofotometría

Se realizó un barrido espectral de 300 a 700nm con intervalos de 10nm, usando un espectrofotómetro xMark™ Microplate Spectrophotometer de BIO RAD, de la primera biosíntesis para confirmar la presencia de AgNPs e identificar la longitud de onda de mayor absorbancia. Con las muestras de la optimización se realizó el mismo barrido espectral para confirmar la longitud de onda de mayor absorbancia y para biosíntesis posteriores solo se leyó la absorbancia a 420nm.

b) Cuantificación

Se implementó un método de cuantificación similar al reportado por Aznar *et al* [19]. Se usaron las nanopartículas de plata Silver, dispersion de Sigma-Aldrich (Anexo III), para realizar una curva de calibración y estimar la concentración de las JAgNPs sintetizadas.

c) Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se liofilizaron las muestras y posteriormente se colocó suficiente muestra para cubrir el cristal del accesorio ATR del FTIR Cary 630 Agilent y se realizaron las lecturas con una resolución de 4cm^{-1} y 20 scans, se limpió el cristal usando agua destilada y algodón entre cada lectura. Para esta técnica se revisó el manual del equipo [20].

d) Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Para el análisis de tamaño de partícula y de potencial Z se utilizó el equipo zetasizer Nano-ZS90 de Malvern. En el caso de tamaño de partícula se trabajó con las muestras diluidas 1:10 y celdas de 1mL como la que se puede observar en la Figura 1. Para medir el potencial Z se usaron las muestras sin diluir y se colocó 1mL de muestra en una celda como la que se muestra en la Figura 2. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio usando el software del equipo, entre cada medición se lavaron las celdas 10 veces con agua destilada. Para esta técnica se revisó el manual del equipo [21].



Figura 1. Celda utilizada para medir tamaño de partícula [22].



Figura 2. Celda utilizada para medir potencial Z [22].

e) Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Se mandaron las muestras al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) para ser analizadas en un microscopio Jeol modelo 200CX. Las muestras fueron sonicadas durante 5 minutos y se dejaron sedimentar por 10 minutos antes de introducir las al TEM.

Pruebas antimicrobianas

a) Preparación de suspensiones microbianas y población inicial

Se preparó un inóculo de cada cepa (*Escherichia coli* ATCC 1122, *Salmonella entérica* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa*. ATCC 9027, compradas de American Type Culture Collection) y se incubó a 37°C y 200rpm durante 24h. Posteriormente se preparó una suspensión microbiana ~0.5 McFarland de cada cepa en PBS (buffer fosfato salino por sus siglas en inglés). Finalmente se realizaron 5 diluciones seriadas 1 en 10 de cada suspensión y se sembró por extensión en placa la quinta dilución, se incubó por 24h a 37°C y se contaron las colonias en cada placa para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de suspensión microbiana.

b) Mínima concentración inhibitoria (MIC)

Se utilizó método reportado por Padilla-Camberos *et al* [13]. En placas de poliestireno de 48 pocillos se realizaron diluciones seriadas de AgNPs con caldo nutritivo (CN), 10 para las nanopartículas crudas, 6 para las nanopartículas concentradas partiendo de una concentración de 20µg/mL y 6 de extracto. Además, se prepararon controles para cada cepa y controles de medio para cada placa, cada pocillo tenía un volumen de 500µL de la mezcla de CN y AgNPs

o extracto y 20 μ L de inóculo. Se incubaron las placas por 24h a 37°C y se determinó la MIC como la última concentración en la que no se observó turbidez.

c) Mínima concentración bactericida (MBC)

Para determinar la MBC, se usaron las placas de poliestireno de 48 pocillos resultantes de la prueba anterior, se seleccionaron los últimos dos pocillos en los que no se observó turbidez y el primero en el que sí. Se sumergió un asa de nicromo en cada uno de los pocillos seleccionados y se sembró en cajas Petri que fueron incubadas por 24h a 37°C. La MBC se determinó como la última concentración en la que no hubo crecimiento en la placa. NOTA: negativo=0 colonias, positivo=3 o más colonias, no concluyente=1 a 3 colonias [13].

d) Difusión en disco

Se usaron las mismas cepas que en las pruebas anteriores. Se sembraron, por extensión en placa (usando un hisopo estéril), 5 placas Petri (una para controles y las otras cuatro para los tratamientos reportados en la Tabla 6) por cada cepa tomada directamente de las suspensiones microbianas. Se usó el método reportado por EUCAST [14]. Se dejó evaporar el exceso de humedad de las placas Petri antes de colorar los discos de difusión. Estos se prepararon con papel filtro estéril sumergido, 30 minutos previos a su utilización, en la suspensión correspondiente de la Tabla 6. Después de remover el exceso de líquido de los discos, se colocaron en la placa Petri. Todas las diluciones se prepararon con PBS el cual también se utilizó como control negativo. Como controles positivos se usaron: cefoxitin para *S. entérica* y *E. coli*, oxitetraciclina para *P. areuginosa* y eritromicina para *S. aureus*.

Tabla 6. Tratamientos para los papeles filtro a emplear en la prueba de difusión en disco.

JAgNPs crudas		JAgNPs concentradas	
342 μ g/mL	171 μ g/mL	250 μ g/mL	125 μ g/mL

Pruebas antibiofilm

a) Prueba cualitativa

Se preparó medio de cultivo agar cerebro-corazón y, después de esterilizarlo, se dejó enfriar el medio hasta una $T=55^{\circ}\text{C}$. Se agregó 0.8g/L de colorante rojo Congo a todo el medio de cultivo y las JAgNPs a la mitad del medio. Se vertió el medio en cajas Petri y se dejó gelificar para posteriormente sembrar por estría cruzada directamente de las suspensiones celulares previamente preparadas, se usó como control negativo el agar sin JAgNPs. Se incubó por 24h a 37°C y se observó si había presencia de cristales negros, lo cual indica formación de biofilm, si hay crecimiento de colonias rosas significa que las cepas no forman biofilm y si las colonias son negras, pero no ha cristal, la prueba no es concluyente, se realizó la prueba por duplicado [23].

b) Prueba cuantitativa

En una placa de poliestireno de 48 pocillos, se colocó caldo nutritivo con diferentes concentraciones de AgNPs y detergente enzimático Tergazyme como control positivo (Tabla 7). Se inoculó cada pocillo con 20 μL de inóculo de cada una de las cepas y se incubó por 24h a 37°C , se retiró el cultivo invirtiendo la placa sobre una recipiente con hipoclorito de sodio al 3% y se realizó un lavado con agua destilada, posteriormente se dejó secar la placa a 60°C en una estufa de desecación por 1h. Se añadieron 0.5mL de solución acuosa de cristal violeta al 0.1% a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 90 minutos, se retiró la solución de cristal violeta invirtiendo la placa y se realizaron 5 lavados con agua destilada para remover el exceso de colorante. Se agregaron 0.5mL de metanol concentrado para solubilizar el biofilm, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación orbital. Finalmente, se leyó la absorbancia a 570nm y se determinó la inhibición de biofilm con la ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición de Biofilm} = \left(1 - \left(\frac{AM}{AC} \right) \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde AM es la absorbancia de los pozos con tratamiento y AC es la absorbancia sin tratamiento. Se realizó la prueba por triplicado [24].

Tabla 7. Tratamientos usados para cada cepa en la prueba cuantitativa para actividad antibiofilm.

Esterilidad (caldo nutritivo)	Controles		JAgNPs			
	Negativo (crecimiento libre)	Positivo (Tergazyme 1%)	21.4µg/mL	10.7µg/mL	5.4µg/mL	2.7µg/mL

RESULTADOS

Caracterización fitoquímica del extracto herbal

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la caracterización fitoquímica del extracto acuoso de flor de *J. mimosifolia*; contiene flavonoides, fenoles, taninos, saponinas y glucósidos, no contiene fobotaninos y alcaloides. Aparicio-Fernández *et al* [25] analizaron las antocianinas de *J. mimosifolia*; las antocianinas son pigmentos flavonoides presentes en una gran cantidad de especies vegetales y son las responsables del color morado de la flor. Aguirre-Becerra *et al* [6] realizaron un análisis exhaustivo de extractos acuosos y metanólicos de flor de *J. mimosifolia* para identificar los compuestos presentes y encontraron una gran variedad de flavonoides, glucósidos, taninos, fenólicos, ésteres y lípidos, lo cual confirma la información obtenida las pruebas cualitativas del presente estudio.

Tabla 8. Resultados de la caracterización fitoquímica del extracto acuoso de *J. mimosifolia*. *

Compuesto	Presencia en el extracto acuoso de <i>J. mimosifolia</i>
Flavonoides	+
Fenoles	+
Taninos	+
Fobotaninos	-
Saponinas	+
Glucósidos	+
Alcaloides	-

*presencia del compuesto analizado (+); ausencia del compuesto analizado (-).

Biosíntesis de AgNPs

Los resultados de la primera biosíntesis se muestran en la Figura 3. Se observan la muestra y 2 controles negativos, uno que solo tenía nitrato de plata y agua y el otro que solo tenía extracto de *J. mimosifolia* y agua. Antes y después de la reacción es evidente el cambio de color, además, no se detectaron cambios en los controles lo que coincide con lo reportado por Padilla-Camberos *et al* [13], por lo que se asume que hay presencia de AgNPs.

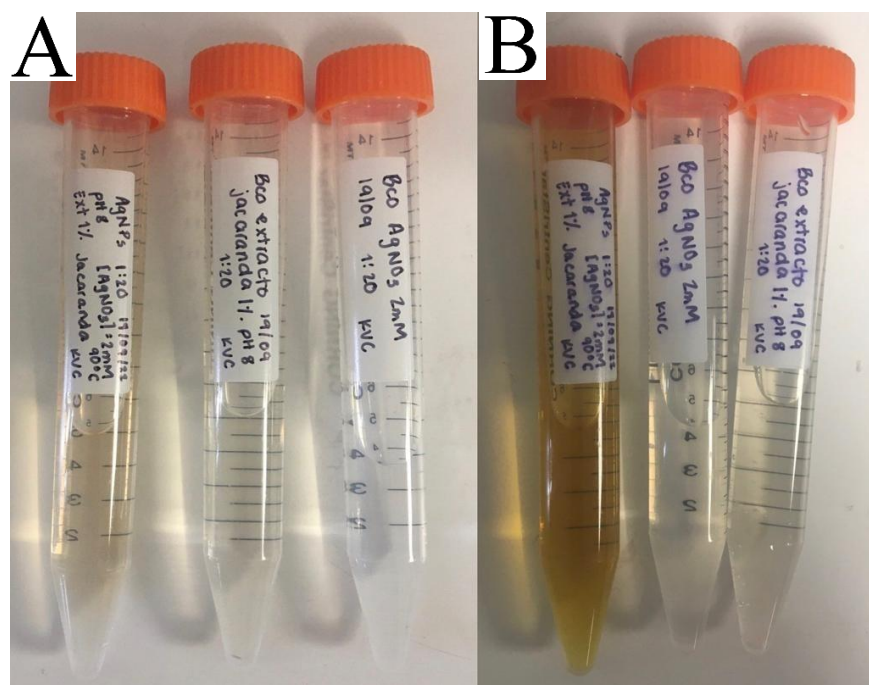


Figura 3. Primera biosíntesis realizada con las condiciones propuestas por Padilla-Camberos *et al.* [13]. (a) Antes de la reacción, tubos de izquierda a derecha: muestra, control con extracto de jacaranda, y control con nitrato de plata. (b) Después de la reacción, tubos de izquierda a derecha: muestra, control con nitrato de plata, y control con extracto de jacaranda.

En la Figura 4 se muestran los valores del barrido espectral realizado a la muestra y controles de la biosíntesis mencionada. El barrido espectral se realizó de 300 a 700nm con intervalos de 10nm. Se observa que la mayor absorbancia para la muestra está en los 420nm, lo cual coincide con el pico de absorbancia de las NPs esféricas [26]. Así mismo, se puede observar que ninguno de los dos controles presenta picos de absorbancia en esta longitud de onda, por lo que se confirma la presencia de AgNPs.

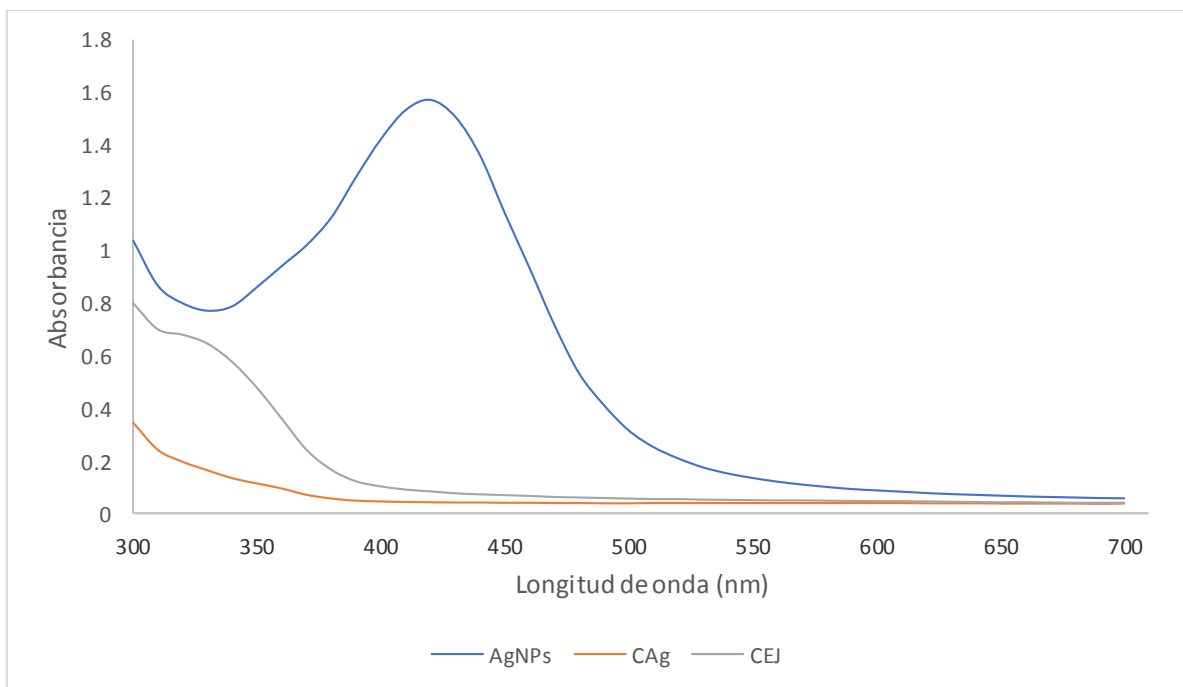


Figura 4. Barrido espectral de la primera biosíntesis realizada con las condiciones reportadas por Padilla-Camberos *et al* [13].

Al realizar los experimentos, se encontró que en las condiciones óptimas de pH y $[AgNO_3]$ la reacción comienza a ocurrir a temperatura ambiente segundos después de añadir el extracto. En la Figura 5 se presentan las muestras antes y después de la biosíntesis de AgNPs usando las condiciones óptimas. Se puede observar que el cambio de color es mucho más intenso, además, el color café amarilloso oscuro resultante es característico de la resonancia del plasmón de superficie de las AgNPs [26].

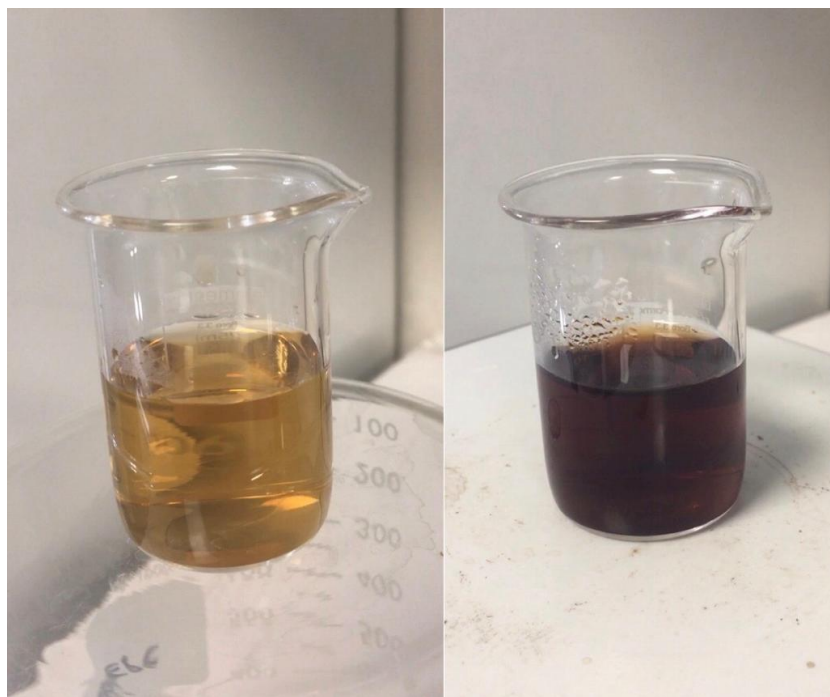


Figura 5. Muestras antes y después de la biosíntesis de AgNPs usando extracto de *J. mimosifolia* con las condiciones óptimas.

También se encontró que cuando se añade el extracto una vez que el nitrato de plata está caliente, la reacción ocurre instantáneamente y se alcanzan absorbancias mayores que al mezclar todo antes de calentar. Se realizó una corrida adicional en la que se probaron ambos escenarios para confirmar esta observación (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación entre agregar el extracto con el nitrato de plata frío y caliente (dilución al 50%).

	Frío	Caliente
Abs @420nm	2.071	2.576

Optimización de la biosíntesis de AgNPs

En la Tabla 10 se pueden observar las combinaciones realizadas experimentalmente, así como las absorbancias obtenidas en cada caso. En la Figura 6 se presentan los valores

resultantes del barrido espectral realizado a todas las muestras. Se observa que la muestra que presentó la mayor absorbancia fue la número 14 (línea de color rojo).

Tabla 10. Diseño de experimentos y absorbancias registradas a 420nm para cada combinación de factores.

# de muestra	pH (del extracto)	AgNO ₃ (mM)	Temperatura (°C)	Absorbancia (a 420nm)
1	6	1	75	0.772
2	9	5.5	75	1.106
3	9	1	60	0.816
4	9	5.5	75	1.127
5	12	5.5	60	2.045
6	9	1	90	1.064
7	9	10	90	1.568
8	9	10	60	1.051
9	9	5.5	75	1.106
10	12	1	75	2.111
11	6	10	75	1.054
12	6	5.5	90	1.288
13	12	10	75	2.863
14	12	5.5	90	3.249
15	6	5.5	60	0.719

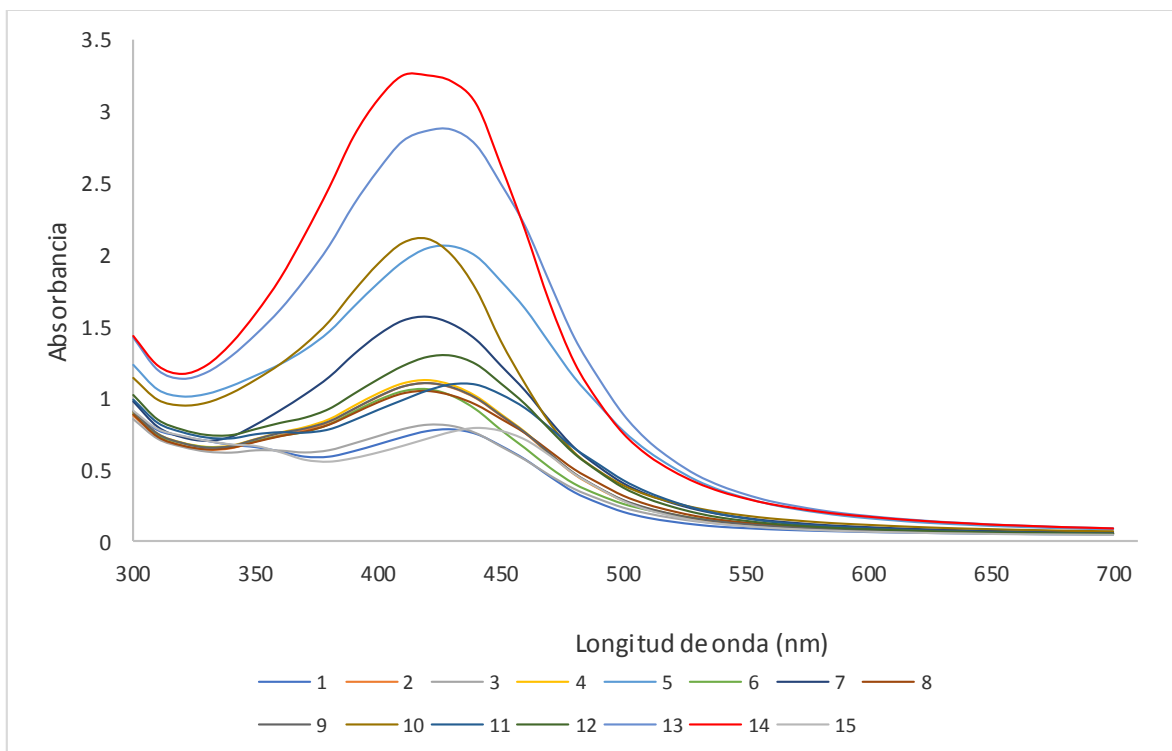


Figura 6. Barrido espectral de las absorbancias resultantes del diseño de experimentos para la optimización de la biosíntesis de las AgNPs con extracto de la flor de *J. mimosifolia*.

Con la información alimentada al StatGaphics, se realizaron distintos análisis estadísticos para determinar el efecto de cada factor y sus combinaciones sobre la variable de respuesta. La Tabla 11 muestra el análisis de varianza, en el cual se observa que todos los factores tienen un efecto sobre la absorbancia, ya que todos tienen un $P\text{-Value} < 0.05$, mientras que las interacciones entre ellos no tienen un efecto significativo sobre la absorbancia ya que $P\text{-Value} > 0.05$.

Tabla 11. ANOVA (análisis de varianza).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	P-Value
A:pH	5.07052	1	5.07052	170.33	0.0000
B:AgNO₃	0.42274	1	0.42274	14.2	0.0130
C:Temperatura	0.805181	1	0.805181	27.05	0.0035
AA	1.49118	1	1.49118	50.09	0.0009
AB	0.071824	1	0.071824	2.41	0.1811
AC	0.100806	1	0.100806	3.39	0.1251
BB	0.0156	1	0.0156	0.52	0.5016
BC	0.0180902	1	0.0180902	0.61	0.4709
CC	0.0217498	1	0.0217498	0.73	0.4317
Total error	0.148845	5	0.0297691		
Total (corr.)	8.18219	14			

Con la información recabada se realizó un diagrama de Pareto (Figura 7). Se encontró que el pH es el factor con mayor efecto sobre la absorbancia y la concentración de nitrato de plata el que tiene menor efecto, pero todos los factores analizados tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

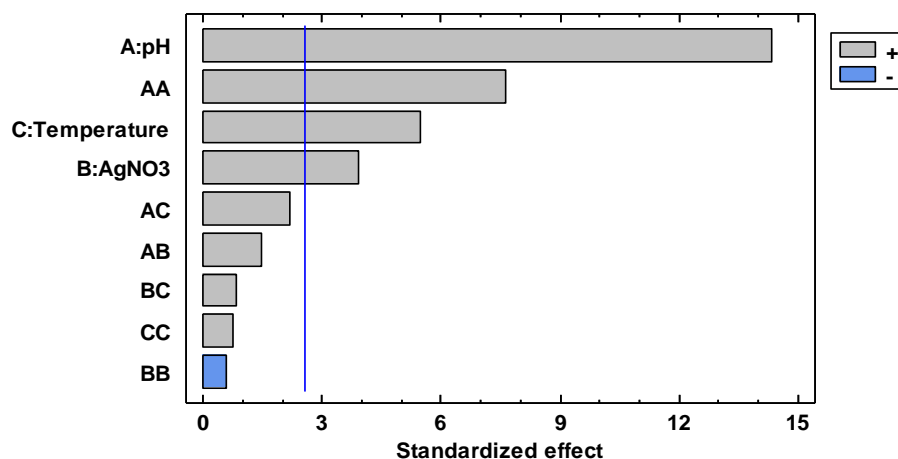


Figura 7. Gráfica de Pareto estandarizada para absorbancia.

Para optimizar la biosíntesis de las AgNPs, se buscó maximizar la absorbancia y en la Tabla 12 se muestran los valores para cada factor que en conjunto resultan en la absorbancia máxima. Estas condiciones son las que se consideraron para biosintetizar todas las AgNPs usadas en todas las pruebas. Para visualizar los datos obtenidos en la optimización, se realizó una superficie de respuesta estimada (Figura 8) para este experimento, aquí se puede observar el comportamiento de la absorbancia en función del pH del extracto y la concentración del nitrato de plata.

Tabla 12. Optimización de la biosíntesis de AgNPs.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	6	12	12
AgNO ₃	1	10	10
Temperatura	60	90	90

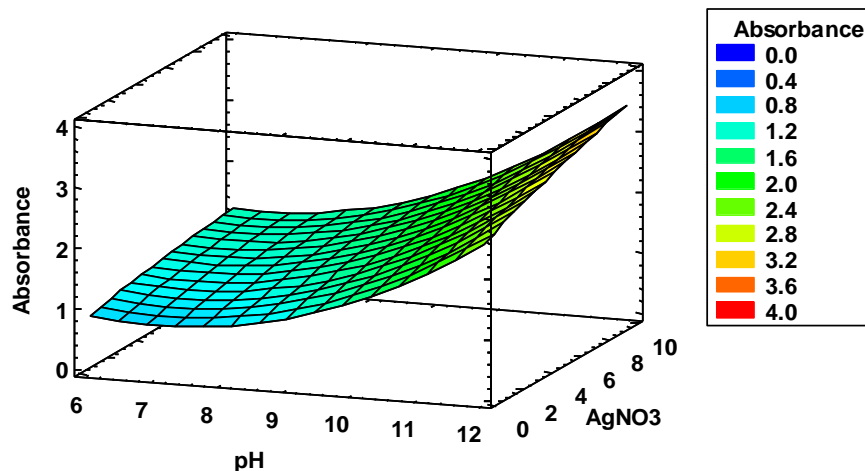


Figura 8. Superficie de respuesta estimada. Temperatura 90°C.

Las condiciones idóneas para la biosíntesis de AgNPs dependerá en gran medida de la composición del extracto utilizado, sin embargo, autores como Nabikhan *et al* [27] reportan condiciones de concentración de nitrato de plata y temperatura similares a las que se encontraron como óptimas en este trabajo.

Caracterización

a) Cuantificación

En la Figura 9 se muestra la curva de calibración realizada con las nanopartículas de plata Silver, dispersión de Sigma-Aldrich. La curva tiene una R^2 de 0.9995 y, usando la ecuación obtenida, se estima que la concentración de las JAgNPs crudas es de $342\mu\text{g/mL}$ y la de las JAgNPs concentradas de $250\mu\text{g/mL}$, la cual es similar a la estimación inicial de $200\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, es evidente que las JAgNPs no se concentraron y se perdió una gran cantidad de material al centrifugar. En la mayoría de las referencias encontradas la centrifugación es el método empleado para separar y concentrar AgNPs, sin embargo, Kowalczyk *et al* [28] explican que la centrifugación tradicional es una de las técnicas de separación más importante, pero cuando se trata de separar partículas extremadamente pequeñas como nanopartículas, puede que estas tarden mucho tiempo en sedimentarse o que incluso no lleguen a sedimentarse.

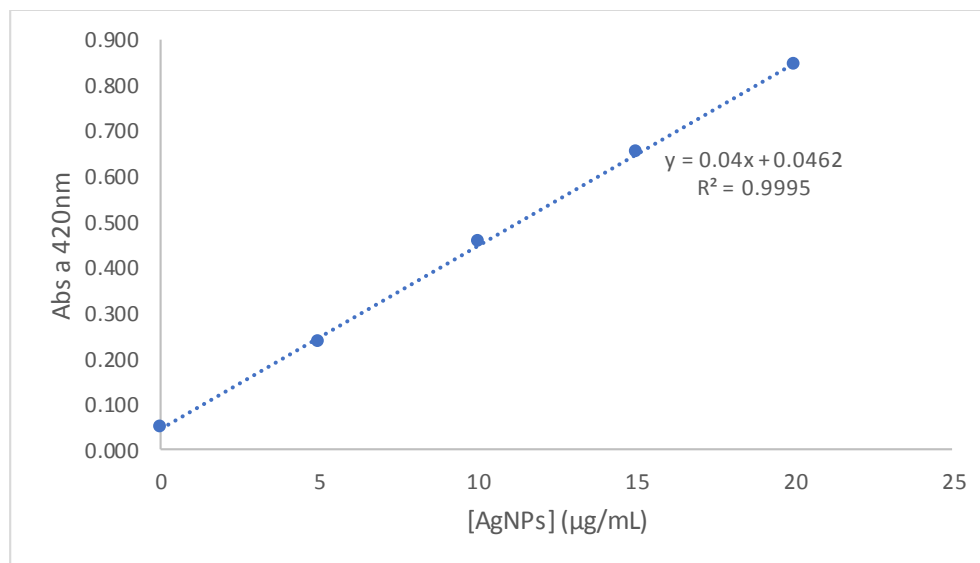


Figura 9. Curva de calibración realizada con Silver, dispersión Sigma-Aldrich.

b) Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 10 se muestra el espectro FTIR de las JAgNPs crudas y el del extracto de flor de jacaranda. El pico que se observa a 3600cm^{-1} corresponde a un estiramiento O-H de fenol, a 2900cm^{-1} corresponde a un estiramiento C-H de aldehído, el pico a 1650cm^{-1} es característico de flavonoides y anillos aromáticos y el pico a 1000cm^{-1} corresponde a algún azúcar [29]. Este último solo se encuentra presente en el extracto por lo que posiblemente fue el compuesto que fungió como agente reductor de la plata. El pico que se encuentra en 1400cm^{-1} en el espectro de las JAgNPs corresponde al nitrato de plata (Anexo IV) [30].

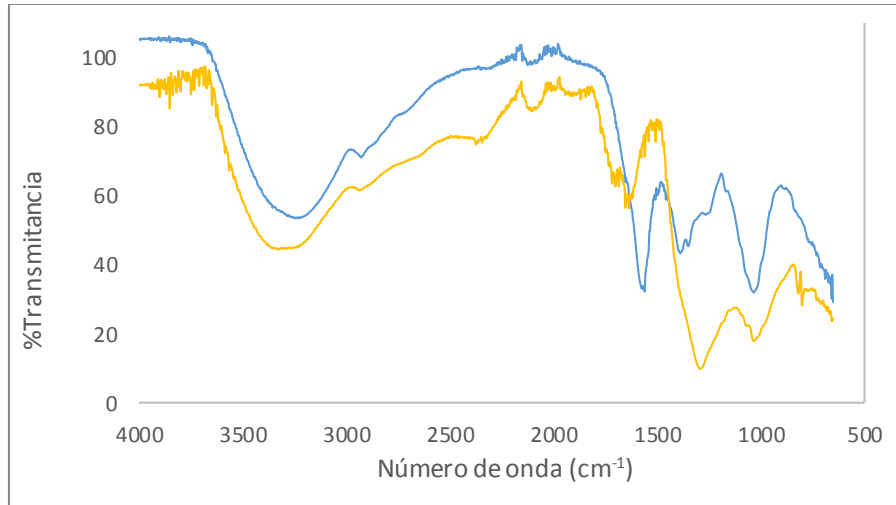


Figura 10. Espectro FTIR extracto de jacaranda (azul) y JAgNPs crudas (amarillo).

En la Figura 11 se muestra espectro FTIR de las JAgNPs crudas y concentradas. Al comparar estos dos espectros se puede observar que muchos de los picos perdieron nitidez, lo cual se puede deber a que en el proceso de separación se eliminaron impurezas, pero también posiblemente porque se perdieron nanopartículas y enlaces orgánicos.

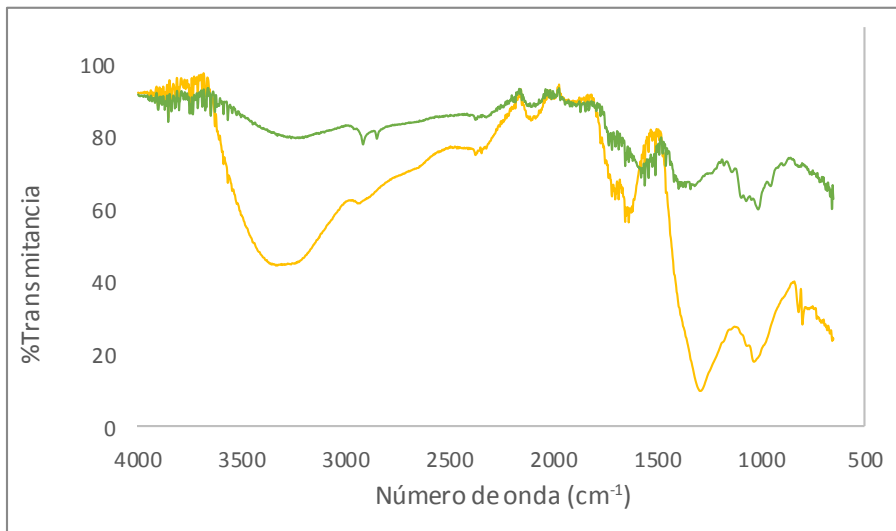


Figura 11. Espectro FTIR extracto de JAgNPs crudas (amarillo) y concentradas (verde).

c) Dispersión dinámica de la luz (DLS)

En la Tabla 13 se presentan los resultados de tamaño de partícula y en las Figuras 12, 13, 14 y 15 las gráficas generadas por el Software de Malvern. El tamaño de las JAgNPs crudas es de ~24.2nm; en el review de Noah [2] se reporta que la mayoría de las AgNPs fitosintetizadas están en un rango de tamaño de 5-100nm. En la Figura 12 es posible observar que existen partículas de otros tamaños en la mezcla y, dado que las JAgNPs no han sido purificadas, estas pueden ser AgNPs aglomeradas, compuestos del extracto herbal que no reaccionaron, plata que no reaccionó o algún contaminante.

En el caso de las JAgNPs concentradas, el tamaño de partícula en la mezcla oscila entre 26.3 y 527.8nm (Figura 15). Si bien las partículas de mayor tamaño presentes en las JAgNPs crudas desaparecieron, también se cree que se perdieron la mayoría de las AgNPs al momento de centrifugar como ya se mencionó en el inciso a) caracterización, de este mismo apartado. También se cree que el tiempo prolongado de centrifugación a una alta velocidad (30 min, 12,108g) pudieron haber dañado las JAgNPs, Rostami [31] menciona que al centrifugar muchas veces o por demasiado tiempo las AgNPs pueden perder calidad.

También se analizaron el extracto de flor de *J. mimosifolia* y el nitrato de plata (Figuras 13 y 14), para verificar que en estos no hubiera nanopartículas. Se encontró que el tamaño de partícula más grande presente en el nitrato de plata podría corresponder al presente en las JAgNPs crudas.

Tabla 13. Tamaño de partícula.

Muestra	Pico	Tamaño (d. nm)	% Intensidad
JAgNPs crudas	1	24.2	62.3%
	2	157.0	32.9%
	3	4766.0	4.8%
JAgNPs concentradas	1	527.8	59.5%
	2	124.3	13.5%
	3	26.3	13.1%
Extracto de Jacaranda	1	430.9	93.7%
	2	5009.0	6.3%
AgNO ₃ 10mM	1	256.9	93.9%
	2	4972.0	6.1%

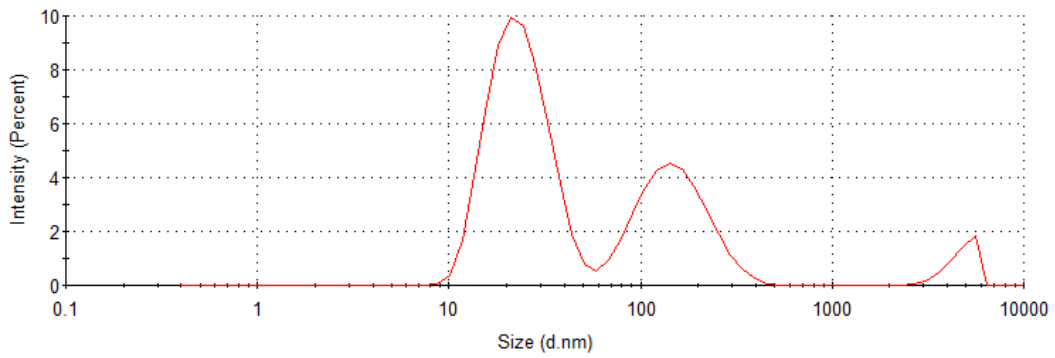


Figura 12. Distribución de tamaño por intensidad JAgNPs crudas diluidas 1:10 con agua destilada.

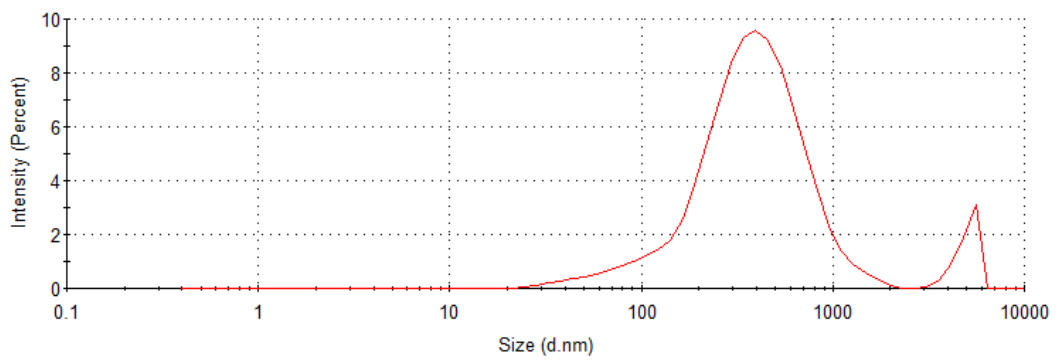


Figura 13. Distribución de tamaño por intensidad del extracto de jacaranda diluido 1:10 con agua destilada.

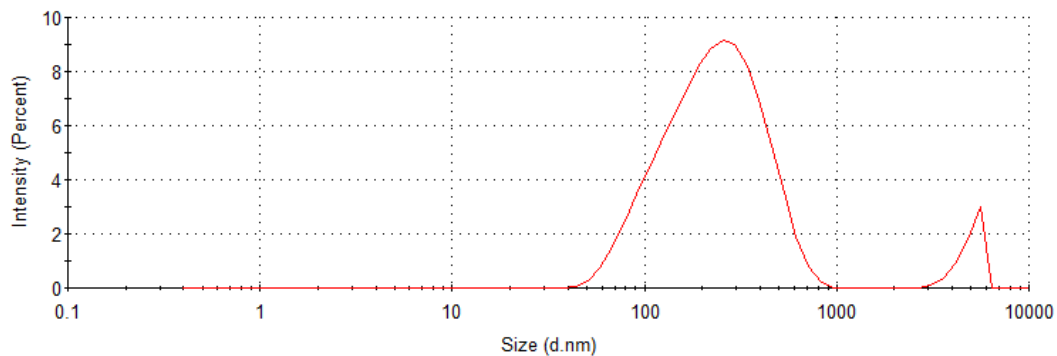


Figura 14. Distribución de tamaño por intensidad del nitrato de plata 10mM.

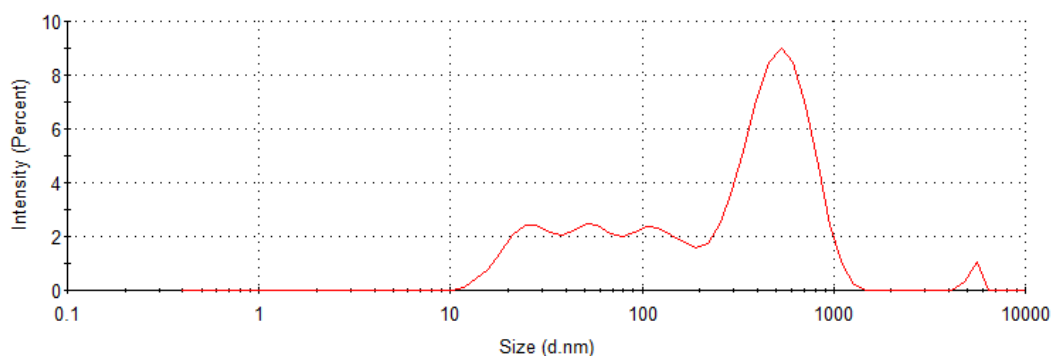


Figura 15. Distribución de tamaño por intensidad JAgNPs concentradas diluidas 1:10 con agua destilada.

En la Tabla 14 se muestran los resultados para el potencial Z y en las Figuras 16, 17, 18 y 19 se muestran las gráficas generadas por el Software Malvern. El potencial Z es una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie de una NP, es un parámetro de gran importancia cuando se estudian NPs ya que da información de la estabilidad de las NPs en una suspensión. Si el potencial Z es < -20 o > 20 mV, la suspensión es considerada estable, mientras que si el potencial > -20 o $Z < 20$ mV, la suspensión es considerada inestable (Vinothini & Rajan) [32].

En todos los casos los potenciales Z medidos indican soluciones estables, a excepción del nitrato de plata, eso es posiblemente porque se trata de una solución y no de una suspensión

coloidal [33]. También se confirmó que las JAgNPs concentradas están aglomeradas ya que Vinothini & Rajan [32] reportan que en cualquier suspensión de NPs con un potencial Z inferior a -28mV las NPs están aglomeradas.

Tabla 14. Resultados de potencial Z.

Muestra	Pico	Potencial Z (mV)	Intensidad
JAgNPs crudas	1	-20.3	100.0%
JAgNPs concentradas	1	-37.3	100.0%
Extracto de Jacaranda	1	-22.4	100.0%
AgNO ₃ 10mM	1	-9.72	99.9%
	2	-54.2	0.1%

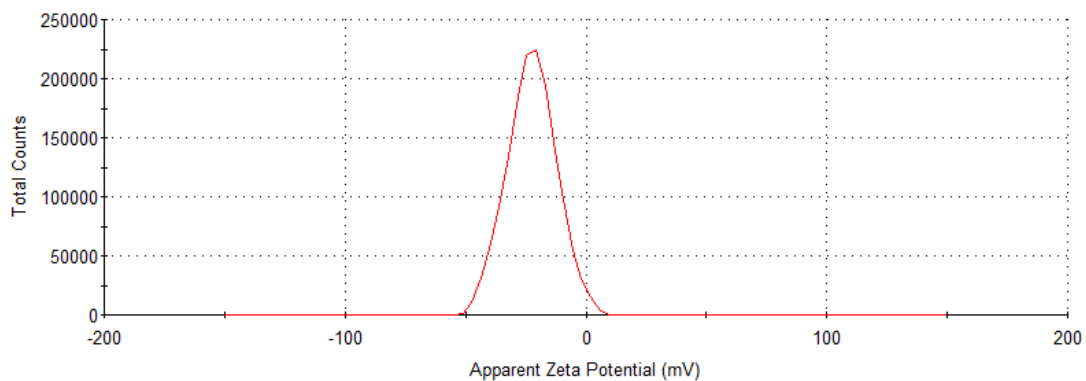


Figura 16. Distribución del potencial Z del extracto de jacaranda.

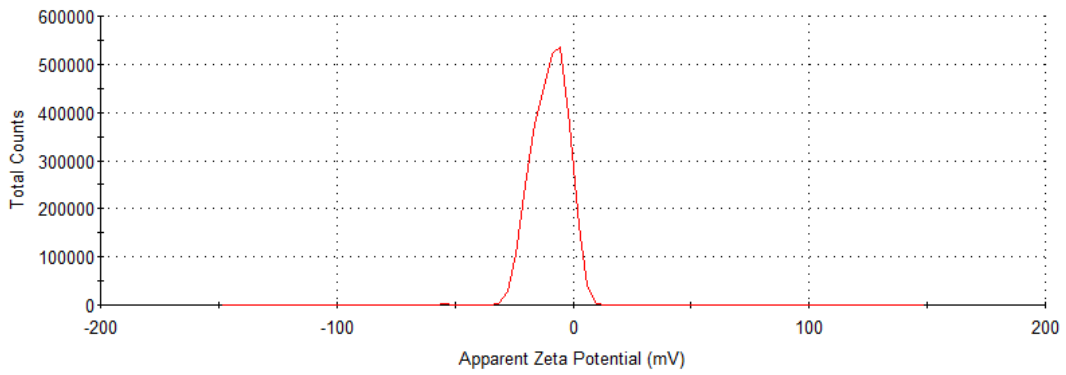


Figura 17. Distribución del potencial Z del nitrato de plata 10mM.

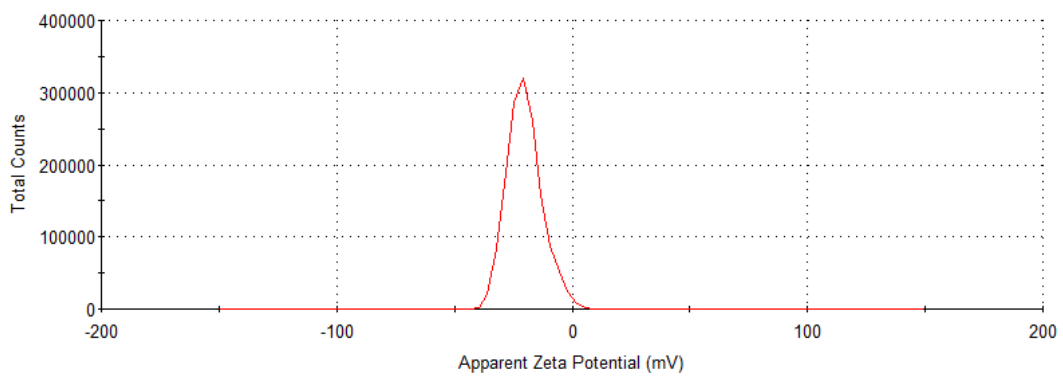


Figura 18. Distribución del potencial Z de las JAgNPs crudas.

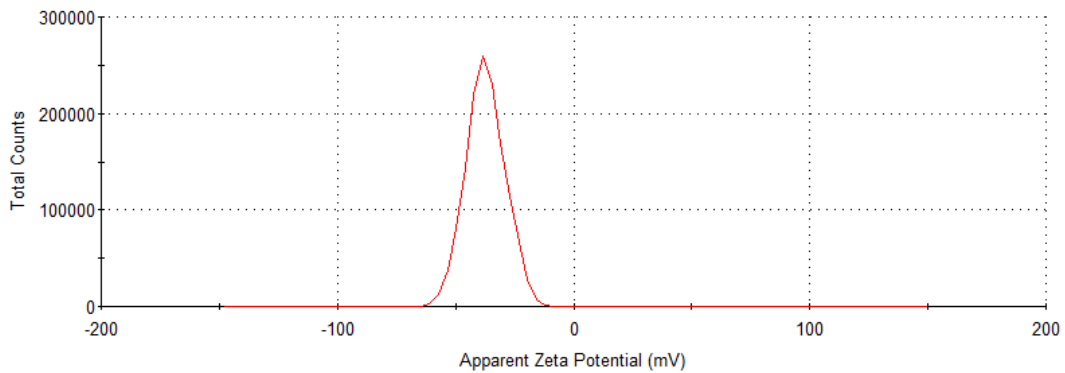


Figura 19. Distribución del potencial Z de las JAgNPs concentradas.

d) TEM

En la Figura 20 se muestran las imágenes obtenidas del TEM. Se puede observar que son de forma esférica uniforme y, de acuerdo con Noah [2], esta es la forma más común en las nanopartículas fitosintetizadas. A pesar de que la mayoría de las JAgNPs parecen ser de aproximadamente el mismo tamaño, es deseable que la muestra sea más monodispersa, por lo que implementar alguna técnica de purificación, como centrifugación por gradientes de densidad o cromatografía, sería deseable (Martins *et al*) [34].

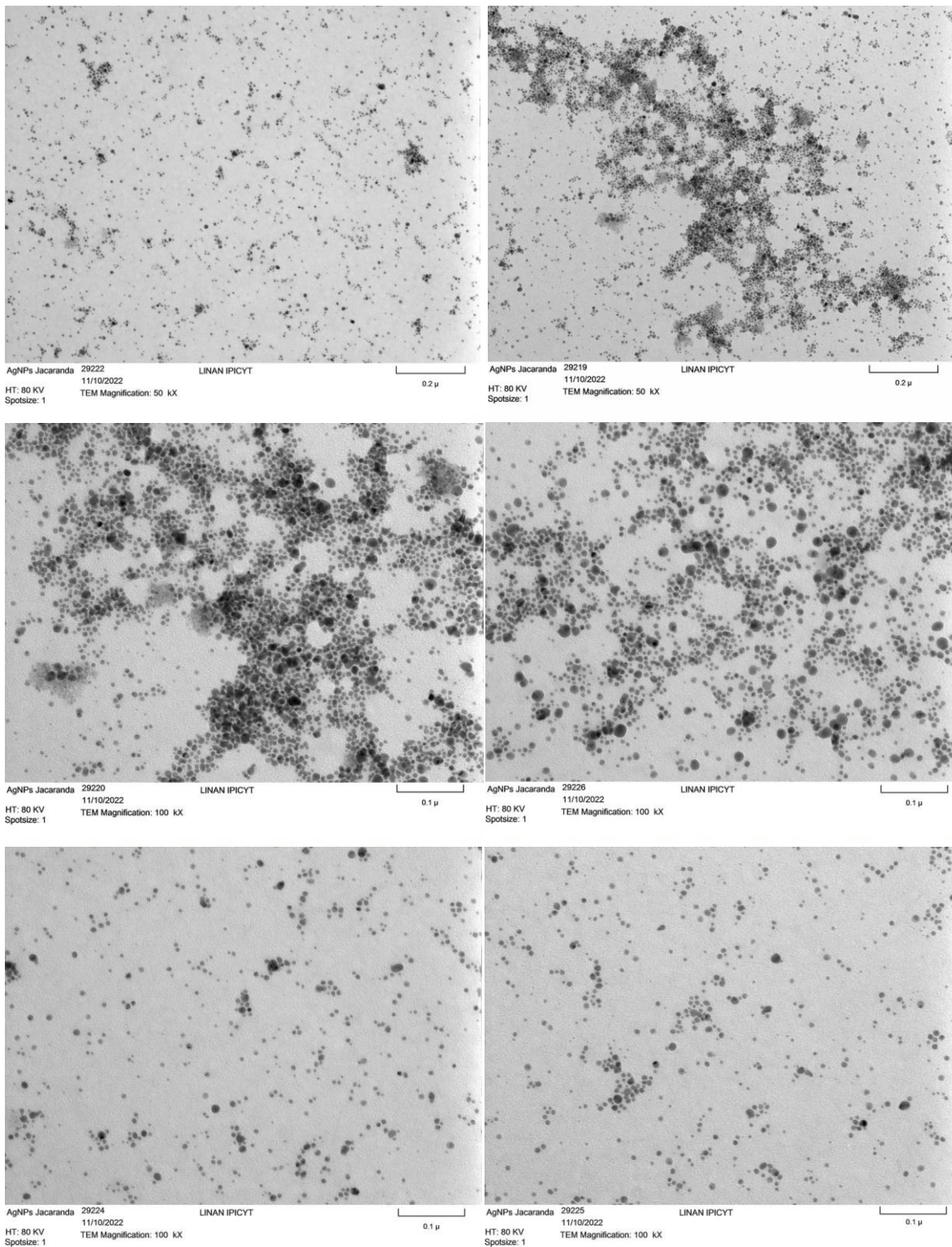


Figura 20. Imágenes de las JAgNPs en el TEM.

Pruebas antimicrobianas

a) Preparación de suspensiones celulares y población inicial

En la Tabla 15 se muestran los resultados del análisis de población inicial realizado a todas las suspensiones microbianas usadas en las pruebas microbiológicas. Una suspensión microbiana 0.5McFarland debe de tener una concentración aproximada de $\sim 1.5 \times 10^8$ UFC/mL [35], las suspensiones preparadas están más concentradas.

Tabla 15. Resultados población inicial.

Cepa	Número de colonias	Concentración de la suspensión (UFC/mL)
<i>S. aureus</i>	78	1.56×10^9
<i>S. enterica</i>	91	1.82×10^9
<i>P. areuginosa</i>	38	7.60×10^8
<i>E. coli</i>	71	1.42×10^9

b) Mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración bactericida (MBC).

El extracto de flor de *J. mimosifolia* no inhibió el crecimiento bacteriano de ninguna de las cepas a ninguna de las concentraciones utilizadas. En el caso de las AgNPs crudas, la MIC para *S. aureus* y *E. coli* fue de $2.7 \mu\text{g/mL}$ y para *S. enterica* y *P. areuginosa* fue de $1.3 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 16). La MIC para las AgNPs concentradas con las cuatro cepas fue de $10 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 17). En la Figura 21 se puede observar una de las placas utilizadas en esta prueba. Las AgNPs sintetizadas por Hosnedlova *et al* [36] tienen una MIC de entre 15 y $20 \mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* y *E. coli* con AgNPs sintetizadas con diferentes extractos herbales, estas concentraciones son mayores incluso que las encontradas para las AgNPs concentradas del presente estudio.

Tabla 16. Resultados de la MIC para las AgNPs crudas.

Dilución (µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. areuginosa</i>	<i>E. coli</i>
171.0	-	-	-	-
85.5	-	-	-	-
42.8	-	-	-	-
21.4	-	-	-	-
10.7	-	-	-	-
5.3	-	-	-	-
2.7	-	-	-	-
1.3	+	-	+	+
0.7	+	+	+	+
0.3	+	+	+	+

Tabla 17. Resultados de la MIC para las AgNPs concentradas.

Dilución (µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. areuginosa</i>	<i>E. coli</i>
25.0	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-
6.3	+	+	+	+
3.1	+	+	+	+
1.6	+	+	+	+
0.8	+	+	+	+
0.4	+	+	+	+
0.2	+	+	+	+

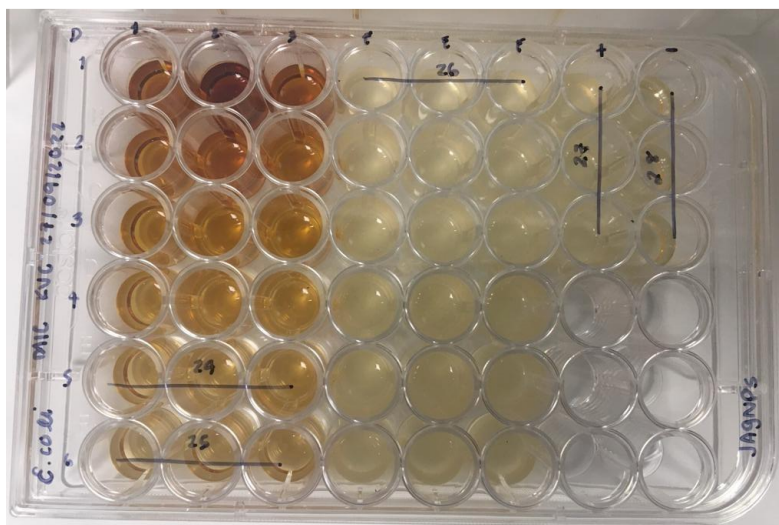


Figura 21. Microplaca de poliestireno de 48 pocillos con prueba MIC para *E. coli* con AgNPs crudas y extracto de jacaranda.

En cuanto a la MBC, el valor para las AgNPs crudas fue de 10.7µg/mL para *S. aureus* y *P. aureginosa* y de 5.3µg/mL para las *S. enterica* y *E. coli* cepas (Tabla 18). Con las AgNPs concentradas, la MBC fue de 20µg/mL (Tabla 19). En la Figura 22 se muestra una de las cajas Petri usadas en esta prueba. Se puede observar que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles a las JAgNPs que las Gram positivas. Las AgNPs sintetizadas por Parvekar *et al* [37] tienen una MBC de 625µg/mL para *S. aureus*, la cual es ~100 veces superior a la encontrada en este estudio.

Tanto en la MIC como en la MBC es apreciable una pérdida en la actividad biológica de las JAgNPs concentradas con respecto a las crudas, sin embargo, conservan actividad biológica que es incluso superior a algunas reportadas en la literatura [36], [37].

Tabla 18. Resultados de la MBC para las AgNPs crudas.

Dilución (µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>E. coli</i>
10.7	-	-	-	-
5.3	+	-	+	-
2.7	+	+	+	+
1.3	+	+	+	+
0.7	+	+	+	+

Tabla 19. Resultados de la MBC para las AgNPs concentradas.

Dilución (µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aureaginosa</i>	<i>E. coli</i>
25.0	-	-	-	-
12.5	+	+	+	+
6.3	+	+	+	+

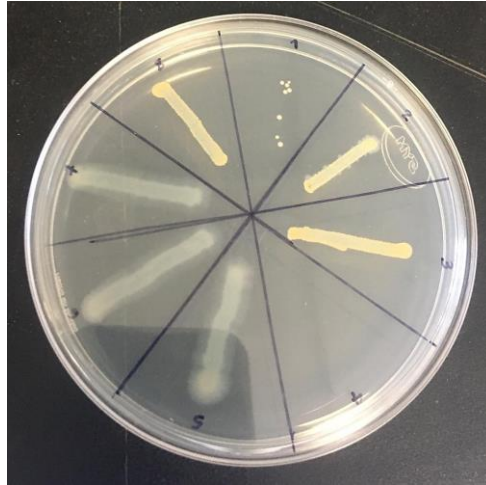


Figura 22. Caja Petri con agar nutritivo usada para la MBC. En cada sección de la caja se sembró el contenido de un pocillo diferente resultante de la MIC.

c) Difusión en disco

Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 20, en la cual se puede observar que los mejores resultados se obtuvieron usando las nanopartículas crudas. Posiblemente esto se debe a que los iones y moléculas que quedan presentes en la suspensión después de la biosíntesis ayudan a estabilizar las AgNPs. En la Figura 23 se pueden observar todas las placas Petri usadas en esta prueba. Así como en la MIC y la MBC, en esta prueba es evidente que las JAgNPs concentradas perdieron actividad. En esta prueba, las JAgNPs tuvieron una menor actividad a la reportada en la literatura; Cunha *et al* [38] reportan un halo de inhibición para *E. coli* de 17.1mm, sin embargo, también el control positivo (ciprofloxacino) dio un resultado de 45.9mm que es mucho mayor a cualquiera de los controles usado en esta prueba, por lo que se cree que en este caso afectó la alta concentración de las suspensiones microbianas.

Tabla 20. Resultados de la prueba de difusión en disco (mm).*

Cepa	Control +	Control -	342µg/mL	171µg/mL	250µg/mL	125µg/mL
<i>S. aureus</i>	6.0	0.0	2.1	1.5	0.8	0.6
<i>S. enterica</i>	8.2	0.0	2.8	1.6	2.3	1.5
<i>P. aureginosa</i>	4.0	0.0	1.6	1.1	1.2	0.0
<i>E. coli</i>	7.1	0.0	1.6	1.0	1.2	0.9

*Como controles positivos se usaron: cefoxitin para *S. entérica* y *E. coli*, oxitetraciclina para *P. aureginosa* y eritromicina para *S. aureus*. Como control negativo se usó PBS en todos los casos.

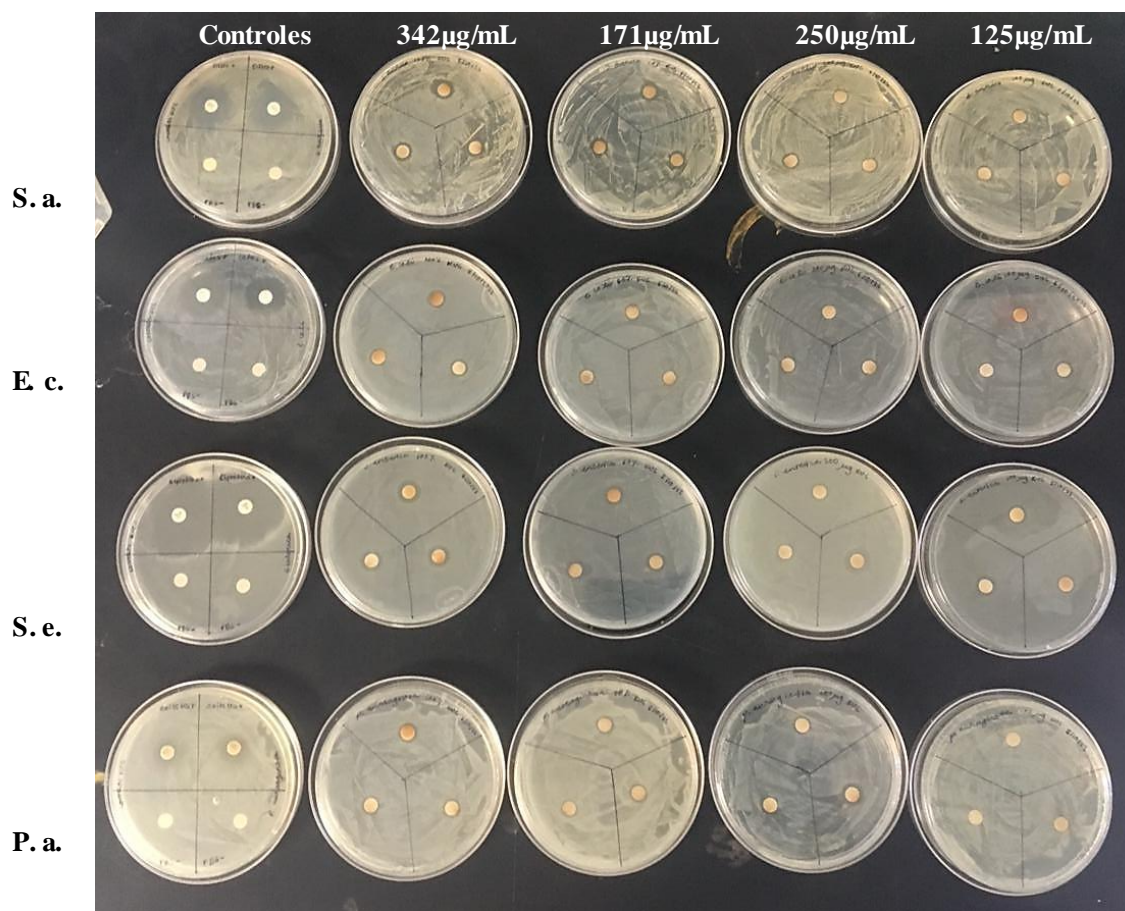


Figura 23. Resultados de la prueba de difusión en disco. S. a. = *Staphylococcus aureus*, E. c. = *Escherichia coli*, P. a. = *Pseudomonas areuginosa*, S. e. = *Salmonella enterica*.

Las cepas con mayor sensibilidad a las AgNPs son *S. aureus* y *S. enterica*. En la Figura 24 se pueden observar los halos de inhibición de estas cepas con las AgNPs crudas a 342µg/mL.

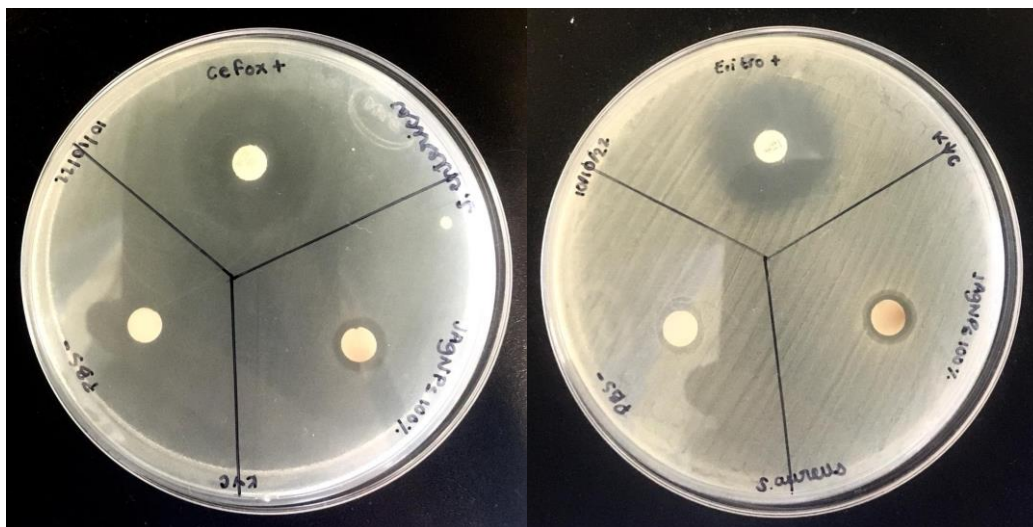


Figura 24. Resultados de la prueba de difusión en disco para *S. enterica* (izquierda) y *S. aureus* (derecha).

Pruebas antibiofilm

a) Cualitativa

Los resultados de esta prueba no fueron concluyentes, es necesario repetirla en un futuro.

b) Cuantitativa

En la Tabla 21 se muestran los resultados de la prueba para evaluar cuantitativamente la actividad antibiofilm de las JAgNPs. Sólo se reportan los resultados de *S. aureus* y *P. areuginosa* ya que *E. coli* y *S. enterica* no estaban produciendo biofilm en las condiciones trabajadas (las absorbancias de los pocillos que contenían solo medio de cultivo y de aquellos con crecimiento libre eran similares para estas dos cepas). Primero se intentó realizar la prueba en una placa de 96 pocillos (Figura 25), pero fue muy complicado realizar los lavados, lo cual resultaba en coeficientes de variación $>50\%$, por esto, se optó por usar una placa de 48 pocillos lo cual resultó en coeficientes de variación $<20\%$ en casi todos los casos. Se obtuvo una inhibición de formación de biofilm $>95\%$ y similar a la del control ($\sim 98.6\%$) usando una concentración de $5.4\mu\text{g/mL}$ de JAgNPs.

Tabla 21. Resultados de la prueba para evaluar la actividad de las JAgNPs.

Cepa	Tratamiento	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Turbidez	% inhibición de biofilm
<i>S. aureus</i>	-	0.116	0.117	0.121	0.118	0.003	2%	-	
	Control de medio								
	Control negativo (crecimiento libre)	1.813	1.530	1.530	1.506	0.163	10%	+	
	Control positivo (Tergazyme 1%)	0.140	0.134	0.132	0.017	0.004	3%	-	98.8
	21.4µg/mL JAgNPs	0.146	0.155	0.162	0.036	0.008	5%	-	97.6
	10.7µg/mL JAgNPs	0.150	0.158	0.212	0.055	0.034	19%	+	96.3
	5.4µg/mL JAgNPs	0.208	0.160	0.172	0.062	0.025	14%	+	95.9
<i>P. areuginosa</i>	2.7µg/mL JAgNPs	0.387	0.425	0.360	0.273	0.033	8%	+	81.9
	Control negativo (crecimiento libre)	1.102	1.001	1.095	0.948	0.056	5%	+	
	Control positivo (Tergazyme 1%)	0.133	0.126	0.137	0.014	0.006	4%	-	98.5
	21.4µg/mL JAgNPs	0.149	0.141	0.152	0.029	0.006	4%	-	96.9
	10.7µg/mL JAgNPs	0.131	0.165	0.130	0.024	0.020	14%	-	97.5
	5.4µg/mL JAgNPs	0.143	0.144	0.136	0.023	0.004	3%	+	97.6
	2.7µg/mL JAgNPs	1.031	0.498	0.908	0.694	0.279	34%	+	26.8

Mohanta *et al* [17] analizaron la actividad antibiofilm con diferentes AgNPs fitosintizadas. Encontraron que para alcanzar inhibición >99%, se requiere entre 23 y 100µg/mL de AgNPs,

que es una concentración mayor a la obtenida en este estudio, pero también una actividad 4% mejor a la reportada en este estudio.

En la Figura 26 se presenta un gráfico de barras con el comportamiento de la inhibición de la formación de biofilm de las JAgNPs para las dos cepas estudiadas. Se puede observar que la actividad se mantiene estable a partir de la $[JAgNPs]=5.4\mu\text{g/mL}$. Las AgNPs sintetizadas por Mohanta *et al* [17] obedecen el mismo comportamiento, también en el caso Hosnedlova *et al* [36] mencionan que obtuvieron una inhibición de biofilm ~50% usando una concentración de $10\mu\text{g/mL}$ y de $20\mu\text{g/mL}$. Esto puede indicar que a pesar de que diferentes AgNPs tienen diferente actividad antibiofilm, en todos los casos esta tiene un límite.

Una explicación a este comportamiento es que las AgNPs interactúan con grupos en las membranas bacterianas previniendo la formación del biofilm. Si todos los receptores ya están ocupados, se alcanza un punto de saturación, Parvekar *et al* [37] mencionan que las AgNPs pueden interactuar con grupos SH en las membranas celulares

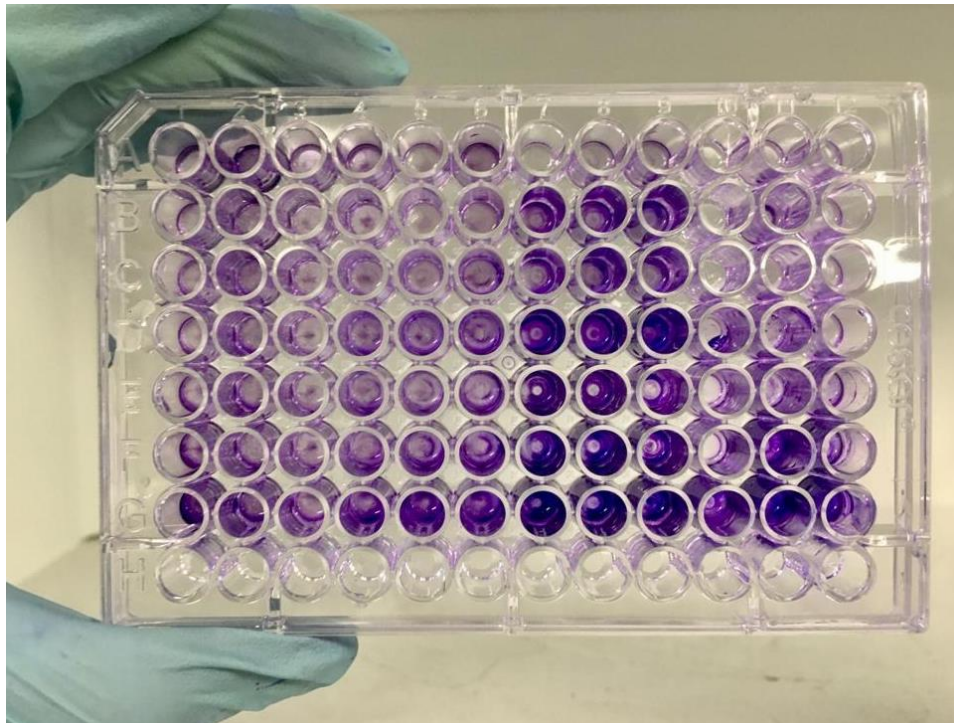


Figura 25. Placa de poliestireno de 96 pocillos usada en la prueba para evaluar cuantitativamente el efecto antibiofilm de las JAgNPs.

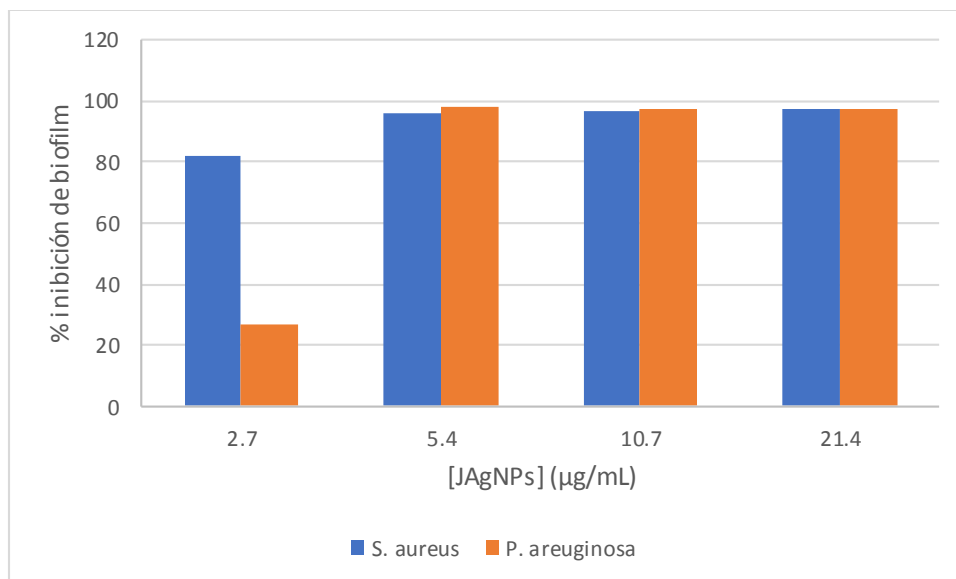


Figura 26. Comportamiento de la actividad antibiofilm de las JAgNPs a diferentes concentraciones.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

El biofilm es una problemática actual que afecta a la industria alimentaria (entre otras), porque existen diversas soluciones potenciales a esta problemática, pero todas tienen ventajas y desventajas o falta de investigación al respecto. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue obtener JAgNPs, caracterizarlas y evaluar su actividad antimicrobiana y antibiofilm. Se encontró que las JAgNPs fitosintetizadas tienen actividad antimicrobiana y un efecto de inhibición de formación de biofilm >95% a una [JAgNPs]=5.4µg/mL y con más investigación y pruebas podrían ser una alternativa a los productos antibiofilm existentes.

Para continuar con este proyecto es necesario encontrar una forma de separación y purificación que no dañe a las JAgNPs, así como formular un producto estable y económicamente rentable (implementando ingeniería económica, escalamiento, simulación, y vida de anaquel, entre otras pruebas posibles). También es necesario realizar pruebas de citotoxicidad en cultivo celular y modelos animales para verificar que las JAgNPs no sean dañinas para el ser humano, así como realizar estudios de toxicidad ambiental.

Otra posible actividad al continuar este proyecto es realizar más pruebas antibiofilm en superficies bióticas y abióticas o usando microscopía, estas pruebas podrían complementar la información obtenida en el presente estudio. Así mismo, es recomendable investigar cómo actúan las JAgNPs para inhibir la formación de biofilm, para lo cual se podrían implementar herramientas bioinformáticas. Por último, el proyecto se podría extender y realizar otro tipo de pruebas para descubrir si las AgNPs tienen otros potenciales, como antidiabética o antiproliferativa, entre otras.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] “nanoparticle | Definition, Size Range, & Applications | Britannica”. <https://www.britannica.com/science/nanoparticle> (consultado el 30 de septiembre de 2022).
- [2] N. Noah, “Chapter 6 - Green synthesis: Characterization and application of silver and gold nanoparticles”, en *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, A. K. Shukla y S. Iravani, Eds. Elsevier, 2019, pp. 111–135. doi: [10.1016/B978-0-08-102579-6.00006-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00006-X).
- [3] M. Schrand, M. F. Rahman, S. M. Hussain, J. J. Schlager, D. A. Smith, y A. F. Syed, “Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment”, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, núm. 5, pp. 544–568, 2010, doi: [10.1002/wnan.103](https://doi.org/10.1002/wnan.103).
- [4] H. Chang *et al.*, “Molecular-Level Understanding of Continuous Growth from Iron-Oxo Clusters to Iron Oxide Nanoparticles”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 141, núm. 17, pp. 7037–7045, may 2019, doi: [10.1021/jacs.9b01670](https://doi.org/10.1021/jacs.9b01670).
- [5] Kumar, M. Mondal, y N. Sakthivel, “Chapter 3 - Green synthesis of phytogetic nanoparticles”, en *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, A. K. Shukla y S. Iravani, Eds. Elsevier, 2019, pp. 37–73. doi: [10.1016/B978-0-08-102579-6.00003-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00003-4)
- [6] H. Aguirre-Becerra *et al.*, “Jacaranda flower (*Jacaranda mimosifolia*) as an alternative for antioxidant and antimicrobial use”, *Heliyon*, vol. 6, núm. 12, p. e05802, dic. 2020, doi: [10.1016/j.heliyon.2020.e05802](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05802).

- [7] “Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible”. <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos> (consultado el 30 de septiembre de 2022).
- [8] C. M. Hussain, M. S. Paulraj, y S. Nuzhat, “Chapter 7 - Source reduction and waste minimization in food industry”, en *Source Reduction and Waste Minimization*, C. M. Hussain, M. S. Paulraj, y S. Nuzhat, Eds. Elsevier, 2022, pp. 137–147. doi: [10.1016/B978-0-12-824320-6.00007-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824320-6.00007-1)
- [9] S. Galié, C. García-Gutiérrez, E. M. Miguélez, C. J. Villar, y F. Lombó, “Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018, Consultado: el 28 de septiembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00898>
- [10] D. P. Navia, H. S. VILLADA, y S. A. MOSQUERA, “Las biopelículas en la industria de alimentos”, *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 8, núm. 2, pp.
- [11] C. Carrascosa, D. Raheem, F. Ramos, A. Saraiva, y A. Raposo, “Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review”, *Int J Environ Res Public Health*, vol. 18, núm. 4, p. 2014, feb. 2021, doi: [10.3390/ijerph18042014](https://doi.org/10.3390/ijerph18042014).
- [12] S. Irvani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, y B. Zolfaghari, “Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods”, *Res Pharm Sci*, vol. 9, núm. 6, pp. 385–406, dic. 2014.
- [13] E. Padilla-Camberos *et al.*, “Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Stenocereus queretaroensis* Fruit Peel Extract: Study of Antimicrobial Activity”, *Materials*, vol. 14, núm. 16, p. 4543, ago. 2021, doi: [10.3390/ma14164543](https://doi.org/10.3390/ma14164543).
- [14] EUCAST, “EUCAST: método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos”. EUCAST, febrero de 2012. Consultado: el 16 de septiembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todo%20de%20difusi%C3%B3n%20con%20discos.pdf>
- [15] D. Marinova, F. Ribarova, y M. Atanassova, “Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables”, *JU Chem. Metal*, vol. 40, núm. 3, pp. 255–260, 2005.

- [16] C. S. Ezeonu y C. M. Ejikeme, “Qualitative and Quantitative Determination of Phytochemical Contents of Indigenous Nigerian Softwoods”, *New Journal of Science*, vol. 2016, pp. 1–9, oct. 2016, doi: [10.1155/2016/5601327](https://doi.org/10.1155/2016/5601327).
- [17] Y. K. Mohanta, K. Biswas, S. K. Jena, A. Hashem, E. F. Abd_Allah, y T. K. Mohanta, “Anti-biofilm and Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles Synthesized by the Reducing Activity of Phytoconstituents Present in the Indian Medicinal Plants”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2020, Consultado: el 16 de octubre de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01143>
- [18] Universidad Autónoma de Nuevo León, México, C. Rivas-Morales, M. A. Oranday-Cárdenas, y M. J. Verde-Star, *Investigación en plantas de importancia médica*, 1a ed. OmniaScience, 2016. doi: [10.3926/oms.313](https://doi.org/10.3926/oms.313).
- [19] R. Aznar, F. Barahona, O. Geiss, J. Ponti, T. José Luis, y J. Barrero-Moreno, “Quantification and size characterisation of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS”, *Talanta*, vol. 175, pp. 200–208, dic. 2017, doi: [10.1016/j.talanta.2017.07.048](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.048).
- [20] Agilent Technologies. *Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer User Guide*. Accesado el 25/11/2022
- [21] Malvern. *Zetasizer nano series User manual*. <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DL%20user%20manual.pdf>. Accesado el 25/11/2022
- [22] Malvern. *Zetasizer Cells and Cuvettes: Descriptions and Uses*. <https://www.alfatest.it/keyportal/uploads/2017-catalogo-cuvette-zetasizer.pdf>. Accesado el 25/11/2022
- [23] D. J. Freeman, F. R. Falkiner, y C. T. Keane, “New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci.”, *J Clin Pathol*, vol. 42, núm. 8, pp. 872–874, ago. 1989.
- [24] K. Kalishwaralal, S. BarathManiKanth, S. R. K. Pandian, V. Deepak, y S. Gurunathan, “Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 79, núm. 2, pp. 340–344, sep. 2010, doi: [10.1016/j.colsurfb.2010.04.014](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.014).
- [25] X. Aparicio Fernández, E. Y. Bivián Castro, y E. Martínez Cano, “La flor de jacaranda: más allá de su uso ornamental”, *RDU*, vol. 23, núm. 3, may 2022, doi: [10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.3.4](https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.3.4).
- [26] L. Cornejo, “Resonancia del plasmón de la superficie (RPS)”, *Nuevas Tecnologías y Materiales*, el 11 de agosto de 2015.

- <https://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/> (consultado el 24 de noviembre de 2022).
- [27] A. Nabikhan, K. Kandasamy, A. Raj, y N. M. Alikunhi, “Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 79, núm. 2, pp. 488–493, sep. 2010, doi: [10.1016/j.colsurfb.2010.05.018](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.018).
- [28] B. Kowalczyk, I. Lagzi, y B. A. Grzybowski, “Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 16, núm. 2, pp. 135–148, abr. 2011, doi: [10.1016/j.cocis.2011.01.004](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.01.004).
- [29] P. Mondragón-Cortez, “ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA TODOS”, p. 199, 2017.
- [30] NIST, “Silver nitrate”.
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=B6000530&Mask=80> (consultado el 25 de noviembre de 2022).
- [31] R. Rostami. Re: How can I separate and dry the silver nanoparticles (synthesized by plants extract) after centrifugation?. Consulado el 25/11/2022:
<https://www.researchgate.net/post/How-can-I-separate-and-dry-the-silver-nanoparticles-synthesized-by-plants-extract-after-centrifugation/543ee04bd2fd6471338b46af/citation/download>. (2014)
- [32] K. Vinothini y M. Rajan, “Chapter 9 - Mechanism for the Nano-Based Drug Delivery System”, en *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, y S. Thomas, Eds. Elsevier, 2019, pp. 219–263. doi: [10.1016/B978-0-12-814031-4.00009-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00009-X).
- [33] Malvern, “Zeta potential in salt solution (or any other ions) - Materials Talks”, el 6 de marzo de 2018. <https://www.materials-talks.com/zeta-potential-in-salt-solution-or-any-other-ions/> (consultado el 24 de noviembre de 2022).
- [34] C. S. M. Martins, H. B. A. Sousa, y J. A. V. Prior, “From Impure to Purified Silver Nanoparticles: Advances and Timeline in Separation Methods”, *Nanomaterials (Basel)*, vol. 11, núm. 12, p. 3407, dic. 2021, doi: [10.3390/nano11123407](https://doi.org/10.3390/nano11123407).
- [35] J. McFARLAND, “THE NEPHELOMETER:AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES.”, *Journal of the American Medical Association*, vol. XLIX, núm. 14, pp. 1176–1178, oct. 1907, doi: [10.1001/jama.1907.25320140022001f](https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f).

- [36] B. Hosnedlova *et al.*, “Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Bacterial Biofilm Changes in *S. aureus* and *E. coli*”, *Nanomaterials (Basel)*, vol. 12, núm. 13, p. 2183, jun. 2022, doi: [10.3390/nano12132183](https://doi.org/10.3390/nano12132183).
- [37] P. Parvekar, J. Palaskar, S. Metgud, R. Maria, y S. Dutta, “The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*”, *Biomater Investig Dent*, vol. 7, núm. 1, pp. 105–109, doi: [10.1080/26415275.2020.1796674](https://doi.org/10.1080/26415275.2020.1796674).
- [38] F. A. CUNHA *et al.*, “SILVER NANOPARTICLES-DISK DIFFUSION TEST AGAINST *Escherichia coli* ISOLATES”, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, vol. 58, p. 73, sep. 2016, doi: [10.1590/S1678-9946201658073](https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658073).

1.8. Anexos generales

Anexo I. Reactivo Fehling

Para esta prueba se requiere preparar 2 reactivos como se muestra a continuación:

1. Reactivo de Fehling A: 6.92% p/v de sulfato cúprico.
2. Fehling's B: 3.46% p/v de tartrato de sodio potasio y 14% de hidróxido de sodio 1M.
Para este reactivo, disolver primero el hidróxido de sodio añadiendo lentamente el agua y después el tartrato de potasio.

Agitar muy bien ambos reactivos antes de utilizar.

Anexo II. Reactivo de Dragendorff

Para esta prueba es necesario preparar el reactivo por separado para incrementar la vida útil del mismo, se mezclan ambos en proporciones iguales antes de la prueba.

1. Dragendorff A: Nitrato pentahidratado de bismuto II 0.5g, ácido acético glacial 6.25mL y 18.75mL de agua destilada.
2. Dragendorff B: Ioduro de potasio 10 g/25mL.

Notas:

- Ambos reactivos, tienen que clarificarse.
- Ambos reactivos se mezclan en igual proporción.
- Con esta preparación no es necesario diluir más el resultado.
- El reactivo de Dragendorff finalmente tiene un color naranja.

Anexo III. Hoja de especificaciones Silver, Dispersion (Figura 27).



3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Silver, dispersion – nanoparticles, 60 nm particle size (TEM), 0.02 mg/mL in aqueous buffer, contains sodium citrate as stabilizer

Product Number: 730815

Formula Weight: 107.87 g/mol
Storage Temperature: 2 - 8 °C

Ag

TEST	Specification
Appearance (Color)	Faint Yellow to Dark Yellow and Faint Orange to Dark Orange
Appearance (Form)	Liquid
May Appear Hazy Due to Being A Dispersion	
ICP Major Analysis	Confirmed
Confirms Silver Component	
Wavelength	425 - 450 nm
Absorbance	0.55 - 0.75 Abs UN
Diameter	Confirmed
Average Diameter (TEM): 60 nm +/- 8nm	
Supplier Information	Confirmed
Mass Concentration: 0.02 mg/ml +/- 10%	
Recommended Retest Period	-----
9 Months	

Specification: PRD.2.ZQ5.10000060572

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1



Figura 27. Hoja de especificaciones Silver, Dispersion.

Anexo IV. Espectro Infrarrojo del nitrato de plata.

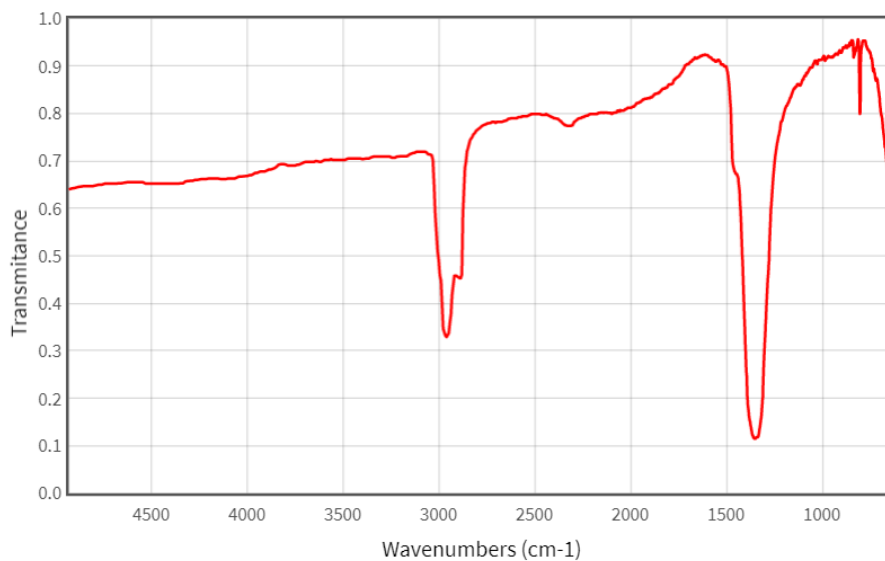


Figura 28. Espectro infrarrojo del nitrato de plata [30].

2. Productos

Tabla 22. Ficha descriptiva del producto elaborado: reporte.

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de la flor <i>Jacaranda mimosifolia</i> con potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Reporte detallado con todos los equipos y reactivos utilizados, métodos seguidos y todos los resultados obtenidos.
Autores:	Karen Verduzco Chavira

Tabla 23. Ficha descriptiva del producto elaborado: artículo para publicación.

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de la flor <i>Jacaranda mimosifolia</i> con potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Artículo para publicación que incluye los resultados más relevantes de este trabajo y otros similares.
Autores:	Eduardo Padilla Camberos, Karen Verduzco Chavira, Iván Moisés Sánchez Hernández, otros.

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

Fue muy enriquecedor para mi formación como profesionista trabajar en un centro de investigación, ya que me ayudó a darme cuenta del área en la que me quiero desenvolver. Aprendí que el trabajo en equipo y la buena relación con mis compañeros de trabajo es fundamental para tener un ambiente laboral sano y que el trabajo salga lo mejor y más rápido posible. Entendí que tengo que ser muy humilde y siempre estar dispuesta a aprender de los demás, así como a escuchar y decir lo que pienso de la forma más asertiva posible.

También me di cuenta de que la investigación en México requiere mucho más apoyo del que actualmente tiene y también de que, tristemente, cada vez tiene menos. Existe mucho talento y muchas personas capaces con ganas de hacer ciencia que no encuentran el apoyo que necesitan para prepararse o para ejercer y acaban dedicándose a otra o cosa, o si tienen la oportunidad, migrando a otro país en donde si puedan desarrollarse en su área.

Además, puse en práctica la importancia de la ética en el desarrollo tecnológico, ya que usualmente las personas dentro de un laboratorio trabajan con materiales peligrosos, contaminantes y patógenos, entre otras. Depende de cada uno conocer la disposición correcta de estos materiales y tener una buena organización para usar la menor cantidad posible para el bienestar de toda la sociedad.

Así mismo, en el aspecto ético me di cuenta de todas las pruebas necesarias para que un producto salga al mercado, en el laboratorio en el que estaba también se realizaban pruebas a productos y pude familiarizarme con algunas de ellas, incluyendo pruebas en animales y todas las regulaciones que norman este tipo de experimentos. Esto generó un conflicto ético en mí, pero finalmente aprendí que en algunos casos son necesarios y que existen formas éticas de hacerlo; además de que es mi responsabilidad como biotecnóloga desarrollar tecnología que sustituya los modelos animales para disminuir o incluso eliminar su uso.

3.2 Aprendizajes logrados

Aprendí como se trabaja en un centro de investigación, existen varias investigaciones relacionadas que ocurren en paralelo y es necesario estar en comunicación con tu equipo de trabajo y tu investigador para la toma de decisiones. En general trabajan por proyectos con una extensión de 1 a 4 años, por lo que el PAP es algo inusual en este entorno.

Aprendí sobre nanopartículas, lo cual era un tema ajeno a mi y tuve la oportunidad de aprender a usar equipos que no había usado en mi carrera (FTIR, zetasizer, fluorómetro). También aprendí a realizar la prueba de difusión en disco y en general reforcé mis conocimientos sobre microbiología.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

Tabla 23. Inventario de competencias, experiencias nuevas en azul, experiencias reforzadas en verde.

	Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*
Conocimientos	Inglés	TOEFL iBT, intercambio académico con materias en inglés	Capacidad de aprovechar la información científica publicada en inglés y de comunicar información a un mayor número de personas.
	Biología molecular	Materias cursadas en ITESO y en el intercambio académico	Es una herramienta fundamental en la biotecnología, tanto en el laboratorio como teóricamente.
	Uso de equipos (FTIR, fluorometría, zetasizer)	Los análisis realizados en este estudio	Son equipos que se usan comúnmente en el laboratorio y que ahora estoy capacitada para usar.
	Nanopartículas	Tecnología desarrollada en este estudio	Son una tecnología en desarrollo con muchas aplicaciones.
	Bioprocesos	Materias cursadas en ITESO y en el intercambio académico	Capacidad para analizar procesos e identificar oportunidades de mejora.
	Diseño de experimentos	Materias de estadística y diseño de experimentos cursadas en ITESO, además de su aplicación en distintos proyectos en otras materias.	Permite trazar una estrategia adecuada para demostrar o refutar una hipótesis, además de organizar el trabajo en el laboratorio e interpretar los resultados obtenidos.
	Francés	DELF, A2	Capacidad de aprovechar la información científica publicada en francés y de comunicar información a un mayor número de personas.
Habilidades	Microbiología, cultivo vegetal y cultivo animal	Materias cursadas en ITESO	Conocimientos prácticos y teóricos esenciales para el desarrollo de proyectos biotecnológicos.
	Destreza en el laboratorio	Prácticas de laboratorio y proyectos en ITESO.	Permite la realización de proyectos.
	Capacidad de planeación	Proyectos realizados en ITESO.	Permite trazar estrategias de trabajo claras, así como establecer dinámicas de trabajo.

	Capacidad de comunicar ideas	Reportes, presentaciones, ensayos y otros trabajos.	Permite trabajar de manera adecuada con otras personas, además de la redacción de reportes.
	Liderazgo	Campamento de líderes de AJIEMS, líder en distintos equipos de trabajo.	Ayuda a establecer dinámicas de trabajo.
	Pensamiento lógico	Competencias desarrolladas durante la carrera.	Ayuda en el análisis de problemas y búsqueda de soluciones.
	Pensamiento crítico	Competencias desarrolladas durante la carrera.	Ayuda a discriminar la información.
	Creatividad	Propuestas para distintos proyectos.	Permite encontrar soluciones innovadoras.
Actitudes	Organización	Competencias desarrolladas durante la carrera.	Permite realizar el trabajo de la mejor manera posible.
	Limpieza	Competencias desarrolladas durante las prácticas de laboratorio.	Herramienta útil en el laboratorio, ya que evita la contaminación de las muestras y previene accidentes.
	Responsabilidad	Competencias desarrolladas durante la carrera.	Permite realizar todo el trabajo en tiempo y forma, además de que ayuda a prevenir accidentes y desperdiciar recursos.
	Proactividad	Buena dinámica de trabajo en distintos proyectos.	Ayuda a tener una buena dinámica de trabajo.
	Humildad	La forma en la que me desenvolví en el laboratorio.	Es una actitud útil para tener en la vida, ya que permite crecimiento y una buena relación con los demás.
	Compañerismo	Las relaciones que genere en el lugar del PAP.	Ayuda a generar un ambiente laboral sano.
	Moral	Materias llevadas en ITESO.	Permite el desarrollo ético del trabajo.

Me di cuenta de que mi preparación durante la carrera en el ITESO ha sido suficiente para afrontar los retos de la vida profesional y que tengo muchas herramientas técnicas y teóricas

para poderme desempeñar adecuadamente dentro y fuera del laboratorio. También comprender que soy capaz de desarrollar un trabajo de esta magnitud, fue un ejercicio que requerí usar mucho mis habilidades de organización y planeación, así como pensamiento creativo y resolución de problemas para poder gestionar las diversas situaciones que se presentaron a lo largo del proyecto y finalmente lograr los objetivos planteados.