

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Biosíntesis, Caracterización y Evaluación in vitro de Actividad Antimicrobiana de Nanopartículas de Plata obtenidas a partir de Extractos Acuáticos de Cáscara de Nuez (*Carya illinoensis*)

Por:

MARÍA RAQUEL GARCÍA ALVARADO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Biosíntesis, Caracterización y Evaluación in vitro de Actividad Antimicrobiana de Nanopartículas de Plata obtenidas a partir de Extractos Acuáticos de Cáscara de Nuez (*Carya illinoensis*)

Por:

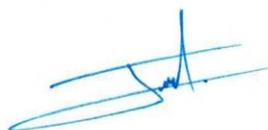
MARÍA RAQUEL GARCÍA ALVARADO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



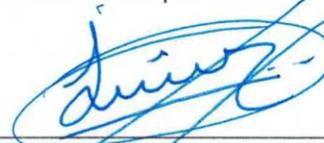
Dr. Josué Israel García López
Asesor Principal Interno



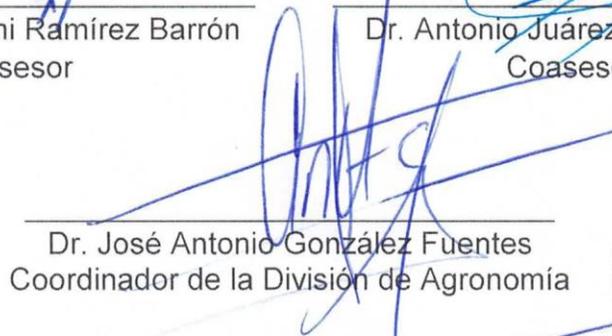
Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Asesor Principal Externo



Dra. Sonia Noemi Ramírez Barrón
Coasesor



Dr. Antonio Juárez Maldonado
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2021



DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

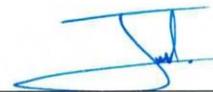
Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal



María Raquel García Alvarado

Asesor principal



Dr. Josué Israel García López

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su inmensa bondad, por guiar mis pasos y permitirme llegar hasta donde ahora estoy.

Agradezco a mis padres: Luis Felipe García de la Peña y María del Rosario Alvarado Gómez, sus esfuerzos para darnos la mejor educación a mí y a mis hermanos, son invaluableles. Su amor y apoyo incondicional está presente en cada etapa de mi vida.

Doy las gracias a mi asesora principal, la Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón, por enriquecer con sus conocimientos el desarrollo de la presente tesis. Agradezco todo el apoyo que me ha brindado, su paciencia, su amabilidad para resolverme dudas, y sus buenas enseñanzas, porque con ellas puedo afirmar que ha incrementado mi gusto por la Ciencia.

Agradezco al Dr. Josué Israel García López por su apoyo y orientación en la etapa experimental desarrollada en el Departamento de Fitomejoramiento.

Agradezco al Departamento de Ciencias Básicas, en especial a la Q.F.B. María del Carmen Julia García por permitirme el uso de las instalaciones y equipos para la realización del proyecto, así como su asesoría y apoyo en el uso y manejo de equipos.

Finalmente, gracias al Centro de Investigación de Química Aplicada, Saltillo, Coah., en especial al Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz por su apoyo en la caracterización de las nanopartículas.

DEDICATORIAS

*A mis queridos padres, que han dedicado su vida a
amarme, apoyarme y enseñarme.*

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
INDICE DE CUADROS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
I. INTRODUCCION	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo general.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Nanotecnología.....	4
2.2. Aplicaciones de los nanomateriales y nanopartículas.....	5
2.3. Nanopartículas metálicas.....	8
2.4. Síntesis de nanopartículas metálicas.....	9
2.4.1. Síntesis verde o Biosíntesis de Nanopartículas de Plata.....	10
2.4.2. Biomoléculas reductoras involucradas en la síntesis verde de AgNPs	15
2.4.3. Composición de la cáscara de nuez pecanera.....	15
2.4.4. Ácido Gálico.....	17
2.5. Aplicaciones de las Nanopartículas de Plata.....	18
2.6. Actividad antimicrobiana de las Nanopartículas de Plata.....	18
2.7. Técnicas de caracterización.....	19
2.7.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	19
2.7.2. Espectrofotometría UV-Visible.....	21
2.7.3. Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	22
III. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Materiales y Reactivos.....	23
3.2. Establecimiento del experimento.....	26
3.3. Acondicionamiento de la cáscara.....	27
3.4. Preparación de extractos.....	27

3.5.	Análisis de extractos	28
2.5.1.	Determinación de Proteínas Totales.....	28
2.5.2.	Determinación de Azúcares Totales	29
2.5.3.	Actividad antioxidante de extractos	29
3.6.	Biosíntesis de Nanopartículas de Plata.....	31
3.7.	Caracterización de Nanopartículas de Plata	32
3.8.	Actividad Antimicrobiana.....	34
3.9.	Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1.	Preparación de extractos acuosos de cáscara de nuez.....	36
4.2.	Análisis de extractos de cáscara de nuez	36
4.2.1.	Determinación de Proteínas Totales	36
4.2.2.	Determinación de Azúcares Totales	38
4.2.3.	Actividad antioxidante	39
4.3.	Biosíntesis de Nanopartículas de Plata.....	41
4.4.	Caracterización de Nanopartículas de Plata	43
4.5.	Actividad antimicrobiana	46
V.	CONCLUSIONES.....	49
VI.	REFERENCIAS	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la cáscara de nuez pecanera.....	16
Tabla 2. Compuestos polifenólicos de la cáscara de nuez pecanera.	16
Tabla 3. Materiales y reactivos para preparación de extractos.....	23
Tabla 4. Materiales y reactivos para determinación de proteínas.....	23
Tabla 5. Materiales y reactivos para determinación de azúcares.	24
Tabla 6. Materiales y reactivos para prueba ABTS.....	24
Tabla 7. Materiales y reactivos para prueba DPPH.....	24
Tabla 8. Materiales y reactivos para prueba FRAP.	25
Tabla 9. Materiales y reactivos para biosíntesis de AgNPs.	25
Tabla 10. Materiales y reactivos para actividad antimicrobiana.....	26
Tabla 11. Condiciones de reacción para cada extracto.....	27
Tabla 12. Condiciones de reacción para obtener soluciones de NPs.....	32
Tabla 13. Porcentaje de N y proteínas totales en cada extracto acuoso.	37
Tabla 14. ANOVA entre porcentajes de proteínas obtenidos en cada extracto...	38
Tabla 15. Determinación de mg/L de azúcares contenidos en cada extracto.....	38
Tabla 16. ANOVA entre ppm de azúcares obtenidos en cada extracto.....	39
Tabla 17. Actividad antioxidante de extractos.....	40
Tabla 18. ANOVA entre micromolesTE/100g obtenidos en cada extracto.	41
Tabla 19. Etiquetas de muestras de AgNPs.	42
Tabla 20. Diámetros de NPs obtenidos mediante la técnica DLS.....	45
Tabla 21. Halos de inhibición en mm.....	47
Tabla 22. ANOVA entre halos de inhibición obtenidos en cada agar.	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método físico y químico de obtención de NPs metálicas..	9
Figura 2. Ruta de síntesis de NPs metálicas utilizando extractos de plantas.....	13
Figura 3. Extractos acuosos de cáscara de nuez pecanera.....	36
Figura 4. Coloración de muestras destiladas.	36
Figura 5. Color de la mezcla antes y después de la reacción.	41
Figura 6. Soluciones de AgNPs obtenidas.	42
Figura 7. Longitudes de onda de las AgNPs en solución obtenidas.....	43
Figura 8. AgNPs obtenidas en muestra E1R2S2.	44
Figura 9. AgNPs obtenidas en muestra E2R2S1.	44
Figura 10. AgNPs obtenidas en muestra E3R1S1.	44
Figura 11. Halos de inhibición de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 12. Halos de inhibición de la bacteria <i>Salmonella thyphi</i>	46
Figura 13. Halos de inhibición de la bacteria <i>Proteus mirabilis</i>	46

RESUMEN

En la presente tesis se realizó la biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando como agentes reductores extractos acuosos de cáscara de nuez. Se prepararon 6 extractos con distintas condiciones de reacción, los cuales fueron analizados por método ABTS (Ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (2, 2-Difenil-1-picrilhidrazilo) y FRAP (Poder antioxidante de reducción ferrica) para determinar su capacidad antioxidante, así como por el método de determinación de azúcares totales técnica fenol-ácido sulfúrico y determinación de proteínas totales por digestión Kjeldahl, para determinar la capacidad reductora de las biomoléculas extraídas. Posteriormente, se determinó cual extracto contaba con mayor capacidad reductora y se hizo reaccionar con diferentes concentraciones de nitrato de plata, de dicha reacción se obtuvieron 18 soluciones de nanopartículas de plata, las cuales fueron caracterizadas mediante Espectrofotometría UV visible (UV-VIS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), y dispersión de luz (DLS) para determinar la presencia, morfología y tamaño de las nanopartículas.

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas se evaluó realizando el método de difusión en agar con las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* y *Proteus mirabilis*. Se obtuvieron halos de inhibición mayores en las bacterias *Salmonella Typhi* y *Proteus mirabilis*, lo que indica que las nanopartículas sintetizadas, muestran mayor efecto para inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas.

Palabras clave: *nanopartículas, biosíntesis, nitrato de plata*

INTRODUCCION

La nanociencia es el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala nanométrica. Por su parte, nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica. La importancia de las nanotecnologías se fundamenta en que permite modificar radicalmente las propiedades de los materiales conocidos e incluso crear otros nuevos (Mendoza y Rodriguez, 2007).

La nanotecnología “verde” surge buscando reducir los riesgos emergentes asociados a su uso biológico utilizando “fuentes naturales, de baja o nula toxicidad, que permitan reemplazar y eliminar el uso y generación de materiales peligrosos” (Carrá *et al.*, 2019).

Una nanopartícula (NP) es un tipo de nanoestructura donde los clústeres de átomos que lo forman tienen que tener un tamaño de 1-100 nm. Han suscitado mucho interés debido a sus propiedades, que derivan de la alta relación superficie-volumen, ya que si el diámetro disminuye, el área superficial de la partícula aumenta y como consecuencia se produce un aumento en las propiedades originales del material. Las NPs de metales, de óxidos metálicos o de compuestos basados en metales (como pueden ser las nanopartículas de plata) muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas que, en general, se relacionan con su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de la partícula, pudiendo ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica. Dentro de las nanopartículas metálicas, una de las que ha suscitado mayor interés, son las nanopartículas de plata (AgNPs), debido a su destacada actividad antimicrobiana, la cual, es la principal característica para el desarrollo de productos con incorporación de AgNPs en diversos materiales y por su capacidad como agente bactericida, contra los microbios como son las bacterias y hongos (Sánchez, 2017).

1.1 Justificación

Aprovechamiento de la cascara de nuez: Investigar una no tan experimentada ruta de obtención de NPs como lo es la biosíntesis a partir de extractos acuosos de cáscara de nuez, permite obtener nanopartículas mediante un método amigable con el medio ambiente, que permita utilizar las cáscaras como algo más que un residuo.

Uso de reactivos menos contaminantes: Los agentes de reducción que se han utilizado con mayor frecuencia para la síntesis de nanopartículas incluyen el borohidruro de sodio, y la hidracina. El borohidruro de sodio, según Sigma (2021) se clasifica como H260, que corresponde a sustancias que en contacto con el agua desprenden gases inflamables que pueden inflamarse espontáneamente, H301, que indica que es tóxico en caso de ingestión o en contacto con la piel, H314, provoca quemaduras en la piel y lesiones oculares y H360, sustancia que puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto en caso de ingestión. Por su parte, exposiciones prolongadas a la hidracina como respirar la sustancia o su contacto con la piel, puede causar daño en los pulmones, el hígado, los riñones y el sistema nervioso central (ATSDR, 2016). La síntesis verde ha emergido en las últimas décadas como una alternativa para la eliminación de dichos agentes reductores, aprovechando en su lugar, los agentes reductores naturales que poseen las plantas, así como poder eliminar el alto consumo de energía en equipos sofisticados.

Necesidad de nuevos antibióticos: Las nanopartículas pueden transportar, proteger y dirigir los agentes antimicrobianos al sitio de infección, de modo que se puedan administrar dosis mayores de fármaco en el lugar infectado, superando así los mecanismos de resistencia existentes con menos efectos dañinos sobre el paciente (Pérez, 2017).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Obtener nanopartículas de plata menores a 100 nm a partir de extractos acuosos de cáscara de nuez *Carya illinoensis*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas para la extracción eficiente de moléculas reductoras.
- Identificar las mejores condiciones de reacción para la obtención de nanopartículas de plata.
- Caracterizar las nanopartículas obtenidas mediante técnicas de Espectrofotometría UV visible (UV-vis), Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Dispersión de luz (DLS).
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas frente a bacterias gram positivas y gram negativas.

1.3 Hipótesis

Los extractos acuosos de cáscara de nuez actuarán como agentes reductores para la obtención de nanopartículas de plata y las nanopartículas obtenidas contarán con alta actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Nanotecnología

El término "nanoescala" se ha definido para denotar el intervalo de longitud aproximadamente de 1 nm a 100 nm, por lo tanto, se define a la nanotecnología como una técnica que permite modificar y manipular la materia a dicha escala (Neira, 2015). Los materiales a nanoescala presentan propiedades de resistencia, reactividad, conductibilidad, flexibilidad, durabilidad y toxicidad diferentes a los mismos materiales en tamaño mayor. En consecuencia, se puede afirmar que la nanotecnología no es una tecnología disciplinaria, particularmente si hablamos de su relación con la ciencia de materiales, más bien, se trata de una tecnología multidisciplinaria, que implica el entendimiento de la física, la química, la electrónica, la dinámica de fluidos y muchas otras ciencias (Záyago y Foladori, 2010).

Mientras que la palabra nanotecnología es relativamente nueva, la existencia de dispositivos y estructuras de dimensiones nanométricas funcionales no es nueva, y de hecho tales estructuras han existido en la Tierra, mucho más tiempo que la vida misma. Las conchas representan una manifestación natural de que una estructura fabricada a partir de nanopartículas puede ser mucho más fuerte. Por otro lado, no está claro cuando los seres humanos comenzaron a tomar ventaja de los materiales de tamaño nanométrico, sin embargo, se sabe que en el siglo IV a. C los vidrieros romanos fabricaban vasos que contenían metales de tamaño nanométrico (Poole y Owens, 2007).

Záyago y Foladori (2010) señalan que la nanotecnología se expone como una tecnología revolucionaria, puesto que marca el desarrollo de nuevos materiales o el descubrimiento de propiedades novedosas en materiales ya conocidos. Es por esto que se le considera la plataforma de la revolución industrial del siglo XXI.

2.2 Aplicaciones de los nanomateriales y nanopartículas

Las propiedades exhibidas por los nanomateriales son diferentes a las que exhiben estos mismos materiales en una macroescala. Las nanopartículas (NPs) poseen una mayor relación de superficie-volumen y por tanto una mayor superficie de contacto con el entorno. Esto hace que los nanomateriales sean muy atractivos para su explotación en múltiples sectores y que la nanotecnología se expanda a un gran ritmo. Así, se ha pasado en muy poco tiempo de una situación en la que prácticamente no existían nanomateriales en nuestro entorno, a estar rodeados por una gran variedad de productos que los contienen en su composición (Ávalos *et al.*, 2013).

López *et al.*, (2013) mencionan algunas aplicaciones actuales de los nanomateriales, las cuales se describen a continuación.

Materiales aislantes térmicos: Los materiales sintetizados por la técnica de sol-gel resultan ser aerogeles, como estos son porosos y el aire está atrapado en sus intersticios, se pueden usar para el aislamiento de habitaciones, de esta manera se reduce drásticamente tanto el calentamiento como el enfriamiento, por lo que disminuye el consumo de energía, y simultáneamente la contaminación ambiental. Ramírez *et al.*, (2016) señalan que las nanopartículas de sílice huecas presentan propiedades físicas y químicas deseables para el desarrollo de materiales aislantes y superaislantes, tal como baja conductividad térmica manipulable con base al tamaño y composición.

Materiales cerámicos: Algunos cerámicos pueden ser presionados y sinterizados en varias formas a temperaturas significativamente más bajas para producir objetos sólidos más flexibles, algo que sería muy difícil, si no imposible, en los mismos cerámicos convencionales, aún a temperaturas altas. Los materiales cerámicos más comunes: óxido de silicio (SiO_2), óxido de titanio (TiO_2), óxido de zirconio (ZrO_2), son nanomateriales que presentan compatibilidad con sistemas

biológicos debido a su naturaleza inerte. También se caracterizan por presentar alta estabilidad química y mecánica (Guel y Hernández, 2013).

Óptico y electrónico: La resolución de un televisor o un monitor depende en gran medida del tamaño del píxel. Compuestos esencialmente por materiales llamados “fósforos”, los píxeles brillan cuando chocan con un torrente de electrones en el interior de un tubo de rayos catódicos. La resolución mejora cuando los píxeles, o los fósforos, son más pequeños. Actualmente, las nanopartículas bimetálicas (compuestas por dos diferentes elementos metálicos) atraen más la atención que las monometálicas debido a sus propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas, así como su desempeño en procesos catalíticos o fotocatalíticos. Un buen ejemplo del ajuste de las propiedades ópticas (y electrónicas) de un material al modificar su estructura son las nanopartículas de sulfuro de cadmio (CdS) (Aguilar y Zanella, 2017).

Imanes de alto potencial: La fuerza de un imán aumenta con el incremento del área superficial por unidad de volumen. Sus aplicaciones típicas involucran alternadores para automóviles, instrumentos analíticos ultrasensibles, motores de barcos, etc. Durante las dos últimas décadas se han estudiado las propiedades magnéticas presentes en un tipo de partículas denotadas como “nanoiron”. Este término tiene un significado integral e involucra todas las NPs a base de hierro, tales como las NPs de hierro metálico o valencia cero y las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (Fernández, 2013).

Aeronaves: Los componentes hechos de nanomateriales son más fuertes y pueden operar a temperaturas más altas, lo cual significa que las aeronaves volarán más rápido y de forma más eficaz usando la misma cantidad de combustible. Las nanopartículas de zirconia, de óxido de aluminio y nitruros son de gran aplicación en barreras térmicas para las turbinas (Sánchez, 2006).

Fármacos: Es posible producir nuevos medicamentos en estado sólido al generarlos en forma de nanopartículas, cuyas altas áreas superficiales permiten que se solubilizan en la corriente sanguínea donde micro o macropartículas no pueden. Ya que más de un 50 % de nuevas formulaciones de medicamentos no se llevan al mercado a causa de problemas de solubilidad, esta simple transformación en forma nanométrica abre nuevas posibilidades de síntesis de medicamentos. Un ejemplo claro de esto, es la tecnología de las nanopartículas de fosfato de calcio, de la empresa BioSante, que tiene como objetivo el suministro de proteínas, por ejemplo la insulina, además de utilizarse como adyuvante de vacunas (Villafuerte, 2009).

Polímeros mejorados: Cuando se adicionan nanopulvos a matrices poliméricas hay un efecto de fortalecimiento tal que la resistencia del material es altamente incrementada. Pueden crearse materiales más fuertes, ligeros, resistentes al desgaste, recubrimientos más duros, plásticos retardantes al fuego, etc. Nanohíbridos basados en polímeros y nanopartículas de sílice muestran resultados prometedores en la estabilidad térmica de polímeros sintéticos (Ruiz *et al*, 2020)

Sector textil: La nanotecnología añade a los tejidos propiedades “inteligentes”, existen proyectos de productos textiles con funcionalidades electrónicas, tales como sensores que supervisen el comportamiento corporal, mecanismos de auto reparación, etc. Rojas (2016) señala que, las nanopartículas de plata son utilizadas en solución para recubrimientos textiles, la prenda se hace pasar por una serie de baños con soluciones de nanopartículas y posteriormente es secada y curada bajo determinadas condiciones de temperatura, presión y pH. El recubrimiento con dichas nanopartículas es utilizado como un tratamiento antibacteriano que busca evitar el contagio de enfermedades o problemas de infección en heridas, además buscan evitar el mal olor producido por la transpiración o la suciedad.

Industria cosmética: Se realizan aplicaciones contra las arrugas basadas en liposomas que transmiten los fármacos a través de la piel, o incluso polvos de maquillaje que son nanopartículas que modifican el reflejo de la luz, para impedir que se aprecie la profundidad de las arrugas. Sistemas de liberación controlada, la prolongación de los efectos de los principios activos o la estabilidad de las formulaciones son algunas de las mejoras que se están consiguiendo. Los tipos de nanomateriales que se usan para ello son nanoemulsiones, nanopartículas de oro, dendrímeros, liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos, entre otras (Torruela, 2019).

2.3 Nanopartículas metálicas

Son un tipo de nanopartículas cuya base es un metal noble o reactivo, el cual le confiere propiedades magnéticas, de conducción electrónica y reactividad química. Es posible controlar dichas propiedades selectivamente por la modificación de su tamaño, su morfología y su composición (López *et al.*, 2013).

López *et al.*, (2013) también señalan que, la aplicación de las propiedades de las nanopartículas metálicas puede clasificarse en dos categorías: las propiedades mejoradas y las propiedades únicas. El grupo de propiedades mejoradas abarca aquellas aplicaciones que ya han sido imaginadas pero que pueden beneficiarse del uso de nanocristales en términos del tamaño o el área superficial. Muchos de estos tipos de aplicaciones han encontrado un casi inmediato éxito comercial y han abierto la puerta a otros usos. El grupo de aplicaciones únicas es un conjunto más pequeño, pero con un mayor potencial. Las propiedades de las nanopartículas incluyen efectos de confinamiento cuántico, electrónicos, ópticos, de superparamagnetismo y superplasticidad.

2.4 Síntesis de nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas pueden obtenerse principalmente por dos métodos:

a) El método físico (top-down), consiste en la subdivisión mecánica del metal en porciones más pequeñas, este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados.

b) El método químico (bottom-up), consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas (Zanella, 2012) (figura 1).

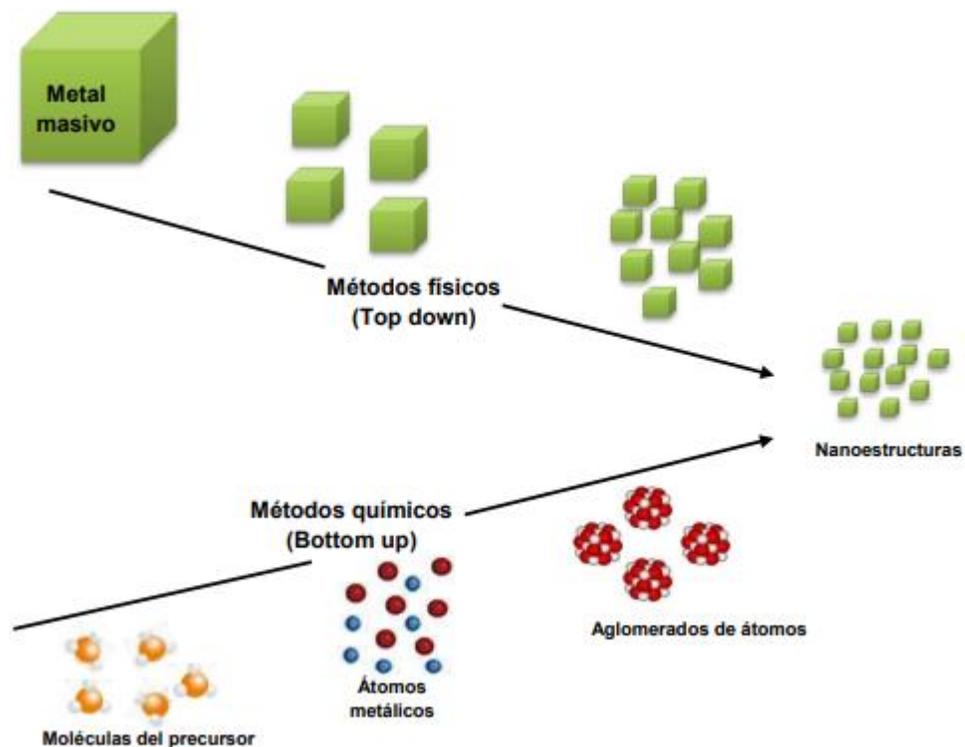


Figura 1. Método físico de obtención de nanopartículas metálicas, en el cual el metal se divide cada vez más; Método químico mediante adición de átomos metálicos a un precursor para que las partículas queden unidas y obtener nanopartículas (Valencia, 2013).

2.4.1 Síntesis verde o biosíntesis de nanopartículas de plata

La síntesis biológica de nanopartículas se denomina también como “síntesis verde”, donde es factible llevar a cabo la síntesis de nanopartículas a partir del uso de microorganismos, biomasa de microorganismo, hongos, algas, actinomicetos, plantas o sus extractos y también mediante la participación de proteínas, azúcares, fenoles y otras enzimas. De esta forma, la síntesis biológica representa una alternativa limpia, presumiblemente no tóxica, amigable con el medio ambiente y que además su uso en algunas ocasiones iguala o sobrepasa las expectativas de las nanopartículas sintetizadas por métodos físicos y químicos, en cuanto a costo y calidad de las nanopartículas obtenidas (Hernández, 2013).

Las biomoléculas que conforman a las plantas, partes de plantas, algas, levaduras, hongos y bacterias sustituyen a los agentes reductores y estabilizantes convencionales, utilizándose para lograr la reducción de los iones metálicos.

Sánchez (2017) indica que este tipo de técnica, se basa en el proceso de reducción química (ganancia de electrones o disminución en el número de oxidación, de Ag^{+1} a Ag^0). Durante la reducción de los iones de plata, los diámetros de AgNPs resultantes son variables dependiendo de la cantidad de iones (Ag^{+1}) que formen átomos de (Ag^0) y después, el número de átomos de Ag que se aglomeran en clústeres que conformarán las AgNPs. La cantidad de agente reductor debe ser suficiente para estabilizar las AgNPs al momento en que ocurre la reacción pero no demasiado grande como para aumentar la fuerza iónica total en la disolución y promover la agregación.

Sin duda alguna, los métodos biológicos son más amigables con el medio ambiente ya que no utilizan productos tóxicos, pero no son reproducibles a gran escala. Aunque se obtienen partículas de alta calidad, aún se encuentran en fase de desarrollo para obtenerlos a mayor escala y obtener con ellos grandes cantidades de NPs (Sánchez, 2017).

2.4.1.1 Bacterias

Las nanopartículas de plata de alta estabilidad (40 nm) podrían sintetizarse mediante biorreducción de iones acuosos de plata con un cultivo sobrenadante de bacterias no patógenas (Korbekandi e Iravani, 2012).

Algunas especies también son capaces de reducir iones de metales preciosos en solución o sintetizar nanopartículas metálicas tanto en el interior de la célula bacteriana o mediante la secreción de agentes reductores (enzimas) hacia el medio de cultivo. Las bacterias *Bacillus subtilis*, *Shewanella algae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Thermomonospora sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Filamentous cyanobacteria (Plectonema borganum)*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Rhodopseudomonas capsulata* se han utilizado para sintetizar nanopartículas de plata y oro. Sin embargo, el uso de bacterias para reducir los iones metálicos y formar nanopartículas metálicas es escaso, una posible causa es la toxicidad de elementos tales como el platino y la plata en los sistemas biológicos (Hernández, 2013).

2.4.1.2 Hongos

Se ha investigado y reportado el uso de diferentes tipos de hongos para llevar a cabo la formación de nanoestructuras metálicas. Mediante estos estudios se ha demostrado que estos microorganismos poseen la capacidad para llevar a cabo la reducción de iones metálicos a nanopartículas metálicas. Las principales características en las que se fundamenta su aplicación son debidas a la secreción de una gran cantidad de enzimas (responsables de la reducción de los iones metálicos), facilidad de manejo, económicamente viable y facilidad de realizar reacciones a escala mayor.

Aunque se ha demostrado el uso de hongos para producir nanopartículas metálicas de oro y platino, la mayoría de los estudios se enfocan en la síntesis de

nanopartículas de plata. Entre las especies de hongos que se han estudiado se encuentran: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Phaenerochaete chrysosporium* y *Verticillium*. La síntesis de nanopartículas de plata usando hongos ha generado resultados interesantes en relación al tipo y distribución del tamaño de las nanopartículas formadas (Korbekandi e Iravani, 2012).

Korbekandi e Iravani (2012) sostienen que las nanopartículas de plata (5-50 nm) podrían sintetizarse extracelularmente utilizando *Fusarium oxysporum*, sin evidencia de floculación de las partículas incluso un mes después de la reacción. La estabilidad a largo plazo de la solución de nanopartículas podría deberse a la estabilización de las partículas de plata por las proteínas. La morfología de las nanopartículas era muy variable, con formas generalmente esféricas y ocasionalmente triangulares observadas en las micrografías.

2.4.1.3 Plantas

Extractos de plantas, partes de ellas, y sus frutos contienen sustancias que actúan como agentes reductores a partir de los cuales se pueden obtener nanopartículas.

Korbekandi e Iravani (2012) señalan que el extracto de *Camellia sinensis* (té verde) se ha utilizado como agente reductor y estabilizador para la biosíntesis de nanopartículas de plata en solución acuosa en condiciones ambientales. Se observó que cuando la cantidad de extracto de *C. sinensis* aumentaba, las nanopartículas resultantes eran ligeramente más grandes y esféricas. Las biomoléculas de tipo ácido fenólico (por ejemplo, cafeína y teofilina) presentes en el extracto de *C. sinensis* parecían ser responsables de la formación y estabilización de las nanopartículas de plata. Los extractos de hojas de té negro también se utilizaron en la producción de nanopartículas de plata. Las nanopartículas eran estables y tenían diferentes formas, como esferas, trapecios,

prismas y varillas. Los polifenoles y los flavonoides parecían ser los responsables de la biosíntesis de estas nanopartículas.

Los extractos de Aloe Vera, hojas de geranio, hierbas de limón, extractos de la fruta *Emblica officinalis* y caldo de las hojas del Neem han sido usados para sintetizar nanopartículas de oro y plata. Las técnicas de síntesis en este tipo de estudio implican la obtención de un extracto de la planta mediante la cocción en agua del material vegetal fresco cortado en diferentes proporciones para crear una solución acuosa o extracto la cual contiene ácidos orgánicos y otros compuestos orgánicos presentes en las plantas. Este extracto se hace reaccionar con los iones de oro o de plata a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones (Hernández, 2013).

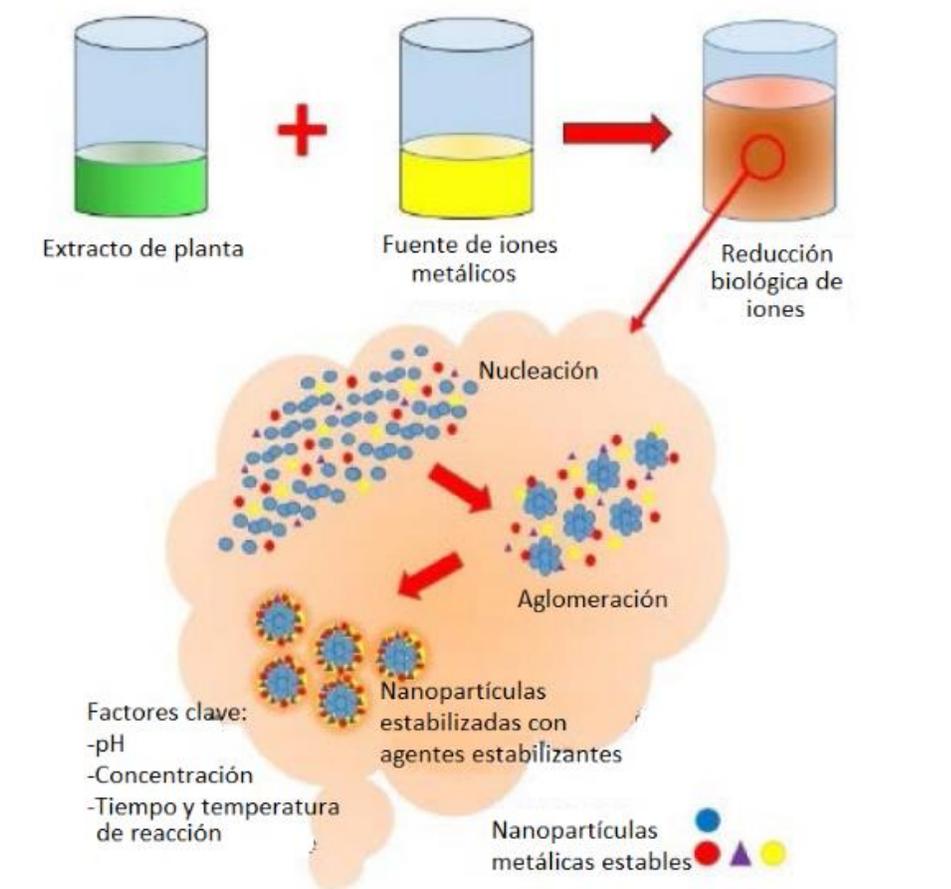


Figura 2. Ruta de síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas (López, 2019).

Uno de los pilares fundamentales de la síntesis verde es el uso de plantas para la obtención de extractos con alto poder antioxidante como polifenoles, azúcares reducidos, bases nitrogenadas y aminoácidos; que son capaces de reducir cationes en una disolución de sal metálica. La reducción inicial de iones metálicos induce a la formación de centros de nucleación, los cuales secuestran iones metálicos adicionales y también incorporan lugares vecinos de nucleación que a veces conducen a la formación de nanopartículas. Además como estas partículas están asociadas a restos orgánicos de los extractos de plantas, en ocasiones, se consigue estabilizar esas partículas de tamaño nanométrico e impedir que se agreguen. Otra gran ventaja que presenta el empleo de métodos de química verde es la posibilidad de controlar el tamaño de las nanopartículas variando la concentración de extracto vegetal empleado sin necesidad de usar agentes surfactantes, estabilizantes o plantillas (Neira, 2015).

López et al., (2013) afirman que, entre los principales metabolitos que tienen propiedades reductoras se encuentran los compuestos fenólicos como el ácido gálico, ácido benzoico y ácido caféico entre otros, que están presentes en algunas plantas conocidas por sus propiedades antioxidantes. Así por ejemplo, se han obtenido nanopartículas de oro y plata a temperatura ambiente utilizando ácido gálico, un metabolito presente algunos vegetales. El primer reporte de nanopartículas obtenidas a partir de plantas vivas fue publicado en 2002 y se demostró que nanopartículas de oro, de 2 a 20 nm, se podían formar dentro de plantas de alfalfa. Posteriormente, se mostró que la alfalfa también podía formar nanopartículas de plata cuando era expuesta a un medio rico en iones de plata.

En las últimas dos décadas, se han hecho grandes esfuerzos a nivel mundial, que buscan promover la conservación, la recuperación y el uso sostenible de la biodiversidad. Es por esto que, el uso de un residuo como lo es la cáscara de la nuez pecanera para sintetizar nanopartículas de plata surge como una alternativa poco experimentada, novedosa y sustentable.

2.4.2 Biomoléculas reductoras involucradas en la síntesis verde de AgNPs

En los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales, generalmente constituidos por mezclas de compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica, obtenidas de extractos vegetales, entre los cuales los más importantes son los compuestos polifenólicos como los flavonoides, taninos y compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de muchas plantas que juegan un papel fundamental en la actividad antioxidante por sus bajos potenciales redox, pues actúan como donadores de electrones que producen su oxidación, inhibiendo así otros procesos oxidativos (Han *et al.*, 2012). Los bajos potenciales redox de estos antioxidantes hacen termodinámicamente favorable la reducción de la gran mayoría de radicales libres y algunos metales (Makarov *et al.*, 2014).

Sin duda, la síntesis de nanopartículas metálicas es una evidencia del poder reductor de los extractos vegetales, el cual cabe subrayar, dependerá de los componentes que la planta contenga.

Tomando en cuenta la gran diversidad de vegetales que existen, así como su disponibilidad, y que no solo disminuirían los costos de los procedimientos químicos, sino que también sería un procedimiento más amigable con el entorno, el objetivo de este trabajo fue estudiar los extractos acuosos de la cáscara de nuez pecanera como antioxidantes naturales y determinar su poder reductor frente a iones de plata, esto como una alternativa a los procesos tóxicos de recuperación de metales.

2.4.3 Composición de la cáscara de nuez pecanera

Una de las nueces de gran demanda en el mercado internacional es la nuez pecanera, también llamada nuez cáscara de papel que corresponde a la semilla del fruto del árbol Nogal pecanero (*Carya illinoensis*). La alta demanda principalmente del mercado asiático, ha impulsado en México el crecimiento

exponencial de su producción en los últimos 30 años, triplicando el área sembrada hasta 112,000 ha, principalmente en los estados del Norte como: Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango y Nuevo León, y cuadruplicando su producción, alcanzando y superando la de los Estados Unidos en el ciclo 2014–2015.

La disposición final de la cáscara, de alguna manera puede ser una problemática. Si bien es cierto, se usa escasamente como relleno de caminos y abrasivo para metales. Sin embargo, se calcula que el 45–50% del peso total del fruto corresponde a la cáscara, la cual queda expuesta a cielo abierto resultando en un contaminante potencial. Este subproducto representa una problemática que hasta el momento no se le ha encontrado una aplicación a pesar de que tiene un alto contenido de compuestos bioactivos con valor en el mercado para fines alimentarios, cosméticos o farmacéuticos (CONACYT, 2015).

En la tabla 1 y 2, se presenta la composición química de la cáscara de nuez pecanera y los compuestos fenólicos que contiene.

Tabla 1. Composición química de la cáscara de nuez pecanera
Los valores se expresan en gramos por 100 gramos de porción de cáscara (Vázquez y López, 2016).

Compuesto (g/100g)	Composición Química de la Cáscara
Proteínas	2.84
Lípidos	0.39
Carbohidratos	34.57
Humedad	11.30
Cenizas	1.85
Fibra cruda	48.47

Tabla 2. Compuestos Polifenólicos de la cáscara de nuez pecanera
CE: Catequina; GAE: Ácido Gálico; B.H: Base húmeda (Vázquez y López, 2016).

Compuestos Polifenólicos	Cáscara
Flavonoides totales mg CE/g B.H	2.84
Fenólicos totales mg GAE/g B.H	0.39
Taninos condensados mg CE/g B.H	34.57

En su composición de fitoquímicos, la almendra y particularmente la cáscara de la nuez pecanera tienen un alto contenido de compuestos flavonoides, fenólicos totales y proantocianidinas o taninos condensados, los cuales son de gran interés nutricional y medicinal. Cabe señalar, que tanto el ácido elágico como gálico fueron identificados en cáscara, sin embargo, no fueron cuantificados (Vázquez y López, 2016).

López et al., (2013) enfatizan que entre los principales metabolitos que tienen propiedades reductoras se encuentran los compuestos fenólicos como el ácido gálico, ácido benzoico y ácido caféico entre otros, los cuales están presentes en algunas plantas conocidas por sus propiedades antioxidantes.

2.4.4 Ácido gálico

El ácido gálico es un polifenol perteneciente al grupo de taninos hidrolizables, se le han atribuido algunas propiedades biológicas, entre ellas: actividad antimicrobiana, anticancerígena y, recientemente, antiviral; todo esto es por su capacidad antioxidante, ya que estabiliza radicales libres y ayuda en la mayoría de los sistemas biológicos generando un efecto positivo.

Actualmente, el ácido gálico se utiliza en algunas áreas de diferentes sectores industriales. Por ejemplo: se utiliza como antioxidante en algunos alimentos, también hay reportes que indican que es un intermediario de la producción o la síntesis de algunos antibióticos, incluso, se ha utilizado también para darle un tratamiento a las pieles y al cuero, debido a su capacidad astringente (Govea, 2017).

2.5 Aplicaciones de Nanopartículas de Plata

Chen y Schluesener (2008) afirman que la plata ha sido sometida a nuevas tecnologías de ingeniería para el aprovechamiento de sus características. Por ejemplo, se han diseñado en partículas ultrafinas cuyo tamaño se mide en nanómetros, cuando tienen una dimensión menor de 100 nanómetros denominadas como nanopartículas de plata (AgNPs). Al llegar a nanoescala, como otros nanomateriales y principalmente en virtud de su tamaño extremadamente pequeño, las partículas de plata exhiben propiedades fisicoquímicas notablemente inusuales y ciertas actividades biológicas. La plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las AgNPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología, con aplicaciones en medicina, la industria textil, y en el sector alimentario (la agricultura y en el envasado de alimentos). Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos (Ávalos *et al.*, 2013).

2.6 Actividad antimicrobiana de las AgNPs

Las AgNPs son el agente más estudiado y por ende del que se dispone mayor información en cuanto a su mecanismo de actividad antimicrobiana. Estas NPs son activas contra las bacterias *Gram*-negativas y *Gram*-positivas. Su mecanismo de acción se resume en tres principales métodos: el primero se explica por la liberación gradual de iones de plata que inhiben la producción de adenosin trifosfato (ATP) y la replicación del ADN, factores fundamentales para la supervivencia celular; el segundo mecanismo podría atribuírsele a la capacidad de las nanopartículas para generar un daño directo a la membrana celular donde el contacto de la plata con las membranas de las bacterias, que son bastante ácidas,

provocan que la plata se deshaga de iones. Estos iones de plata entran en la bacteria, y allí reaccionan con las enzimas que hay dentro, concretamente con los grupos químicos llamados “tioi” (Vilela, 2017). Esta interferencia se puede entender como una forma de bloqueo, las enzimas que se conjugan con la plata pierden su funcionalidad, de manera que en cuestión de horas, gran parte de las funciones básicas de la bacteria se ven frenadas e incluso impedidas y el tercero por la generación de especies reactivas de oxígeno que generan estrés oxidativo y posterior, la muerte celular (Betancour *et al.*, 2016).

2.7 Técnicas de caracterización para nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas es parte vital de la determinación de la pureza de forma, tamaño y morfología, entorno atómico y carga superficial de las nanopartículas. Se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas, dentro de las cuales destacan: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectrofotometría UV visible, Dispersión de Luz Dinámica (DLS), entre otras (Chouhan, 2018).

2.7.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Fundamento: Un microscopio de transmisión de electrones utiliza un haz de electrones de alta energía (80-300keV) con una longitud de onda comprendida entre 0.001 y 0.1 nm (Sánchez, 2017). Los electrones impactan la muestra y la imagen correspondiente se obtiene a través de la recolección de los electrones resultantes de este impacto. La imagen de alta resolución obtenida es aumentada y proyectada mediante una pantalla fluorescente para su visualización en tiempo real, registrándose digitalmente las microfotografías (CENCINAT, 2019).

La microscopía electrónica de transmisión es considerada actualmente como una de las herramientas más poderosas para la obtención de imágenes de nanopartículas, para así obtener el tamaño y la morfología de estas.

Esta técnica consiste en acelerar los electrones a un rango entre 100 KeV y 1 MeV. Los electrones pasan a través de una muestra delgada por medio de una lente condensadora. Al cruzar la muestra los electrones pueden ser o no desviados por las vacancias en la red cristalina, de esta manera es posible obtener el patrón de difracción de la muestra, incluso para una sola NP. Así se tiene la posibilidad de estudiar los cambios en la cristalografía de partículas con un tamaño diferente. La mayor ventaja del TEM es su alta magnificación, que va de 50 a 10^6 , así como su habilidad para proporcionar tanto la imagen como la información de difracción de una sola NP, simplemente cambiando la potencia de la lente condensadora. Otra ventaja es que el TEM permite trabajar con muestras gruesas debido a la alta capacidad de penetración de sus electrones (Fernández, 2013).

En un microscopio de transmisión de electrones, los electrones impactan la muestra y la imagen correspondiente se obtiene a través de la recolección de los electrones resultantes de este impacto. La imagen de alta resolución obtenida es aumentada y proyectada mediante una pantalla fluorescente para su visualización en tiempo real, registrándose digitalmente las microfotografías (CENCINAT, 2019).

2.7.2 Espectrofotometría UV visible

Fundamento: Con espectroscopia UV-Vis, la luz de UV-Vis se pasa a través de una muestra y se mide la transmitancia de la luz a través de esta. Se obtiene un espectro de absorbancia que muestra la absorbancia de un compuesto en diferentes longitudes de onda. La cantidad de la absorbancia a cualquier longitud de onda es debido a la estructura química de la molécula (Faraldos y Goberna, 2011).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (Díaz *et al.*, 2000).

En el caso de nanopartículas de plata el pico del plasmon aparece a una longitud de onda alrededor de los 400 nm y su posición exacta depende del diámetro, de la forma y de la distribución de tamaños de las nanopartículas (Wong, 2005).

2.7.3 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Fundamento: El detector DLS mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada debido al movimiento browniano de las partículas. Dentro del instrumento hay un componente llamado correlador, que mide el grado de similitud entre dos señales a lo largo de un período de tiempo. Así se establece una función de correlación dependiente de la velocidad de movimiento browniano de las nanopartículas, que se relaciona con el tamaño de las partículas mediante la Ecuación de Stokes Einstein (Santoja, 2019).

La técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) es usada para la determinación del tamaño promedio de partícula y de la distribución de tamaños, para partículas disueltas o suspendidas en un líquido. La determinación de tamaños es en el intervalo de 2 nm hasta 2 micras. Esta técnica se basa en el “Efecto Doppler”. Esto significa que cuando la luz láser incide en un medio conteniendo partículas que se mueven, la frecuencia de la luz dispersada por estas partículas en movimiento, se corre un poco; este corrimiento depende de la velocidad de la partícula, la cual depende de su tamaño.

La intensidad de la luz dispersada por nanopartículas es proporcional al cuadrado de la masa molecular, o sea es proporcional a la sexta potencia del tamaño (diámetro) de las partículas. Esto quiere decir que las partículas grandes dispersan mucho más que las pequeñas (Hackley, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y reactivos

3.1.1 Preparación de extractos acuosos de cáscara de nuez

Tabla 3. Materiales y reactivos para preparación de extractos

Material	Reactivos	Equipos
Matraz bola de dos bocas 500 mL	Polvo de cáscara de nuez	Bomba de recirculación de agua marca Mc Millan modelo PG6500 1/40 hp 3000 rpm 220 V.
Condensador	Agua destilada	Parrilla de agitación y calentamiento marca IKA, modelo C-MAG HS7
Agitador magnético		Balanza analítica marca AND modelo HR-200
Termómetro		
Vidrio de reloj y espátula		
Papel filtro Whatman #42, 123 mm		
Embudo de vidrio		
Matraz Erlenmeyer 500 mL		
Anillo y soporte universal		
Pinzas de laboratorio		

3.1.2 Determinación de proteínas totales

Tabla 4. Materiales y reactivos para determinación de proteínas

Etapa	Material	Reactivos	Equipos
Digestión	Matraz Kjeldahl de 800 mL	Extractos acuosos de cáscara de nuez	Extractor kjeldahl
	Piedras de Ebullición	Mezcla digestora de selenio	
		Ácido sulfúrico concentrado	
Destilación	Matraz Kjeldahl con muestra previamente digerida	Agua Destilada	Destilador
	Matraz Erlenmeyer de 500 mL	Hidróxido de sodio	
		Zinc de granalla	
		Ácido bórico	
Titulación	Matraz Erlenmeyer con muestra destilada	Ácido sulfúrico	
	Pinza para bureta		
	Bureta		
	Soporte Universal		

3.1.3 Determinación de azúcares totales

Tabla 5. Materiales y reactivos para determinación de azúcares

Material	Reactivos	Equipos
Tubos de ensaye de 10 mL	Extractos acuosos de cáscara de nuez	Espectrofotómetro
Micropipeta	Agua destilada	
Gradilla	Fenol al 5%	
	Ácido sulfúrico concentrado	

3.1.4 Determinación de actividad antioxidante: ABTS

Tabla 6. Materiales y reactivos para prueba ABTS

Material	Reactivos	Equipos
Tubos falcon	Extractos acuosos de cáscara de nuez	Balanza Analítica Marca AND HR-200 Max=210 g d=0.1 mg
Matraz de aforación de 50 mL	Reactivo ABTS	Espectrofotómetro Marca Thermo Spectronic, Modelo: BioMate3
Vaso de precipitado de 100 mL	Persulfato de potasio	
Tubos eppendorf	Metanol al 80%	
Micropipeta	Agua destilada	

3.1.5 Determinación de actividad antioxidante: DPPH

Tabla 7. Materiales y reactivos para prueba DPPH

Material	Reactivos	Equipos
Vaso de precipitado de 100 mL	Extractos acuosos de cáscara de nuez	Balanza Analítica Marca AND HR-200 Max=210 g d=0.1 mg
Tubos eppendorf	Reactivo DPPH	Espectrofotómetro Marca Thermo Spectronic, Modelo: BioMate3
Micropipeta	Metanol al 80%	
	Agua destilada	

3.1.6 Determinación de actividad antioxidante: FRAP

Tabla 8. Materiales y Reactivos para prueba FRAP

Material	Reactivos	Equipos
Vaso de precipitado de 100 mL	Extractos acuosos de cáscara de nuez	Balanza Analítica Marca AND HR-200 Max=210 g d=0.1 mg
Vaso de precipitado de 200 mL	Acetato de sodio trihidratado	Espectrofotómetro Marca Thermo Spectronic, Modelo: BioMate3
Matraz de aforación de 100 mL	Ácido acético	Incubadora
Micropipeta	Reactivo TPTZ 10 mM	
Tubos eppendorf	Ácido clorhídrico 40 mM	
	Cloruro de hierro deshidratado	
	Agua destilada	

3.1.7 Biosíntesis de nanopartículas de plata

Tabla 9. Materiales y reactivos para biosíntesis de nanopartículas de plata

Material	Reactivos	Equipos
Probeta de 100 mL	Extractos acuosos de cáscara de nuez	Bomba de recirculación de agua marca Mc Millan modelo PG6500 1/40 hp 3000 rpm 220 V.
Probeta de 10 mL	Nitrato de plata 99.5% de pureza	Parrilla de agitación y calentamiento marca IKA, modelo C-MAG HS7
Matraz bola de 2 bocas de 500 mL	Agua destilada	Balanza analítica marca AND modelo HR-200
Matraz de aforación de 100 mL		
Condensador		
Termómetro		
Tapón de goma		
Pinzas de laboratorio		
Soporte universal		
Mangueras		
Agitador magnético		

3.1.8 Actividad Antimicrobiana

Tabla 10. Materiales y reactivos para actividad antimicrobiana

Material	Reactivos	Equipos
Papel filtro	Soluciones de nanopartículas	Campana de flujo laminar
Hisopo	Cultivo de bacterias: <i>S.aureus</i> <i>S.typhi</i> <i>P.miriabilis</i>	Incubadora
Cajas Petri	Solución salina	
	Agar sangre	
	Agar Mueller Hinton	

3.2 Establecimiento del experimento

El trabajo experimental de acondicionamiento de la cáscara y caracterización de nanopartículas se llevó a cabo en el Laboratorio de Síntesis de Nanomateriales perteneciente al Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coahuila, México. La preparación de extractos, la biosíntesis de nanopartículas de plata y el posterior análisis de determinación de proteínas y azúcares totales de los extractos obtenidos, fue elaborada en el laboratorio de Bioquímica dentro del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) campus Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Los análisis de actividad antioxidante por los métodos: ABTS, DPPH y FRAP, de cada uno de los extractos de cáscara de nuez, fueron llevados a cabo dentro del laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del departamento de Fitomejoramiento en la UAAAN.

3.3 Acondicionamiento de la cáscara

La nuez seca fue obtenida de la ciudad de Parras, Coahuila, posteriormente, se comenzó por separar la cáscara de la nuez seca del fruto para su posterior molienda en un molino micropulverizador de bolas marca Fritsch modelo Pulverisette 6. La siguiente etapa de la investigación fue efectuada en el Laboratorio de Bioquímica UAAAN, en la cual, el polvo obtenido de la molienda, fue pasado por tamices Tyler número 60, con abertura de 250 μm (Núñez, 2008) hasta obtener un polvo fino, eliminando las partículas más grandes.

3.4 Preparación de extractos

Se prepararon diferentes extractos (S1, S2 y S3) acuosos teniendo como variable de reacción el tiempo en 4, 8 y 12h, respectivamente. Para la preparación de estos extractos se utilizó en cada uno, 2 g del polvo de cáscara de nuez de 250 μm previamente obtenido y se colocaron en un matraz bola de dos bocas provisto de un agitador magnético, termómetro y un refrigerante conectado a una bomba de recirculación. Posteriormente, se le añadieron 200 mL de agua destilada (DH_2O), y se llevó a una temperatura a 80°C a reflujo constante. Al concluir el tiempo de reacción se filtró con ayuda del papel filtro y un embudo, se recolectó el extracto en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. El extracto se colocó en un recipiente de plástico, se etiquetó y refrigeró a 4°C hasta su uso. Se realizaron 2 repeticiones de cada experimento. Los extractos obtenidos fueron utilizados como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de plata.

Tabla 11. Condiciones de reacción para cada extracto

Extracto	Tiempo de reacción (h)
S1	4
S2	8
S3	12

3.5 Análisis de extractos

3.5.1 Determinación de proteínas totales

Fundamento: El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. El contenido en proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para la muestra que está siendo analizando. Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión, destilación y valoración/titulación. En la etapa de digestión, un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ion amonio. En la destilación, se alcaliniza la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de amoniaco. El amoniaco destilado se recoge sobre una disolución de ácido bórico. Finalmente, en la etapa de titulación, la cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ión borato, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoniaco destilados (García y Fernández, 2012).

Se analizó cada extracto para determinar el contenido de proteínas, por el método Kjeldahl, siguiendo la metodología reportada por García y Fernández (2012).

Se añadió una muestra de 2 g de polvo de cáscara de nuez con su repetición, para evaluar las diferencias entre los extractos líquidos y el polvo de cáscara de nuez sólido. Para la etapa de digestión, se utilizó un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de una mezcla digestora de selenio como catalizador. La muestra se colocó en el digestor aproximadamente 40 min, hasta obtener una mezcla transparente y posteriormente se dejó enfriar. Para la etapa de destilación, se alcalinizó la muestra con hidróxido de sodio y se colocó a destilar durante 1 h, recolectando el amoniaco sobre una disolución de ácido bórico con un indicador. Finalmente, se tituló la muestra con ácido sulfúrico concentrado, hasta obtener un viraje de color azul tenue a un rosa claro.

3.5.2 Determinación de azúcares totales

Fundamento: En la técnica fenol-ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales, la adición de algunos ácidos minerales a las soluciones acuosas de carbohidratos, como el ácido sulfúrico, provoca la deshidratación de los carbohidratos con la eliminación de tres moles de agua. Con esta reacción se forman derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF). La presencia del fenol y su interacción con el HMF facilita la formación de complejos que permiten la coloración de la solución y en consecuencia facilitan la cuantificación de los carbohidratos a través de la espectrofotometría (López *et al.*, 2017).

Para determinar la cantidad de azúcares totales presentes en los extractos, se realizó la técnica Fenol-Ácido Sulfúrico, siguiendo la metodología reportada por Rao y Pattabiraman (1989), con la modificación siguiente: en vez de enfriar la reacción hasta 15°C, se dejó reposar durante 1 h para que bajara su temperatura de forma gradual. Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra en Espectrofotómetro Marca Thermo Spectronic Modelo BioMate3, a 490 nm de longitud de onda, utilizando celdilla de cuarzo.

3.5.3 Actividad antioxidante de extractos

3.5.3.1 ABTS

Fundamento: Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS⁺, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones, es un ensayo colorimétrico en el que el radical ABTS⁺ decolora en la presencia de antioxidantes. El radical catiónico ABTS⁺ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6- sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Las mediciones se realizan a una longitud de onda de 734 nm (Mesa *et al.*, 2015).

El reactivo se preparó según lo reportado por López *et al.*, (2015). La capacidad antioxidante de ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) se llevó a cabo utilizando una solución de trabajo obtenida mezclando 1 ml de ABTS al 7.4 mM y 1 ml de $K_2S_2O_8$ al 2.6 mM, permitiéndoles reaccionar durante 12 h en oscuridad. Después, la absorbancia de la solución de trabajo se ajustó a 0.7 a 734 nm diluyendo con metanol. El ensayo ABTS se realizó mezclando 50 μ l del extracto fenólico con 1.5 ml de solución de trabajo ABTS. La reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad y se midió la absorbancia.

3.5.3.2 DPPH

Fundamento: Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determina el grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH. La técnica DPPH (2,2 - difenil-1-picrilhidracilo) se basa en la premisa de que un hidrógeno donante es un antioxidante. Este ensayo colorimétrico utiliza el DPPH radical, que cambia de púrpura a amarillo en presencia de antioxidantes (Mesa *et al.*, 2015).

El ensayo se realizó siguiendo la metodología reportada por López *et al.*, (2015). La capacidad antioxidante de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) se evaluó utilizando una solución de trabajo 60 μ M en metanol al 80%, con una absorbancia ajustada a 0.7 a 517 nm. El ensayo se llevó a cabo mezclando 50 μ l del extracto fenólico con 1.5 ml de la solución de trabajo DPPH, la reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad y se determinó la absorbancia.

3.5.3.3 FRAP

Fundamento: Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Mesa *et al.*, 2015).

La capacidad antioxidante de FRAP (poder antioxidante reductor férrico) se realizó de acuerdo con López *et al.*, (2015). FRAP se determinó utilizando una solución de trabajo obtenida mezclando 300mM de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 3.6), 10mM TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine, en HCl 40 mM) y 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en proporción 10: 1: 1. El ensayo de FRAP se realizó mezclando 50 μl de extracto fenólico con 1.5 ml de solución de trabajo FRAP, se dejó la reacción durante 30min en la oscuridad a 37 °C, y la absorbancia se midió a 593 nm.

3.6 Biosíntesis de nanopartículas de plata

3.6.1 Preparación de soluciones de nitrato de plata

Se prepararon tres soluciones distintas de nitrato de plata, a concentraciones de 1mM, 2 mM y 4 mM, las cuales fueron utilizadas como la fuente de iones metálicos para la posterior síntesis de nanopartículas de plata.

3.6.2 Reacciones del extracto con soluciones de nitrato de plata

Fundamento: Este tipo de técnica se basa en el proceso de reducción química, (ganancia de electrones o disminución en el número de oxidación, de Ag^{+1} a Ag^0).

Durante la reducción de los iones de Ag, los diámetros de las nanopartículas resultantes son variables. La cantidad de agente reductor debe ser suficiente para estabilizar las AgNPs al momento en que ocurre la reacción, pero no demasiado grande como para aumentar la fuerza iónica total en la disolución y promover la agregación (Sánchez, 2017).

Utilizando las soluciones preparadas de nitrato de plata, se evaluaron diferentes condiciones de experimentación, tales como: tiempo, temperatura, concentración de AgNO₃ y del extracto filtrado (Tabla 12), determinándose así las mejores condiciones de reacción y utilizando como variable de respuesta la absorbancia de la solución en un espectro UV-Visible, siguiendo la técnica reportada según Faraldos y Goberna (2011).

Tabla 12. Condiciones de reacción para obtener soluciones de nanopartículas

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Temperatura (°C)	80	80	80	80	80	80
AgNO ₃ (mM)	1	1	2	2	4	4
Extracto filtrado (mL)	3	3	3	3	3	3

3.7 Caracterización de nanopartículas de plata

Para determinar la presencia de nanopartículas de plata y su morfología, se analizaron las muestras en el Laboratorio de Caracterización del CIQA, mediante UV visible, un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Faraldos y Goberna, 2011).

La caracterización de las nanopartículas es parte vital de la determinación de la pureza de forma, tamaño y morfología, entorno atómico y carga superficial de las nanopartículas.

3.7.1 Espectroscopia UV-vis

Para determinar la presencia de nanopartículas de plata, se analizó el espectro de absorción de las 18 soluciones obtenidas en un rango de a 400-500 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis.

3.7.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión FEI-Titan 80–300 kV(Cs=1.25 mm) operado a 300 kV para observar la morfología y evaluar el tamaño de las nanopartículas de plata. De cada solución a analizar, se colocó una pequeña gota en una rejilla de cobre especial para realizar el análisis en el microscopio, dejando secar la gota y finalmente introducirla al microscopio para apreciar la estructura obtenida.

3.7.3 Dispersión de luz (DLS)

A partir del movimiento browniano de las nanopartículas de plata en cada solución, se obtuvo la intensidad de la luz dispersada, obteniéndose la velocidad del movimiento de las partículas y con este, el tamaño de las partículas. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Nanomateriales del CIQA, Saltillo, Coahuila, con ayuda de un equipo de dispersión de luz.

3.8 Actividad Antimicrobiana

3.8.1 Preparación de los discos de AgNPs

La evaluación del efecto antimicrobiano se realizó mediante la prueba de difusión en agar y se utilizaron discos impregnados con AgNPs. Se cortaron discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro, los cuales fueron impregnados con 100 μL de la solución de AgNPs correspondiente, se dejaron secar durante 24 h y fueron almacenados hasta su uso.

3.8.2 Preparación del inóculo

Las bacterias evaluadas en esta determinación fueron *Staphylococcus aureus* (gram positiva) *Salmonella typhi* (gram negativa) y *Proteus mirabilis* (gram negativa). El ensayo se realizó por triplicado y en campana de flujo laminar para mantener el ambiente estéril. Se tomó con hisopo una muestra de un cultivo de 24 h de cada bacteria y se colocó en solución salina. Posteriormente, se ajustó al 0.5 de McFarland, la cual corresponde a 1.5×10^8 UFC/mL, mediante mediciones en un espectrofotómetro y utilizando un estándar previamente preparado.

3.8.3 Determinación de sensibilidad bacteriana

Se extendió la suspensión bacteriana previamente ajustada a 0.5 de McFarland en 3 planos sobre la superficie de la placa de agar sangre (AS) para *S. aureus* y Mueller Hinton (MH), para las cepas restantes, usando un hisopo de algodón. Se colocaron como controles negativos discos de papel filtro sin nanopartículas. Los discos impregnados con AgNP, se colocaron sobre el agar inoculado con al menos 3 cm de separación una de otra y no más de 5 discos por placa de agar, como lo marca el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Las placas con agar se mantuvieron en incubadora en un ambiente aeróbico a 37°C, de 18 a 24 horas. Finalmente, se registraron los halos de inhibición en cada tratamiento.

3.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada una de las pruebas realizadas a los extractos acuosos, se utilizó un diseño experimental completamente al azar, empleando la técnica de análisis de varianza (ANOVA) de uno y dos factores en su caso, con prueba de distribución F y un valor de alpha de 0.05.

Posteriormente, al encontrar diferencias significativas entre tratamientos, es decir, sólo en los casos en que se rechazó la hipótesis nula, se realizó una comparación de medias con la prueba Tukey, utilizando un alpha de 0.05, permitiendo identificar el tratamiento que está creando diferencias. La prueba Tukey fue realizada con el software Real statistics en Excel 2010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de extractos acuosos de cáscara de nuez

Se obtuvieron 3 diferentes extractos con dos repeticiones cada uno (figura 3), fueron etiquetados y almacenados a 4°C hasta su uso.



Figura 3. Extractos acuosos de cáscara de nuez pecanera

4.2 Análisis de extractos de cáscara de nuez

4.2.1 Determinación de Proteínas Totales

Se evaluó cada extracto con su repetición, y se agregó la evaluación de 1 g de polvo de cáscara de nuez molida utilizada para la preparación de los extractos, con dos repeticiones.

La coloración final de las muestras destiladas en todos los extractos fue de un color rosa claro, y para el polvo de cáscara de nuez fue color azul tenue (figura 4).



Figura 4. Coloración de muestras destiladas.

Se obtuvieron los mililitros de ácido sulfúrico gastados para cada extracto con su repetición, se sacó un promedio y siguiendo las ecuaciones 1 y 2 se obtienen los siguientes resultados para cada extracto (tabla 13).

$$\%N = \left(\frac{((ml \text{ ácido gastados} * N \text{ ácido}) - (ml \text{ blanco gastados} * N \text{ blanco})) \left(\frac{Meq}{g} \right)}{ml \text{ o gr muestra}} \right) * 100$$

Ecuación 1. Cálculo de porcentaje de nitrógeno

Dónde:

Meq/g= 0.014

$$\%Proteína = \%N * 6.25$$

Ecuación 2. Cálculo de porcentaje de proteína

Tabla 13. Porcentaje de nitrógeno y proteínas totales en cada extracto acuoso de cáscara de nuez

Muestra	%Nitrógeno	%Proteína
S1	0.0284	0.1776
S2	0.0415	0.2596
S3	0.0284	0.1776
Polvo	0.4292	2.6829

Los resultados muestran un mayor contenido de proteínas en la muestra de polvo de cáscara de nuez, y comparando los extractos, se obtiene una mayor cantidad de proteínas en el extracto dos, donde el tiempo de reacción fue de 8 h.

Analizando como variable dependiente el porcentaje de proteína de cada extracto acuoso (S1, S2, S3) y del polvo obtenido de la cáscara de nuez, se estableció la hipótesis nula (H_0), la cual refleja la suposición de que las medias de los porcentajes de proteína son iguales para cada extracto. Mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con prueba de distribución F, tomando como nivel de significación $\alpha = 0.05$, se rechaza la H_0 , puesto que, $F_{prueba} > F_{crítico}$ ($820.51 > 6.591$), demostrando que entre los extractos existen diferencias significativas (tabla 14).

Tabla 14. Análisis de varianza con prueba de distribución F entre porcentajes de proteínas obtenidos en cada extracto.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	F _{prueba}	Probabilidad	F _{crítica}
Entre grupos	9.219	3	3.073	820.512	4.932	6.591
Dentro de los grupos	0.015	4	0.004			
Total	9.234	7	1.319			

Mediante comparación de medias con prueba Tukey, se demuestra que las diferencias significativas existen sólo en la muestra del Polvo ($P < 0.05$). Estadísticamente, no influye en el porcentaje de proteína el aumentar el tiempo de reacción al elaborar los extractos, sino que baja el contenido de proteína cuando se realiza un extracto acuoso y no se usa el polvo sólido directamente.

4.2.2 Determinación de azúcares totales

Se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm de cada extracto realizando 3 repeticiones de R₁ y 3 repeticiones de R₂, realizando de todos los extractos diluciones 1:10 con agua destilada.

Según la curva de calibración de azúcares, se obtuvieron los siguientes resultados para cada muestra (tabla 15).

Tabla 15. Determinación de mg/L de azúcares contenidos en cada muestra

Muestra	Ppm (mg/L)
S1	1761.33
S2	1688.00
S3	1671.33

Con los resultados obtenidos, es posible analizar que conforme aumenta el tiempo de reacción de los extractos, disminuye la concentración de azúcares en las muestras, es posible que la exposición durante más tiempo a una temperatura de 80°C, resulte en la degradación de azúcares.

Analizando como variable dependiente las ppm de azúcares en cada extracto acuoso (S1, S2, S3) se estableció la hipótesis nula (H_0), la cual refleja la suposición de que las medias de las ppm de azúcares son iguales para cada extracto. Mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con prueba de distribución F, tomando como nivel de significación $\alpha = 0.05$, se acepta la H_0 , puesto que, $F_{prueba} < F_{crítico}$ ($0.696 < 9,552$), demostrando que entre los valores de las medias no existen diferencias significativas (tabla 16). Al rechazar la hipótesis nula, no fue necesario realizar la prueba Tukey.

Tabla 16. Análisis de varianza con prueba de distribución F entre ppm de azúcares obtenidos en cada extracto.

Origen de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F_{prueba}	Probabilidad	$F_{crítica}$
Entre grupos	9171.207	2	4585.604	0.696	0.565	9.552
Dentro de los grupos	19777.022	3	6592.341			
Total	28948.230	5	5789.646			

Con el análisis ANOVA, es posible determinar que al incrementar el tiempo de reacción de los extractos, no cambia significativamente el contenido de azúcares en ellos.

4.2.3 Actividad antioxidante

ABTS, DPPH y FRAP

Se obtuvo la absorbancia en espectrofotómetro de cada extracto en cada técnica a 734 nm para reactivo ABTS, 517 nm para el reactivo DPPH y 593 nm para el

reactivo FRAP. Los resultados (tabla 17) se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox (TE)/100 g.

Tabla 17. Actividad antioxidante de extractos

	ABTS	DPPH	FRAP
Muestra	($\mu\text{molTE}/100\text{ g}$)		
S1	1262.60	154.90	322.42
S2	1095.60	99.73	107.42
S3	986.60	116.56	158.14

De acuerdo a los resultados de los tres métodos, es posible afirmar que el extracto obtenido en la reacción de menor tiempo (4 h) es el que presenta mayor potencial antioxidante. Villarreal et al., (2007) mencionan que las cáscaras de nuez contienen una alta capacidad antioxidante, así mismo, De la Rosa et al., (2011) determinaron compuestos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas en cáscaras de nuez pecanera. De igual manera, se observa que al incrementar el tiempo de extracción, la actividad antioxidante disminuye, puesto que se sabe que los compuestos fenólicos, encargados de la capacidad antioxidante, son sensibles a las condiciones ambientales adversas, incluyendo: temperatura, luz, pH, humedad, y oxígeno (Tonon *et al.*, 2010), por lo tanto, están propensos a degradarse durante el procesamiento y adecuación de las condiciones de reacción.

Analizando como variable dependiente los micromolTE/100 g de cada extracto acuoso (S1, S2, S3) se estableció la hipótesis nula (H_0), la cual refleja la suposición de que las medias en micromoles equivalentes de Trolox (TE)/100 g son iguales para cada extracto. Mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, con prueba de distribución F, tomando como nivel de significación $\alpha=0.05$, se acepta para los extractos, la H_0 , puesto que, $F_{\text{prueba}} < F_{\text{crítico}}$ ($5.033 < 6.944$), demostrando que entre los extractos, no existen diferencias significativas. Y se analiza que, entre las pruebas si existen diferencias significativas, ya que $F_{\text{prueba}} > F_{\text{crítico}}$ ($196.68 > 6.94$) (tabla 18).

Tabla 18. Análisis de varianza con prueba de distribución F entre $\mu\text{molTE}/100\text{ g}$ obtenidos en cada extracto.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F _{prueba}	Probabilidad	F _{crítica}
Extracto	46879.202	2	23439.601	5.033	0.0809	6.944
Tipo de Prueba	1832156.761	2	916078.380	196.686	0.0001	6.944
Error	18630.255	4	4657.564			
Total	1897666.218	8				

Mediante comparación de medias con prueba Tukey, se demuestra que las diferencias significativas se encuentran entre la prueba ABTS y DPPH, y entre ABTS Y FRAP ($P < 0.05$). Se demuestra que al incrementar el tiempo de reacción de los extractos, no existe una diferencia estadísticamente significativa, sino que es el radical ABTS el que influye en la variación de los $\mu\text{molTE}/100\text{ g}$ de cada extracto, presentándose mayor actividad antioxidante al utilizar dicho radical.

4.3 Biosíntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata fueron obtenidas utilizando el método de reducción química, es posible observar la presencia de las nanopartículas a simple vista por el cambio de coloración de la mezcla, antes y después de la reacción, resultando una ligera coloración amarilla antes de la reacción, y un marrón oscuro después de esta, como se muestra en la figura 5.



Figura 5. Color de la mezcla antes (izquierda) y después (derecha) de la reacción.

Vijayakumar *et al.*, (2013) explican que la reducción del nitrato de plata en AgNPs durante la exposición al extracto acuoso, es seguido por un aumento gradual en el desarrollo del color marrón claro, a marrón amarillento, como resultado del fenómeno de la excitación colectiva de electrones de conducción de las nanopartículas llamados plasmones de superficie localizado, los cuales absorben determinadas frecuencias de la luz incidente y transmiten las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color.

Se obtuvieron en total, 18 soluciones de nanopartículas de plata, todas con una coloración marrón oscura (figura 6) y se colocaron en frascos de vidrio pequeños, se etiquetaron (tabla 19) y se conservaron en oscuridad a 4°C para su posterior caracterización.

Tabla 19. Etiquetas de muestras de nanopartículas de plata

Experimento (E)	Concentración AgNO ₃	Repetición	Extracto
1	1 mM	R1	S1 (4 h)
		R2	S2 (8 h)
			S3 (12 h)
2	2 mM	R1	S1 (4 h)
		R2	S2 (8 h)
			S3 (12 h)
3	4 mM	R1	S1 (4 h)
		R2	S2 (8 h)
			S3 (12 h)



Figura 6. Soluciones de nanopartículas de plata obtenidas

4.4 Caracterización de nanopartículas de plata

4.4.1 Espectrofotometría UV Visible

Los resultados muestran la presencia de nanopartículas de plata a un espectro entre 425 y 490 nm. En la figura 7 se muestra la gráfica correspondiente a la longitud de onda y absorbancia obtenida para cada muestra. Obteniéndose un pico de longitud de onda de 416 nm con una absorbancia máxima de 3.69, en la muestra E1R1S2 (Concentración 1mM AgNO_3) y un pico de 425.57 nm con una absorbancia mínima de 0.7950 en la muestra E3R1S3 (Concentración 4mM AgNO_3).

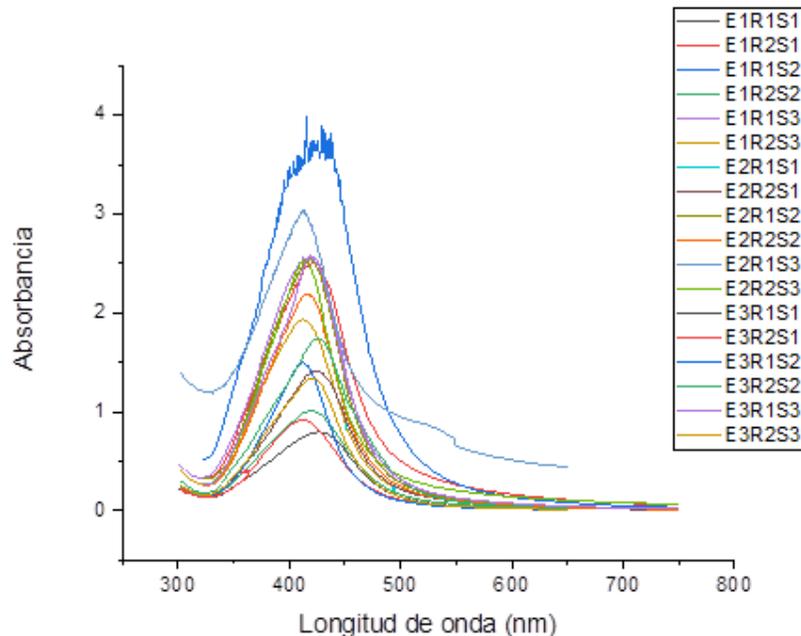


Figura 7. Longitudes de onda de las nanopartículas de plata en solución obtenidas a diferentes condiciones de reacción

Todas las muestras contienen la presencia de nanopartículas de plata ya que se encuentran dentro del rango de longitud de onda característico de dichas nanopartículas. Wong *et al.*, (2000) señalan que, en el caso de nanopartículas de plata el pico del plasmon aparece a una longitud de onda alrededor de los 400-450 nm y su posición exacta depende del diámetro, de la forma y de la distribución de tamaños de las nanopartículas.

4.4.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías obtenidas de las nanopartículas, reportan que estas poseen una morfología semiesférica (figura 8, 9, 10). Las nanopartículas obtenidas a una concentración mayor de AgNO_3 , presentaron mayor agregación entre ellas (figura 10). Se observa claramente que, al incrementar la concentración de nitrato de plata, disminuye el tamaño de partícula, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante DLS (ver sección 4.4.3).

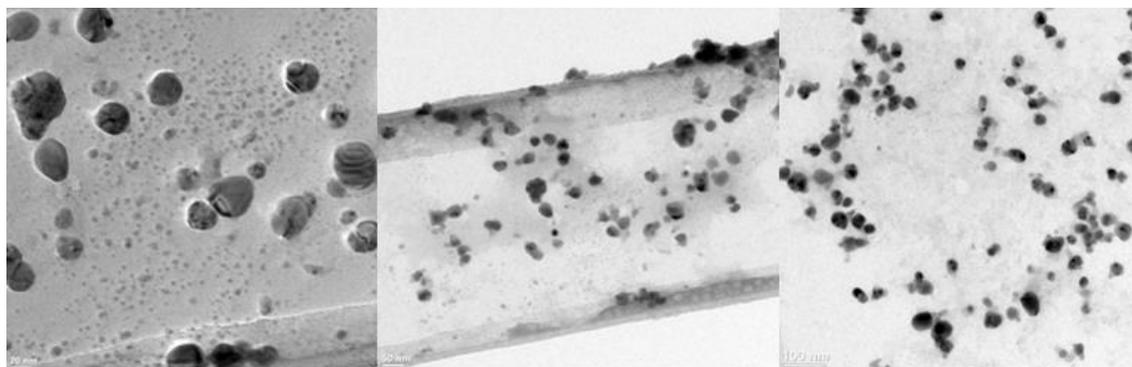


Figura 8. Nanopartículas de plata obtenidas en muestra E1R2S2 (Concentración AgNO_3 de 1mM) Izquierda: Escala 20 nm, Centro: 50 nm, Derecha: 100 nm.

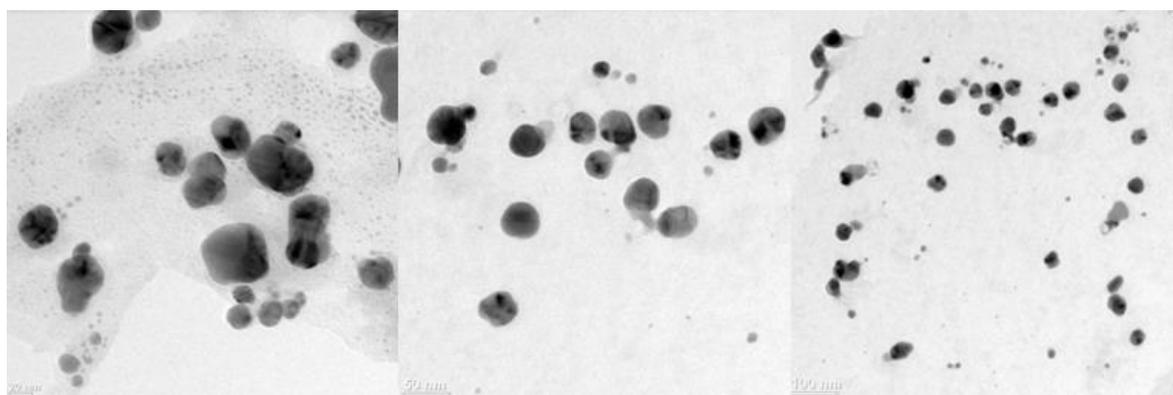


Figura 9. Nanopartículas de plata obtenidas en muestra E2R2S1 (Concentración AgNO_3 de 2mM) Izquierda: Escala 20 nm, Centro: 50 nm, Derecha: 100 nm.

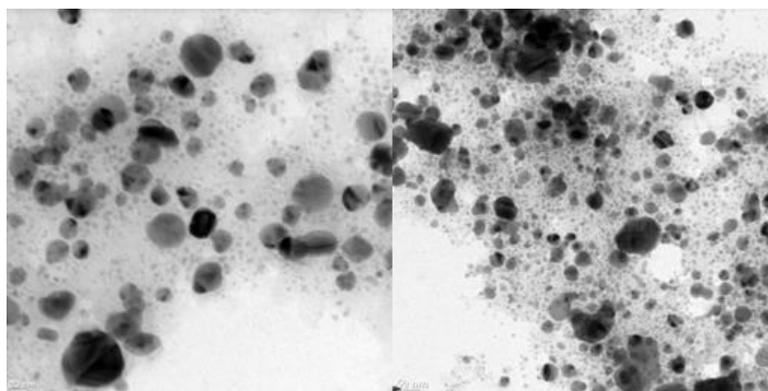


Figura 10. Nanopartículas de plata obtenidas en muestra E3R1S1 (Concentración AgNO_3 de 4mM) Izquierda: 20 nm, Derecha: 50 nm

4.4.3 Dispersión de luz (DLS)

En la tabla 20 se muestran los diámetros promedios de las nanopartículas obtenidas bajo diferentes condiciones de reacción. Tomando en cuenta que, en el experimento número uno (E1) se utilizó una concentración de 1mM de AgNO_3 , en el E2, una concentración de 2 mM y en el E3 una de 4mM, se observó que al incrementar la concentración de AgNO_3 , disminuyó el tamaño de las nanopartículas. González y Rosas (2016) atribuyen esto a un crecimiento por nucleación secundaria que es característico cuando los reactivos se agotan y las condiciones de sobresaturación disminuyen hacia el equilibrio, el tamaño del núcleo crece y las partículas pequeñas crecen rápidamente vía este proceso. Es decir, a una concentración menor (1mM) de AgNO_3 , se agota rápidamente el reactivo y las nanopartículas serán de mayor tamaño debido a un crecimiento por nucleación secundaria.

Tabla 20. Diámetros de nanopartículas obtenidos mediante la técnica DLS

Muestra	Diámetro (nm)	Muestra	Diámetro (nm)	Muestra	Diámetro (nm)
E1S1	93.4	E2S1	64.1	E3S1	50.9
E1S2	56.2	E2S2	64.6	E3S2	96.7
E1S3	91.7	E2S3	86.7	E3S3	39.9
Promedio	80.4		71.8		62.5

4.5 Actividad antimicrobiana

En las figuras 11, 12 y 13, se pueden observar los halos resultantes en cada agar, con las bacterias probadas para las diferentes soluciones de NPs de plata.

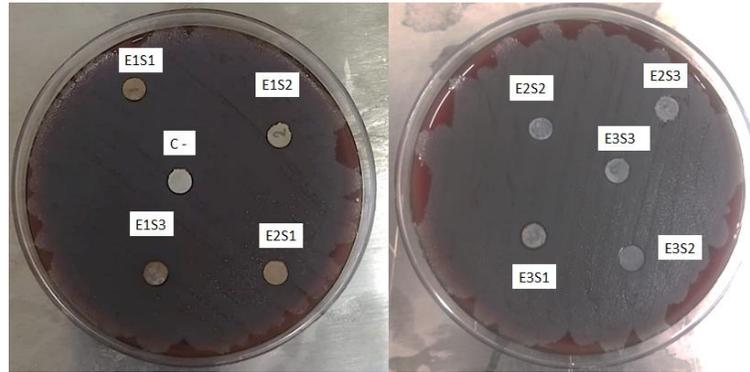


Figura 11. Halos de inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* en Agar sangre de las NPs de plata obtenidas a diferentes condiciones de reacción.

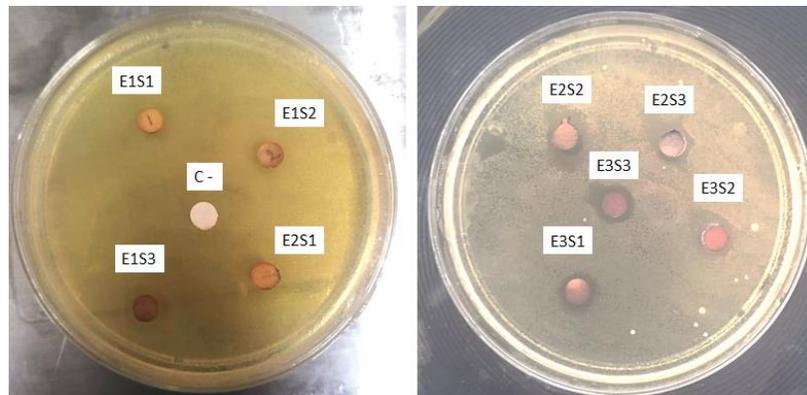


Figura 12. Halos de inhibición de la bacteria *Salmonella thyphi* en Agar Mueller Hinton de las NPs de plata obtenidas a diferentes condiciones de reacción.

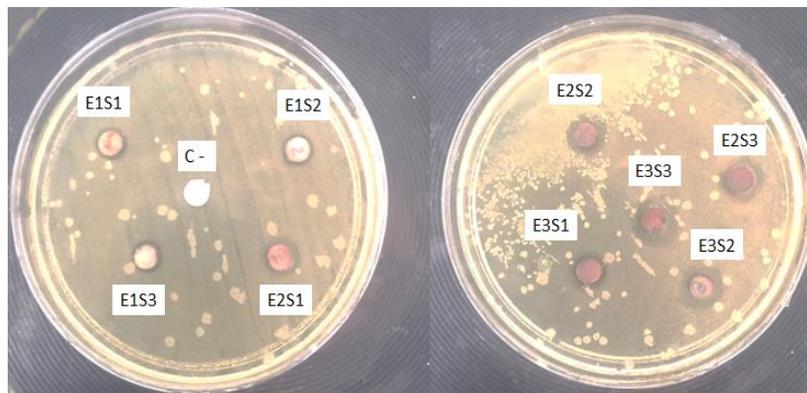


Figura 13. Halos de inhibición de la bacteria *Proteus mirabilis* en Agar Mueller Hinton las NPs de plata obtenidas a diferentes condiciones de reacción.

Se obtuvo el promedio del halo de inhibición medido en milímetros, de las tres repeticiones para cada tratamiento (tabla 21).

Tabla 21. Halos de inhibición en mm.

Muestra	Halo (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>Proteus</i>
E1S1	0.00	3.17	1.67
E1S2	0.00	2.83	1.67
E1S3	0.00	2.83	1.33
E2S1	0.00	3.67	3.00
E2S2	0.00	3.67	3.00
E2S3	0.00	5.67	3.33
E3S1	0.67	5.33	3.33
E3S2	1.00	4.67	4.00
E3S3	1.00	4.67	3.67

De esta tabla, se puede observar que las nanopartículas de plata obtenidas, funcionan mejor como agentes antimicrobianos frente a las bacterias gram (-) *S. Typhi* y *Proteus*. Además se aprecia que no se obtuvo inhibición en el experimento 1 y 2 frente a *S. aureus*, lo que destaca que la concentración de partículas no es la adecuada para inhibir el crecimiento de esta bacteria. Las diferencias en los halos de inhibición de las bacterias gram positivas (*S. aureus*) y las bacterias gram negativas (*S. Typhi* y *proteus*) son debidas a las diferencias estructurales en su pared celular, su fisiología celular, metabolismo o el grado de contacto (Emami, 2011). Los mejores resultados se obtuvieron con los experimentos 2 y 3, es decir a concentraciones de AgNO_3 mayores, destacándose la solución 3 (concentración de 4 mM de AgNO_3). Las nanopartículas de plata se pueden adherir a la membrana celular de las células, alterando la permeabilidad celular y funciones respiratorias de la célula. Es posible que dichas nanopartículas no sólo interactúen con la superficie de la membrana, sino que también penetren al interior de la bacteria (Gómez, 2013).

Analizando como variable dependiente el halo en mm, se estableció la hipótesis nula (H_0), la cual refleja la suposición de que las medias son iguales para cada extracto. Mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, con prueba de distribución F, tomando como nivel de significación $\alpha= 0.05$, se rechaza para el tipo de Experimento (E1, E2 Y E3) la H_0 , puesto que, $F_{prueba}>F_{crítico}$ ($5.974>2.591$), demostrando que entre los experimentos existen diferencias significativas. También se analiza que entre el tipo de bacterias utilizadas existen diferencias significativas, ya que $F_{prueba}>F_{crítico}$ ($114.802>3.634$) (tabla 22).

Tabla 22. Análisis de varianza con prueba de distribución F entre halos de inhibición obtenidos en cada agar.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F_{prueba}	Probabilidad	$F_{crítica}$
Experimento	13.693	8	1.712	5.974	0.0012	2.591
Tipo de bacteria	65.787	2	32.894	114.802	3.244	3.634
Error	4.584	16	0.287			
Total	84.064	26				

Mediante comparación de medias con prueba Tukey, se demuestra que las diferencias significativas entre los experimentos se encuentran entre el E1 y E3 ($P<0.05$), demostrándose estadísticamente que, al incrementar la concentración de Nitrato de Plata, existe mayor actividad antimicrobiana. Por otro lado, al comparar las medias de igual forma con prueba Tukey para la variable tipo de bacteria, se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de bacterias, demostrándose que, el tipo de bacteria también influye en la actividad antimicrobiana.

CONCLUSIONES

Es posible obtener NPs de plata utilizando una técnica “ecológica” a partir de extractos acuosos de cáscara de nuez pecanera. Se comprobó también que dicha cáscara, contiene polifenoles, proteínas y carbohidratos, las cuales son biomoléculas responsables de la reducción de la plata, resultando así nanopartículas semiesféricas de un diámetro promedio entre 80.4 nm y 62.5 nm el cual dependió de la concentración inicial del precursor.

Al aumentar el tiempo de reacción para obtener los extractos acuosos no hubo diferencias significativas en cuanto al contenido de proteínas, azúcares, y actividad antioxidante, sin embargo, la condición óptima para la extracción eficiente de moléculas reductoras, se sugiere ser en el menor tiempo de reacción (4h), ya que no se obtienen diferencias, pero se utiliza menos energía para su obtención.

Las NPs de plata resultaron viables para la inhibición del crecimiento de dos de las tres bacterias probadas: *Salmonella Typhi* y *Proteus mirabilis*. Se demostró que a una concentración más alta de AgNO_3 , es mayor la actividad antimicrobiana. Lo anterior sugiere que las NPs metálicas de plata obtenidas en este trabajo resultan ser una alternativa para diseñar materiales antimicrobianos.

Como sugerencia para futuras investigaciones, la cantidad de agente reductor o extracto deberá ser variada para conocer el efecto de la relación extracto/ AgNO_3 para evaluar si el tamaño de la nanopartícula puede ser controlado.

Estudios actuales y futuros deben encaminarse en busca de evidencias científicas que avalen la introducción de NPs para uso humano, animal, agrícola y ambiental, enfocadas a: la optimización de tecnologías limpias, la valorización de residuos agroindustriales como fuente vegetal de moléculas reductoras, la evaluación de actividad antimicrobiana, los mecanismos de acción y finalmente, estudios toxicológicos y de bioseguridad que avalen la seguridad de toda la biodiversidad involucrada en el ciclo de su uso, así como el efecto de posibles residuos.

REFERENCIAS

- [1] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2016) Resúmenes de Salud Pública: Hidracinas. Recuperado de: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs100.html
- [2] Aguilar Tapia, A., Zanella, R. (2017). Las nanopartículas bimetálicas y algunas de sus aplicaciones. Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología, 10(19), 72-92.
- [3] Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente/Silver nanoparticles: applications and toxic risks to human health and environment. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1.
- [4] Betancur Henao., Hernández Montes., Buitrago Sierra., (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(4), 387-402.
- [5] Carrá, M., Fagali, N., Fernández Lorenzo de Mele, M. A. (2019). Síntesis de bio-nanopartículas a base de óxido de hierro mediante tecnologías ecocompatibles. In V Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería.
- [6] Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT). (2019). Microscopia electrónica de transmisión. Recuperado de: <https://www.espe-innovativa.edu.ec/cencinat/microscopia-electronica-de-transmision/>
- [7] Cheang Wong, J.C., Oliver, A., Crespo, A., Hernández, J.M., Muñoz, E., Espejel-Morales, R. (2000). Dependence of the optical properties on the ion implanted depth profiles in fused quartz after a sequential implantation with Si and Au ions. *Nucl. Instr. and Meth.*, 2000, B 161-163: 1058-1063.

- [8] Chen, X., Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, 176(1), 1-12.
- [9] Chouhan, N. (2018). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. *Silver Nanoparticles: Fabrication, Characterization and Applications*, 21.
- [10] Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). (2015). La nuez pecanera en México. Centro de Investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. Recuperado de: <https://centrosconacyt.mx/objeto/nuez-pecanera/>
- [11] De la Rosa, A. L., Parrilla, A. E., Shahidi, F. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and Shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 152- 162.
- [12] Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., ... & Fiñana, I. T. (2000). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba, España*.
- [13] Emami Karvani Z. (2011). *African Journal of Microbiology Research*. 5(12): p. 1368-1373.
- [14] Faraldos, M., Goberna, C. (2011). Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Madrid, España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- [15] Fernández, K. C. (2013). Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas (Doctoral dissertation, Tesis de D. Sc, UNAM, México)

- [16]García, E., Fernández, I. (2012). Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte. Universidad Politécnica de Valencia. Consultado el, 1(09), 2016.
- [17]Gómez, G. L. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. Investigación en discapacidad, 2(1), 18-22.
- [18]González García., Rosas Trejo (2016). Síntesis de Nanopartículas de Plata empleando el extracto de planta *Gnaphalium Conoideum Kunth*. Instituto de Investigaciones Metalúrgicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. XII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia.
- [19]Govea Salas (2017). Las asombrosas propiedades biológicas del ácido gálico. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.
- [20]Guel Jiménez L. D., Hernández, D. C. (2013). Materiales nanoestructurados cerámicos como vehículo para la liberación de principios activos. Avances en Química, 8(3), 171-177
- [21]Hackley, J. D., Clogston. (2007). Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering, NIST-NCL Joint Assay Protocol, PCC-1, Version 1.2.
- [22]Han, R. M., Zhang, J. P., Skibsted, L. H. (2012). Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. Molecules, 17(2), 2140-2160.

- [23]Hernández, M. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con opuntia sp. y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas (Maestría). *Centro de Investigación en Química Aplicada*.
- [24]Korbekandi, H., & Iravani, S. (2012). Silver nanoparticles. In *The delivery of nanoparticles*. IntechOpen.
- [25]Lopez Contreras, J. J., Zavala García, F., Urias Orona, V., Martinez Avila, G. C. G., Rojas, R., Guillermo, N. M. (2015). Chromatic, phenolic and antioxidant properties of Sorghum bicolor genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 366-370.
- [26]López Iturbe, J., Vilchis Néstor, A. R., Sánchez Mendieta, V., Avalos Borja, M. (2013). Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón. *Superficies y vacío*, 26(3), 73-78.
- [27]López Legarda, X., Taramuel Gallardo, A., Arboleda Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., Restrepo Betancur, L. F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180-198.
- [28]López, A. R. (2019). Nanopartículas y nanolaboratorios en tu propio jardín. Recuperado de: <http://www.revistaondicula.com/nanoparticulas-y-nanolaboratorios-en-tu-propio-jardin/>
- [29]López, G., Morales, R., Olea, O., Sánchez, V., Trujillo, J., Valera, V., Vilchis, A. (2013). *Nanoestructuras metálicas; síntesis, caracterización y aplicaciones*. Editorial Reverte, Universidad Autónoma del Estado de México, 1-50.

- [30]Makarov, V. V., Makarova, S.A.J., Sinitsyna, O., Dudnik, A. O., Yaminsky, I. V., Taliany, M. E., Kalinina, N. O. (2014). Biosynthesis of Stable Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* Plants. *Langmuir*, 30, 5982–5988.
- [31]Mendoza Uribe, G., Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles latinoamericanos*, 14(29), 161-186.
- [32]Mesa Vanegas, A. M., Zapata-Urbe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1-10.
- [33]Neira, I. (2015). Síntesis verde de nanopartículas para la eliminación de colorantes en medios acuosos. Universidad de Coruña, España.
- [34]NSAI. (2015) National Standards Authority of Ireland. ISO (International Organization for Standardization) ISO/TS 80004-2:2015. Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects.
- [35]Núñez, C. E. (2008). En relación a los Tamices Normalizados. Posadas, Argentina Recuperado de: <http://www.cenunez.com.ar/>
- [36]Pérez, R. O. (2017). Nanovehículos para el tratamiento de la infección bacteriana. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- [37]Poole, C. P., Owens, F. J. (2007). *Introduction to Nanotechnology*.: Wiley

- [38]Ramírez, N. N., Paz, J. F. H., Granados, J. L. S., Ambriz, M., Abdelkefi, A., Monroy, D. C. (2016). Fabricación y caracterización de nanopartículas de sílice huecas para uso en aislantes térmicos mediante un análisis factorial. *Cultura científica y tecnológica*, (57).
- [39]Rao, P., Pattabiraman, N. (1989). Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Anal Biochem.* 1989, 181 (1), 18–22.
- [40]Rojas Lema, S. P. (2016). Evaluación de las propiedades bactericidas de tejidos impregnados con nanopartículas de plata. Tesis de Licenciatura. Quito, Ecuador.
- [41]Ruiz Cañas., Quintero Pérez., Castro García., Romero Bohorquez. (2020). Use of nanoparticles to improve thermochemical resistance of synthetic polymer to enhanced oil recovery applications: a review. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 10(2), 85-97.
- [42]Sánchez Algaba, M. (2006). *Nanomateriales con aplicación en Aeronautica I*. Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, España.
- [43]Sánchez, M. (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. *España: UNED*.
- [44]Santoja García (2019). Caracterización del tamaño de nanopartículas sintéticas mediante fraccionamiento en flujo por campo de flujo asimétrico (af4) con detector de dispersión de luz dinámica (dls). Trabajo de fin de grado. Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza. Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores.

- [45] Sigma (2021). Borohidruro de Sodio. Recuperado de: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/71320?lang=es®ion=MX&gclid=Cj0KCQjw2NyFBhDoARIsAMtHtZ6HGlr93d_ZBBSH-1-HnkgjO8BRsrH0HmuRLhjEB_qu0XsMGIQlqcwaAotYEALw_wcB
- [46] Tonon, R. V., C. Brabet y M.D. Hubinger, Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents, *Food Research International*: 43(3): 907–914 (2010).
- [47] Torruela A. (2019). Aplicación de la nanotecnología en la belleza. Cluster de Materiales Avanzados. Barcelona, España.
- [48] Valencia Barrón, J. P. (2013). Síntesis y caracterización de cristales de oxicluro de bismuto por métodos hidrotermal y solvotermal en presencia de diferentes agentes estabilizantes (Tesis Maestría), Universidad Iberoamericana Ciudad de México. Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas.
- [49] Vázquez, N. D., López, R. U. (2016) Nuez pecanera en México. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ).
- [50] Vijayakumar, M., Priya, K., Nancy, F. T., Noorlidah, A., Ahmed, A. B. (2013). Biosynthesis, characterization and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products*, 41, 235-240.

- [51] Vilela. (2017). Nanopartículas de plata, el terror de las bacterias. IBEC Divulga. Recuperado de: <http://divulga.ibecbarcelona.eu/nanoparticulas-de-plata-el-terror-de-las-bacterias/>
- [52] Villafuerte Robles, L. (2009). Nanotecnología farmacéutica. Razón y palabra, 14(68), 1-20.
- [53] Villarreal-Lozoya, J. E., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L. 2007. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch] cultivars. Food Chemistry 102, 1241-1249.
- [54] Wong, J. C. (2005). Ley de Moore, nanotecnología y nanociencias: síntesis y modificación de nanopartículas mediante la implantación de iones. Revista Digital Universitaria. 6 (7) 2-10.
- [55] Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 5(1).
- [56] Záyago-Lau, E., Foladori, G. (2010). La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Economía, sociedad y territorio*, 10(32), 143-178.