



Evaluación de la actividad antibacteriana de un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*)

Borja Borja, Hyllary Rossalyn

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

PhD. Debut, Alexis Patrice Martial

28 de julio del 2022



Hborja_tesis.docx

Scanned on: 12:11 July 28, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	475
Words with Minor Changes	54
Paraphrased Words	139
Omitted Words	4607



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Evaluación de la actividad antibacteriana de un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*)**” fue realizado por la señorita **Borja Borja, Hyllary Rossalyn** el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de julio de 2022

.....

Debut, Alexis Patrice Martial PhD.

C. C.: 1725238297



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Borja Borja, Hyllary Rossalyn**, con C.C. 1723184014, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación de la actividad antibacteriana de un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*)"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de julio de 2022

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Borja Borja'.

Borja Borja, Hyllary Rossalyn

C.C.: 1723184014



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Borja Borja, Hyllary Rossalyn**, con C.C. 1723184014, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Evaluación de la actividad antibacteriana de un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de julio de 2022

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser 'Borja Borja', sobre una línea de puntos.

Borja Borja, Hyllary Rossalyn

C.C.: 1723184014

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a todas las personas que me han apoyado durante este difícil camino. A mis padres Napoleón y Rocío, quienes con su paciencia, sacrificio y gran apoyo han sido mi guía para ser una persona capaz de afrontar cada reto que me presente la vida.

También dedico este esfuerzo a mis docentes, quienes han sido un pilar fundamental en la entrega de conocimiento y han sido fuente de inspiración y perseverancia en cada paso que he dado.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por su apoyo, confianza y sacrificio dado durante todos estos años que ha permitido que yo cumpla una meta más en mi vida.

De igual forma agradezco a cada uno de mis profesores que con el conocimiento que me fue brindado por su parte me permitirá forjarme de una mejor manera en mi vida profesional.

A Alexis Debut Ph.D. y a Marbel Torres Ph.D., mi tutor y co-tutora de mi trabajo de titulación, quienes confiaron en mi para la realización de este proyecto. Agradezco mucho su aporte en mi capacitación, enseñanza y el apoyo brindado durante la realización del mismo.

A la Ing. Katherine Pazmiño, la Ing. Karla Vizuite, quienes me apoyaron durante la realización de la investigación con sus conocimientos y experiencias.

Al CENCINAT por permitirme utilizar y trabajar en sus instalaciones

Índice de Contenidos

Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Índice de Abreviaturas.....	17
Resumen.....	19
Abstract.....	20
Capítulo 1: Introducción	21
Formulación del problema	21
Justificación del problema	22
Objetivos	25
Marco Teórico	26
Nanotecnología	26
Nanopartículas de plata (AgNPs).....	27
Caracterización de AgNPs	30
Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)	30
Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	33

Difracción de Rayos X (XRD)	35
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	37
Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)	39
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	41
Mecanismo de acción antimicrobiana	42
Métodos de síntesis	47
Síntesis verde	48
Planta de Marco (<i>Ambrosia peruviana</i>)	49
Toxicidad de las nanopartículas de plata.....	51
Análisis microbiológico.....	52
<i>Escherichia coli</i>	55
<i>Staphylococcus aureus</i>	56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Método de difusión en agar con discos de Kirby-Bauer.....	60
Capítulo 2: Metodología	63
Participantes	63
Zona de estudio	63
Obtención del material vegetal	63
Trabajo de laboratorio	63
Periodo de investigación.....	63
Tratamiento del material vegetal	64
Obtención del extracto	64
Caracterización del extracto	65
Síntesis de las AgNPs	66

	10
Caracterización de las AgNPs.....	66
Espectrofotometría UV-Vis	67
Dispersión dinámica de luz (DLS)	67
Difracción de rayos X (XRD).....	68
Concentración de AgNPs	71
Formulación del jabón	72
Caracterización del jabón	73
Preparación de la técnica de difusión en agar	73
Análisis Estadístico	74
Hipótesis de investigación	74
Operatividad de las variables.....	74
Capítulo 3: Resultados y Discusión	76
Caracterización del extracto	76
Síntesis de las AgNPs	81
Caracterización de las AgNPs.....	82
Efecto del tiempo.....	82
Efecto de la cantidad de extracto	84
Efecto de la concentración de nitrato de plata	86
Efecto de la temperatura.....	88
Efecto del pH.....	90
Difracción de rayos X (XRD).....	94

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).....	95
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	99
Formulación del jabón.....	101
Caracterización del jabón	103
Actividad antimicrobiana	104
Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana	108
Capítulo 4: Conclusiones y Recomendaciones	116
Bibliografía	118
Apéndices	133

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Bacterias frente a los cuales se ha confirmado actividad biocida con AgNPs.....</i>	27
Tabla 2 <i>Parámetros analizados en la optimización de la síntesis de AgNPs.....</i>	66
Tabla 3 <i>Variables a medir durante la fase de experimentación.....</i>	75
Tabla 4 <i>Datos de la curva de calibración de quercetina</i>	76
Tabla 5 <i>Resultados de la concentración de flavonoides.....</i>	78
Tabla 6 <i>Resultados de la actividad antioxidante.....</i>	80
Tabla 7 <i>Colores observados en el mapeo elemental realizado con SEM de los elementos hallados</i>	97
Tabla 8 <i>Resultados obtenidos en el tamaño del halo de inhibición en mm.....</i>	105
Tabla 9 <i>Asignaciones dadas en el diseño factorial al tipo de microorganismo</i>	111
Tabla 10 <i>Asignaciones dadas en el diseño factorial al tipo de microorganismo</i>	111

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Imágenes TEM de diferentes formas de AgNPs</i>	30
Figura 2 <i>Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro UV- Vis</i>	31
Figura 3 <i>Esquema del espectro de luz, se incluye la luz visible y otros tipos de radiaciones....</i>	32
Figura 4 <i>Espectros de extinción (dispersión + absorción) de nanopartículas de plata con diámetros que oscilan entre 10 y 100 nm</i>	33
Figura 5 <i>Esquema de funcionamiento de un equipo DLS</i>	34
Figura 6 <i>Esquema de funcionamiento de un equipo XRD</i>	36
Figura 7 <i>Representación de la ley de Bagg</i>	37
Figura 8 <i>Imagen de AgNPs tomadas de un microscopio electrónico de barrido (SEM)</i>	38
Figura 9 <i>Esquema de un microscopio electrónico de barrido (SEM)</i>	39
Figura 10 <i>Detector EDS Bruker X-Flash 6 30</i>	40
Figura 11 <i>Espectro típico de un análisis EDS</i>	40
Figura 12 <i>Imagen de AgNPs tomadas de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) ...</i>	41
Figura 13 <i>Microscopio electrónico de transmisión (TEM) y su respectivo esquema</i>	42
Figura 14 <i>Acciones antibacterianas de las AgNPs</i>	45
Figura 15 <i>Secuencia de imágenes que muestran la actividad antibacteriana de AgNPs sintetizadas con Aspergillus niger frente a E. coli.</i>	46
Figura 16 <i>Síntesis verde de nanopartículas metálicas</i>	48
Figura 17 <i>Ambrosia peruviana</i>	50
Figura 18 <i>Psos de la tinción Gram</i>	53
Figura 19 <i>Estructura de la membrana de una bacteria Gram positiva</i>	53
Figura 20 <i>Estructura de la membrana de una bacteria Gram negativa</i>	54
Figura 21 <i>Morfología y agrupaciones bacterianas</i>	54
Figura 22 <i>Tinción Gram en una muestra</i>	55
Figura 23 <i>Tinción Gram de Staphylococcus aureus en un hemocultivo</i>	56

Figura 24 <i>Staphylococcus aureus</i> observado en SEM.....	57
Figura 25 Colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> en una placa de agar de sangre de carnero	57
Figura 26 Colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con tinción Gram	58
Figura 27 Colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en placas de agar sangre	59
Figura 28 Colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en una placa de agar Mueller-Hinton.....	59
Figura 29 Método de Kirby – Bauer aplicado con antibióticos	61
Figura 30 Método de Kirby – Bauer aplicado con una solución de AgNPs.....	62
Figura 31 Microondas, Anton Paar Multiwave PRO Microwave Reaction System	64
Figura 32 Espectrofotómetro UV-Vis, Analytik jena SPECORD S 600.....	67
Figura 33 Equipo HORIBA LB-550 Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer.....	68
Figura 34 Difractómetro de rayos X, PANalytical Empyrean.....	69
Figura 35 Microscopio electrónico de barrido Tescan, Mira 3.....	70
Figura 36 Microscopio electrónico de transmisión FEI, Tecnai G2 Spirit Twin.....	71
Figura 37 Rotavapor Buchi 23022A120.....	72
Figura 38 Curva de calibración de quercetina	77
Figura 39 Diagrama de cajas de la concentración de flavonoides.....	78
Figura 40 Resultados de la concentración de flavonoides	79
Figura 41 Diagrama de cajas de la actividad antioxidante	80
Figura 42 Resultados de la actividad antioxidante	81
Figura 43 Síntesis de AgNPs en extracto de marco.....	81
Figura 44 Espectros observados en las AgNPs sinterizadas variando el tiempo.....	83
Figura 45 Diagramas observados del análisis en DLS a lo largo del tiempo (a. 1 hora, b. 2 horas, c. 3 horas, d. 4 horas, e. 5 horas, f. 6 horas, g. 7 horas y h. 8 horas)	84
Figura 46 Espectros observados en las AgNPs sintetizadas variando la cantidad de extracto .	85
Figura 47 Diagramas observados del análisis en DLS variando la cantidad de extracto (a. 1 mL, b. 1,5 mL, c. 2 mL y d. 2,5 mL)	86

Figura 48 Espectros observados en las AgNPs obtenidas al variar la concentración de AgNO_3	87
Figura 49 Diagramas observados del análisis en DLS variando la concentración de AgNO_3 (a. 0,1 mM, b. 0,5 mM, c. 1 mM y d. 2,5 mM)	88
Figura 50 Espectros observados en las AgNPs sintetizadas variando la temperatura	89
Figura 51 Diagramas observados del análisis en DLS variando la temperatura (a. 40°C, b. 45°C, c. 50°C y d. 55°C)	90
Figura 52 Espectros observados en las AgNPs sintetizadas variando el pH	91
Figura 53 Diagramas observados del análisis en DLS variando el pH (a. pH 6,141, b. pH 7,042, c. pH 8,012 y d. pH 9,007)	92
Figura 54 Espectro observado en las AgNPs sintetizadas después de concentrarlas en rotavapor	93
Figura 55 AgNPs concentradas en rotavapor.....	93
Figura 56 Difractograma obtenido del análisis con el Difractómetro de rayos X (XRD)	95
Figura 57 Resultados obtenidos del análisis con espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	96
Figura 58 Imágenes obtenidas del análisis con espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)	98
Figura 59 Imágenes obtenidas con el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)	100
Figura 60 Histograma del diámetro de las AgNPs obtenidas por TEM.....	101
Figura 61 Jabones elaborados con AgNPs sintetizadas en extracto de marco a concentraciones de: a. 1,5%, b. 2,5%, c. 3,75% y d. 5%.....	102
Figura 62 Jabones elaborados con extracto de marco a concentraciones de: a. 1,5%, b. 2,5%, c. 3,75% y d. 5%.....	102
Figura 63 Jabón elaborado sin AgNPs ni extracto de marco usado como control	102

Figura 64 <i>Difractograma obtenido del análisis de los jabones con AgNPs, extracto y sin ningún principio activo con el Difractómetro de rayos X (XRD)</i>	103
Figura 65 <i>Difractograma obtenido del análisis del jabón con AgNPs realizado con el Difractómetro de rayos X (XRD)</i>	104
Figura 66 <i>Resultados obtenidos con el jabón de extracto de marco en Staphylococcus aureus a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%</i>	106
Figura 67 <i>Resultados obtenidos con el jabón de extracto de marco en Escherichia coli a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%</i>	106
Figura 68 <i>Resultados obtenidos con el jabón de extracto de marco en Pseudomonas aeruginosa a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%</i>	106
Figura 69 <i>Resultados obtenidos con el jabón de AgNPs en Staphylococcus aureus a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%</i>	107
Figura 70 <i>Resultados obtenidos con el jabón de AgNPs en Escherichia coli a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%</i>	107
Figura 71 <i>Resultados obtenidos con el jabón de AgNPs en Pseudomonas aeruginosa a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%</i>	107
Figura 72 <i>Gráficas de la probabilidad normal para a. el jabón con extracto de marco y b. el jabón con nanopartículas de plata</i>	112
Figura 73 <i>Diagramas de Pareto para a. el jabón con extracto de marco y b. el jabón con nanopartículas de plata</i>	112
Figura 74 <i>Gráficas de efectos principales para el halo de inhibición para: a. jabon con extracto de marco y b. jabón con AgNPs</i>	113
Figura 75 <i>Resultados de la prueba de Duncan con la varianza y las medias para el jabón con extracto de marco</i>	114
Figura 76 <i>Resultados de la prueba de Duncan con la varianza y las medias para el jabón con AgNPs</i>	115

Índice de Abreviaturas

min: Minutos

h: Horas

mm: Milímetros

nm: Nanómetros

rpm: Revoluciones por minuto

NPs: Nanopartículas

AgNPs: Nanopartículas de plata

AgNO₃: Nitrato de plata

AgOH: Hidróxido de plata

Ag₂O: Óxido de plata

AlCl₃: Cloruro de aluminio

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

Ag⁺: ion plata

Ag⁰/Ag: plata

pH: Potencial de hidrógeno

CENCINAT: Centro de Nanociencia y Nanotecnología

W: Watts

mg: Miligramos

g: Gramos

µg: Microgramos

µL: Microlitros

mL: Mililitros

mM: Milimolar

ppm: Partes por millón

°C: Grados Celsius

atm: atmósferas

keV: kiloelectronvoltio

UV-Vis: Ultravioleta-visible

DLS: Dispersión dinámica de luz

XRD: Difracción de rayos X

SEM: Microscopía electrónica de barrido

EDS: Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X de

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

ANOVA: Análisis de varianza

Prom.: Promedio

Resumen

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen propiedades antibacterianas y conservantes, algo muy útil en la industria de la belleza que busca nuevos conservantes para sus productos. Las AgNPs están siendo usadas en varios productos, incluyendo los jabones. La síntesis fitoquímica permite sintetizar nanopartículas no tóxicas para los seres vivos. El marco (*Ambrosia peruviana*) es una planta de los saberes ancestrales cuyo extracto presenta propiedades antibacterianas. Se caracterizó el extracto acuoso de marco, se cuantificó flavonoides y se analizó el poder antioxidante del mismo. Se sintetizó nanopartículas de plata en extracto de marco. Se optimizó la síntesis encontrándose las mejores condiciones (utilizando 1,5 mL de extracto, 20 mL de solución 1 mM de nitrato de plata, a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 7 horas, con un pH de 7). Se concentraron las AgNPs en rotavapor. Se caracterizó las nanopartículas obtenidas usando espectrofotometría UV-Vis, dispersión dinámica de luz (DLS), difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), obteniéndose nanopartículas cuasi-esféricas de $22,12 \text{ nm} \pm 6,09 \text{ nm}$. Se formuló el jabón utilizando las concentraciones de 1,25%, 2,5%, 3,75% y 5% de AgNPs y extracto. Se midió la actividad antibacteriana de los jabones elaborados en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando la técnica de difusión en agar nutriente. Se obtuvo un mayor halo de inhibición en *Staphylococcus aureus*, puesto que esta bacteria es más sensible que el resto, con el jabón de AgNPs al 5%. Las AgNPs son buenos agentes antibacterianos en los jabones.

Palabras clave: nanopartículas de plata, síntesis fitoquímica, jabón sólido de glicerina

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have antibacterial and preservative properties, something very useful in the beauty industry that is looking for new preservatives for its products. AgNPs are being used in various products, including soaps. Phytochemical synthesis allows the synthesis of non-toxic nanoparticles for living beings. Marco (*Ambrosia peruviana*) is a plant of ancestral knowledge whose extract has antibacterial properties. The aqueous extract of marco was characterized, flavonoids were quantified and their antioxidant power was analyzed. Silver nanoparticles were synthesized in marco's extract. Synthesis was optimized by finding the best conditions (using 1.5 mL of extract, 20 mL of 1 mM silver nitrate solution, at a temperature of 50°C \pm 1°C, for 7 hours, with a pH of 7). AgNPs were concentrated in rotapvap. The obtained nanoparticles were characterized using UV-Vis spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and transmission electron microscopy (TEM), obtaining quasi-spherical nanoparticles of 22.12 nm \pm 6.09 nm. The soap was formulated using the concentrations of 1.25%, 2.5%, 3.75% and 5% of AgNPs and extract. The antibacterial activity of the soaps made on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was measured using the nutrient agar diffusion technique. A greater inhibition zone was obtained in *Staphylococcus aureus* because this bacterium is more sensitive than the rest, with the 5% AgNPs soap. AgNPs are good antibacterial agents in soaps.

Key words: silver nanoparticles, phytochemical synthesis, solid glycerine soap

Capítulo 1: Introducción

Formulación del problema

La plata es un metal de transición que no tiene ningún papel biológico y es tóxico para los organismos inferiores (Medici et al., 2019). Se lo ha usado a lo largo de la historia y ha mostrado ser un buen agente antibacteriano (Medici et al., 2019). El rápido desarrollo de la nanotecnología ha permitido obtener nanopartículas con funciones muy útiles para el ser humano, los animales y el medio ambiente (Panda, 2021). Un ejemplo son las nanopartículas de plata que han demostrado ser un buen agente antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias (Panda, 2021).

La nano-biotecnología en conjunto con la química verde, presenta un gran potencial para el desarrollo de productos novedosos y necesarios que beneficien la salud humana, el medio ambiente y las industrias (Castillo-Henríquez et al., 2020). Con la química verde se puede sintetizar nanopartículas con métodos no convencionales a partir de extractos vegetales (Castillo-Henríquez et al., 2020). La síntesis verde de AgNps es una alternativa económica y de rápido crecimiento, muchos extractos de plantas se pueden usar como agentes reductores para el proceso de síntesis (Chand et al., 2020).

El Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo en flora y fauna (Kleemann et al., 2022). Es un país intercultural y pluricultural, con creencias ancestrales que se transmiten de generación en generación (Chamba-Tandazo et al., 2020). Específicamente, en la parte medicinal existe una amplia gama de plantas que se han usado para el tratamiento de muchas dolencias (Chamba-Tandazo et al., 2020). *Ambrosia peruviana*, también conocida como “marco”, “altamisa” o “artemisa”, es una planta herbácea que es muy usada en la medicina tradicional indígena para tratar muchas enfermedades (Guzmán et al., 2022).

La industria cosmética ha tenido un gran crecimiento y la incorporación de la nanotecnología (en la década de 1980) ha permitido la incorporación de nuevas formulaciones que tienen una mayor

eficacia (Ong & Nyam, 2022). Las AgNPs son de gran interés por sus propiedades, destacándose las antimicrobianas (Ong & Nyam, 2022). Las nanopartículas de plata también presentan propiedades conservantes y el Comité Científico sobre Seguridad del Consumidor (SCCS) las considera como un agente conservante seguro (Mondéjar-López et al., 2021).

En el presente trabajo se elaboró un jabón de glicerina con nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de marco (*Ambrosia peruviana*) con la finalidad de comprobar si este producto presenta actividad antimicrobiana. Los resultados que se obtengan permitirán exponer las características del proceso de síntesis verde de nanopartículas con el extracto de marco y, de manera particular, la efectividad antimicrobiana de las mismas dentro de un producto cosmético.

Justificación del problema

En los últimos años, el uso de nanopartículas en productos cosméticos se ha incrementado por los beneficios que estas han demostrado tener, aunque persiste el debate de la toxicidad que estas presentan (Gajbhiye & Sakharwade, 2016). La nanotecnología es una ciencia emergente que continúa en fase de investigación encontrándose muchas aplicaciones de la misma, buscando el beneficio del ser humano (Gajbhiye & Sakharwade, 2016). La industria cosmética y veterinaria genera muchas ganancias económicas a nivel mundial y con la aplicación de nanopartículas en sus productos han incrementado su eficacia (Bansod et al., 2015; Betancur et al., 2016).

La nanotecnología ofrece técnicas que permiten la síntesis de materiales con actividad antimicrobiana; las nanopartículas antibacterianas inorgánicas como las de plata (Kailasa et al., 2019), óxido de zinc (Kumar et al., 2014a), dióxido de titanio (Betancur et al., 2016) y óxido de cobre (Kumar et al., 2017) tienen una atención especial por su alta estabilidad al estar en contacto con sistemas biológicos (Betancur et al., 2016). Los agentes antibacterianos inorgánicos (metales y óxidos de metal) presentan ventajas respecto a los compuestos orgánicos, ya que son más estables y seguros (Betancur et al., 2016).

Debido al abuso de los antibióticos se han desarrollado cepas bacterianas más resistentes, por lo que se han desarrollado nuevos antibióticos para estas cepas resistentes creando un ciclo interminable (Kurtjak et al., 2017). Una opción para terminar con este problema es usar agentes antimicrobianos inorgánicos por su capacidad de matar bacterias o inhibir su crecimiento (Kurtjak et al., 2017). Gracias a los nuevos avances en la ciencia de los biomateriales y la nanotecnología se podría lograr: (a) una acción local y dirigida sin efectos secundarios en el organismo; (b) un mejor transporte y una fácil penetración en las especies patógenas (mayor eficiencia) y (c) una oportunidad única para el desarrollo de medicamentos eficaces (Kurtjak et al., 2017). Según Kurtjak et al. (2017) existe el riesgo de desarrollar una resistencia a la plata, lo cual está en estudio; sin embargo, las nanopartículas metálicas representan una clara ventaja para el tratamiento de enfermedades bacterianas generadas por cepas resistentes a los antibióticos.

Los métodos de síntesis de nanopartículas pueden ser químicos o a través de síntesis verde. Para una síntesis química se usan precursores, agentes reductores y estabilizantes. Dentro de los agentes reductores representativos se encuentran: borohidruro de sodio (NaBH_4), glucosa, N, N-dimetilformamida, hidracina (N_2H_4), citrato de sodio, polioles (etilenglicol, dietilenglicol o una mezcla de ellos) y formaldehído; también están los siguientes agentes protectores: tioles, aminas, polímeros (Polivinilpirrolidona PVP, polivinil alcohol PVA), polielectrolitos (oleato de sodio, ácido oleico, etc.) y tensoactivos (suprimir la agregación): bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), dodecil sulfato de sodio y cloruro de cetil trimetil amonio (CTAC), muchos de estos reactivos químicos son tóxicos (Chouhan, 2018). Los métodos químicos de síntesis de nanopartículas generan algunos subproductos químicos tóxicos que pueden tener efectos adversos si se las usa como aplicación médica, y algunos de estos pueden ser costosos, tales como: borohidruro (Kumar et al., 2014a), 2-mercaptoetanol (Garibo et al., 2020), tioglicerol y citrato (Ijaz et al., 2021).

Por otro lado, la síntesis verde de nanopartículas es una forma de obtener nanopartículas no tóxicas y de bajo costo utilizando extractos de plantas (Bansod et al., 2015). Los extractos

vegetales contienen sustancias que funcionan como agentes reductores y estabilizadores de las nanopartículas, además algunos tienen propiedades antimicrobianas (Geraldés et al., 2016). Algunas de estas sustancias son: polifenoles, ácidos orgánicos, flavonoides, terpenoides, proteínas, flavonas, cetonas, aldehídos, amidas y quinonas (Garibo et al., 2020; Geraldés et al., 2016). Varios estudios promueven el uso de nanopartículas de metales u óxidos para diferentes fines, dentro de la industria cosmética el más usado es la plata, y de preferencia se usa nanopartículas obtenidas de una síntesis verde porque presentan menor toxicidad y mejor estabilidad (Gajbhiye & Sakharwade, 2016). La síntesis verde de nanopartículas metálicas implica tres pasos principales basados en las perspectivas de la química verde: (1) selección de un medio solvente biocompatible y no tóxico; (2) selección de agentes reductores ambientalmente favorables y (3) selección de sustancias no tóxicas para la estabilización de las nanopartículas (Geraldés et al., 2016).

En humanos o animales superiores, las enfermedades fúngicas y bacterianas están principalmente relacionadas con infecciones en la piel, pero debido a la aparición y aumento de la resistencia microbiana a múltiples antibióticos y los costos de la atención médica, existe la necesidad de desarrollar agentes antimicrobianos rentables y sin resistencia (Bansod et al., 2015). Las infecciones de la piel son las más comunes en animales, principalmente son generadas por bacterias, hongos y ectoparásitos (Bansod et al., 2015). Por lo que es necesario desarrollar nuevos productos para estas afecciones y con la aplicación de nanopartículas de plata, se han obtenido buenos resultados, aunque es importante hacer una mayor investigación.

La industria de la belleza utiliza la nanotecnología para la conservación de sus productos y protegerlos de la contaminación microbiana que puede ocurrir durante su producción o almacenamiento, esto es de suma importancia porque estos productos tienen un contacto directo con el cuerpo humano (Pulit-Prociak & Banach, 2016). De acuerdo con Pulit-Prociak & Banach (2016) un jabón que incorpora AgNPs, gracias a la presencia de estas nanopartículas, presenta

actividad antiinflamatoria y protege la piel contra los efectos adversos de los microorganismos. Las AgNPs pueden penetrar profundamente en la piel y eliminar cualquier contaminación bacteriana, lo que inhibe la formación de acné (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

El marco es una planta usada desde hace mucho tiempo en el Ecuador. Normalmente se realizan infusiones para aprovechar sus propiedades medicinales, se la usa para tratar infecciones internas y externas (causadas por ectoparásitos) tanto en personas como animales mediante baños de la infusión (Mesa Vanegas et al., 2017; Moya Castillo, 2017). Estas propiedades se deben a los metabolitos secundarios que presentan. Entre ellos destacan los flavonoides que, al ser buenos antioxidantes, podrían favorecer la formación de nanopartículas lo que permitiría efectuar una síntesis fitoquímica de AgNPs (Yáñez C. et al., 2011; Geraldés et al., 2016). En Ecuador según Arias Ortiz & Palma Holguín (2019) la nanotecnología está muy poco desarrollada y sus aplicaciones principalmente se enfocan en el área de la remediación ambiental. Pero hay que recordar que existe una fuerte industria ganadera que es el sustento de muchas familias, en donde aplicar productos naturales enriquecidos con nanopartículas puede ser beneficioso y se evitaría el uso de productos veterinarios de origen sintético cuyos efectos son más dañinos para el animal y el medio ambiente. La industria cosmética ecuatoriana está empezando a crecer con emprendimientos de cosmética natural (Proaño, 2021).

Objetivos

General

Evaluar la actividad antibacteriana de un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*).

Específicos

- Obtener y caracterizar el extracto acuoso de marco (*Ambrosia peruviana*).

- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) mediante una síntesis fitoquímica con extracto de marco (*Ambrosia peruviana*).
- Elaborar un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*).
- Evaluar la actividad antibacteriana del jabón frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* mediante el método de difusión en agar.

Marco Teórico

Nanotecnología

La nanotecnología es el estudio de las nanopartículas y nanomateriales (Gajbhiye & Sakharwade, 2016). Un nanomaterial es cualquier material que mida menos de 100 nanómetros en al menos una dimensión (Gajbhiye & Sakharwade, 2016). Estos materiales tienen propiedades ópticas, térmicas, eléctricas y / o magnéticas únicas (Gajbhiye & Sakharwade, 2016). La nanotecnología es un campo de la ciencia que según Pulit-Prociak & Banach (2016) tiene un rápido crecimiento y es de interés para los investigadores desde principios de la década de 1990. Esta área se ha convertido en una parte integral de la tecnología moderna como una “tecnología clave del siglo XXI” con carácter interdisciplinario (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

Sus aplicaciones se hallan en una variedad de productos que incluyen la electrónica de consumo, los automóviles, la ciencia aeroespacial, artículos: deportivos, del hogar, de higiene, de construcción y médicos (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

Específicamente, las nanopartículas se producen de forma natural o se pueden sintetizar, y se dividen en las siguientes categorías (Pulit-Prociak & Banach, 2016):

1. **Nanopartículas inorgánicas metálicas:** TiO_2 , SiO_2 , ZnO , $\text{Al}(\text{OH})_3$, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , CeO_2 , ZrO_2 , CaO .
2. **Metales y aleaciones de metales:** Au, Ag, Pt, Pd, Cu, Fe, Ni, Co, Al, Mn, Mo.

3. **Nanomateriales basados en carbono:** nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, grafeno.
4. **Nanopolímeros y dendrímeros:** nanopartículas poliméricas, nanotubos poliméricos, nanocables y nanovarillas, nanocelulosa, películas poliméricas nanoestructuradas.
5. **Puntos cuánticos:** telururo de cadmio, seleniuro de cadmio, puntos cuánticos libres de cadmio.

Nanopartículas de plata (AgNPs)

Gracias a sus propiedades antimicrobianas, regenerativas, conservantes y antiinflamatorias, se consideran líderes en la lucha contra la actividad microbiana patógena debido a que la plata tiene un fuerte efecto de ralentizar su actividad (Pulit-Prociak & Banach, 2016). Las AgNPs obtenidas por una síntesis mediada por extractos vegetales poseen más actividades biológicas que las nanopartículas sintetizadas por métodos químicos (Ahmed & Mustafa, 2020).

A comparación con la forma sólida de la plata, el aumento de la superficie de las nanopartículas de plata es lo brinda este comportamiento resultando en un mejor contacto con los microorganismos y una actividad biocida más eficaz frente a un amplio espectro de bacterias Gram negativas y positivas (se incluyen algunas cepas resistentes a los antibióticos) (Pulit-Prociak & Banach, 2016). A continuación, se citan las bacterias frente a las cuales se ha confirmado actividad biocida:

Tabla 1

Bacterias frente a los cuales se ha confirmado actividad biocida con AgNPs.

Bacteria	Resultado	Referencia
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Gram negativa)	Susceptibilidad a una concentración de 75 µg de AgNPs y presentaron resistencia a la colistina.	(Alharbi & Alarfaj, 2020)
<i>Bacillus cereus</i> (Gram positiva)	Buena susceptibilidad al combinar las AgNPs (150 µg) con doxicilina	(Deepa et al., 2021)

Bacteria	Resultado	Referencia
	(15 µg) y un film de colágeno (500 µg), se obtuvo un halo de inhibición de 36 mm.	
<i>Bacillus subtilis</i> (Gram positiva)	Buena actividad biocida respecto a la gentamicina.	(Rama Krishna et al., 2020)
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram positiva)	Buena actividad antimicrobiana respecto al extracto vegetal usado con un MIC de 4µg/mL.	(Keshari et al., 2020)
<i>Escherichia coli</i> (Gram negativa)	Excelente actividad biocida, mejor que la de <i>S. aureus</i> .	(Khan et al., 2020)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Gram negativa)	Con susceptibilidad a una concentración de 100 µg de AgNPs y presentaron resistencia a la colistina.	(Alharbi & Alarfaj, 2020)
<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram positiva)	Buena actividad biocida respecto al extracto vegetal y la gentamicina, fue la bacteria más resistente del estudio.	(Salayová et al., 2021)
<i>Proteus vulgaris</i> (Gram negativa)	Buena actividad antimicrobiana respecto al extracto vegetal usado con un MIC de 8µg/mL y un halo de inhibición de 26 mm.	(Keshari et al., 2020)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram negativa)	Buena actividad biocida, mucho mejor que la tetraciclina.	(Gomathi et al., 2020)
<i>Salmonella enterica ser. Typhimurium</i> (Gram negativa)	Buena actividad biocida respecto al extracto vegetal y la gentamicina.	(Salayová et al., 2021)
<i>Salmonella typhi</i> (Gram negativa)	Buena actividad antimicrobiana respecto al extracto vegetal usado con un MIC de 16µg/mL y una zona de inhibición de 28 mm.	(Keshari et al., 2020)
<i>Shigella dysenteriae</i> (Gram negativa)	Buena susceptibilidad al combinar las AgNPs (150 µg) con doxicilina (15 µg) y un film de colágeno (500 µg), se obtuvo un halo de inhibición de 35 mm.	(Deepa et al., 2021)

Bacteria	Resultado	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positiva)	Buena actividad biocida aunque menor a la de <i>E. coli</i> .	(Khan et al., 2020)
<i>Vibrio cholerae</i> (Gram negativa)	Buena actividad antimicrobiana respecto al extracto vegetal usado con un MIC de 8µg/mL y tuvo la máxima zona de inhibición (41 mm).	(Keshari et al., 2020)

Recientes investigaciones han demostrado que las nanopartículas de plata pueden ser un arma eficaz en la lucha contra los virus al inhibir su replicación (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

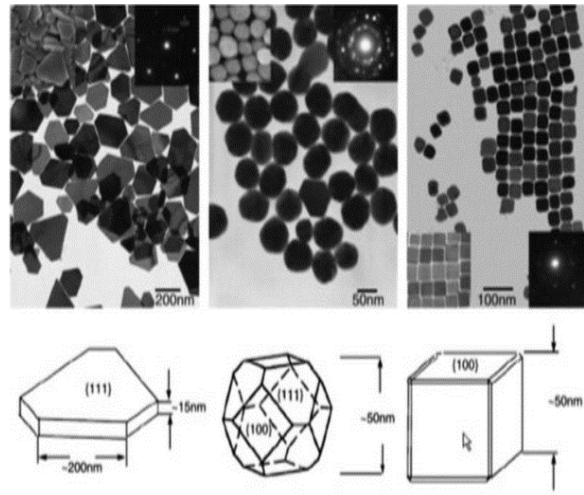
Se demostró su actividad contra el VIH-1 y el virus de la influenza; también son agentes eficaces y de acción rápida en la destrucción de diferentes hongos como: *Aspergillus*, *Candida* y *Saccharomyces* (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

Las nanopartículas de plata se pueden sintetizar con métodos químicos, físicos y biológicos, las estrategias de reducción química utilizan agentes reductores y de cobertura en un medio acuoso; esta es una síntesis de bajo costo y alto volumen (Guzmán et al., 2019).

El producto final de la reducción química presenta características coloidales debido a que están implicados fenómenos de co-precipitación, incluyendo: reducción, nucleación, crecimiento, engrosamiento y / o aglomeración (Guzmán et al., 2019); esto se puede observar en la siguiente figura:

Figura 1

Imágenes TEM de diferentes formas de AgNPs



Nota: En el gráfico se observan nanoplacas de Ag truncadas (izquierda), nanopartículas de plata semiesféricas (centro) y cúbicas (derecha) y sus áreas. Tomado de: (Guzmán et al., 2019).

Caracterización de AgNPs

La caracterización de nanopartículas es parte muy importante en la determinación de la pureza de fase, forma, tamaño, morfología, entre otros; por lo que mediante el uso de técnicas analíticas avanzadas como las que se citan a continuación se pueden determinar estas propiedades (Chouhan, 2018).

Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)

Según JoVE Science Education Database (2021) y Justin (2021) es una de las técnicas analíticas más populares debido a su versatilidad y la capacidad de detectar casi cualquier molécula, mide la cantidad de longitudes de onda discretas de luz UV o visible que son absorbidas o transmitidas a través de una muestra comparándola con una muestra de referencia o blanco.

La luz de UV-Vis pasa a través de una muestra y mide la transmitancia (T) de la luz de la misma, mediante esta última se puede calcular la absorbancia (A) con la fórmula (JoVE Science Education Database, 2021):

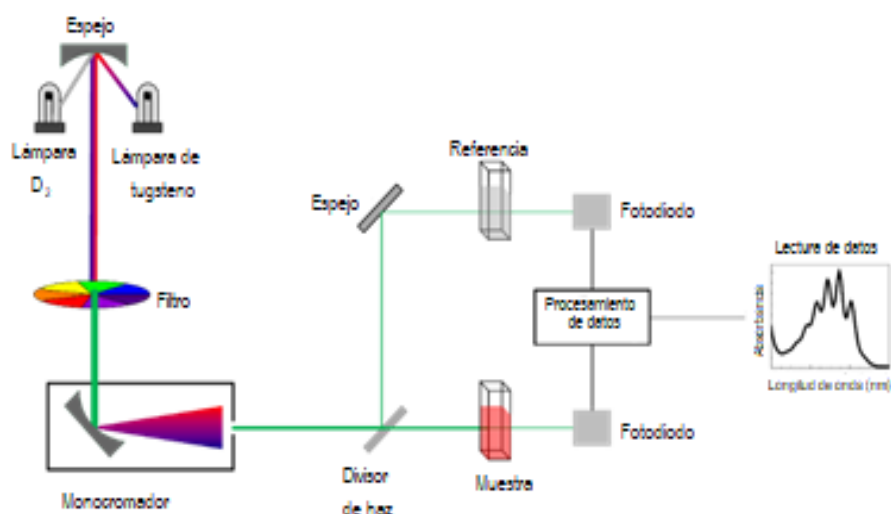
$$A = -\log(T) \text{ [Ec.1]}$$

El espectro de absorbancia que se obtiene 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 (JoVE Science Education Database, 2021).

Según Justin (2021) la mejor cubeta es la de cuarzo, ya que filtra casi toda la luz UV, en cambio la cubeta de plástico es la menos indicada para utilizar.

Figura 2

Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro UV- Vis.



Nota: Imagen tomada de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_UV-visible_spectrophotometer.png.

Esta técnica se puede utilizar de forma cualitativa para identificar grupos funcionales o confirmar la identidad de un compuesto al hacer coincidir el espectro de absorbancia (JoVE Science Education Database, 2021).; También puede usarse de forma cuantitativa al calcular la concentración de un analito, la cual se relaciona con la absorbancia mediante la ley de Beer (JoVE Science Education Database, 2021). La ley de Beer es escrita comúnmente como (Antylia Scientific Blog Team, 2012):

$$A = \varepsilon lc \text{ [Ec.2]}$$

Donde:

A es la absorbancia

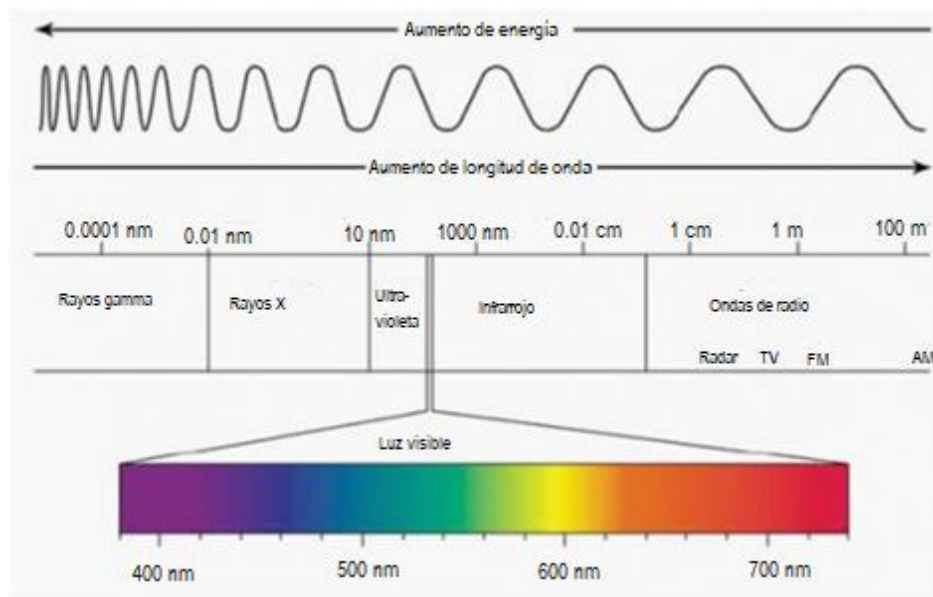
ε es la absortividad molar (coeficiente de extinción)

l es la longitud de la trayectoria

c es la concentración

Figura 3

Esquema del espectro de luz, se incluye la luz visible y otros tipos de radiaciones.



Nota: Imagen tomada de: (Antylia Scientific Blog Team, 2012).

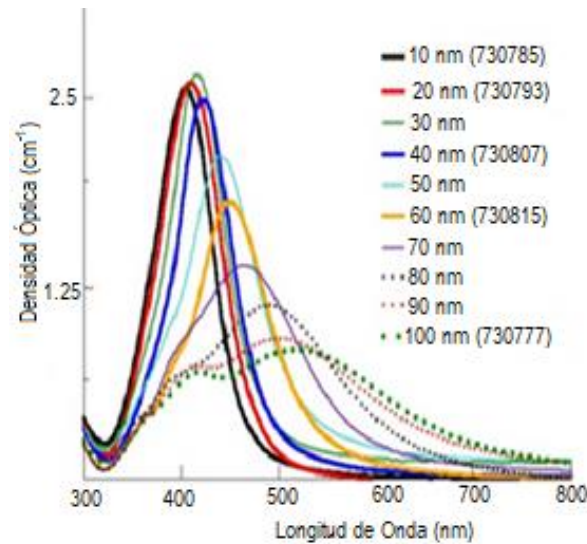
Esta técnica no es muy sensible porque no mucha luz es absorbida en un trayecto corto, pero pese a que otras técnicas de espectroscopia tienen mayor sensibilidad no son aplicables (JoVE Science Education Database, 2021). Sin embargo, presenta una sensibilidad similar a otras mediciones de absorbancia como la espectroscopia infrarroja (JoVE Science Education Database, 2021).

La forma (plana o tridimensional), el tamaño, la estabilidad y las propiedades generales de las AgNPs están muy influenciadas por las condiciones experimentales (Guzmán et al., 2019). La banda de absorción de las AgNPs esféricas depende de la forma, el tamaño y el medio

circundante de la partícula, un ejemplo de ello es que la absorbancia máxima para las nanopartículas de plata esféricas se halla en el rango de 380 nm a 480 nm (Guzmán et al., 2019).

Figura 4

Espectros de extinción (dispersión + absorción) de nanopartículas de plata con diámetros que oscilan entre 10 y 100 nm.



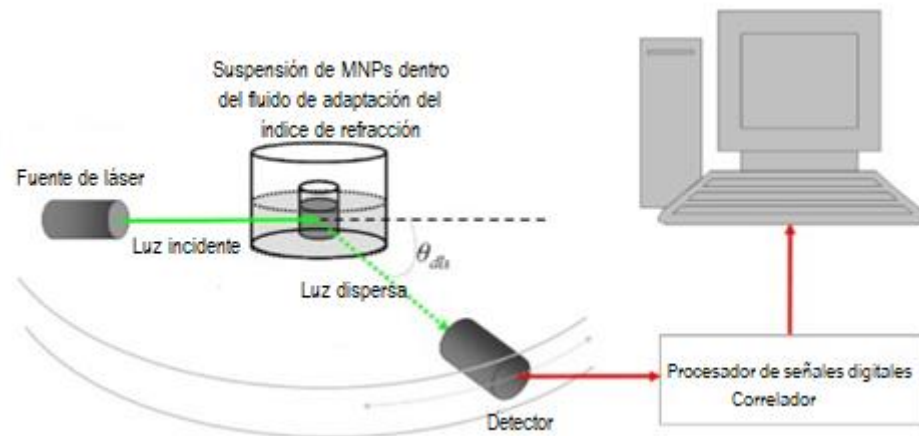
Nota: Imagen tomada de: (Guzmán et al., 2019).

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Es una técnica útil con aplicaciones en numerosas disciplinas científicas donde, dependiendo de la fuente de luz y el detector, se pueden estudiar propiedades específicas de las moléculas (Stetefeld et al., 2016). La muestra se expone a una onda de luz monocromática y un detector apropiado detecta la señal (Stetefeld et al., 2016). Esta técnica se ha utilizado ampliamente para dimensionar las nanopartículas magnéticas en fase líquida (Lim et al., 2013). A continuación, se observa un esquema del funcionamiento del equipo:

Figura 5

Esquema de funcionamiento de un equipo DLS.



Nota: Imagen tomada de: (Lim et al., 2013).

También conocida como espectroscopia de correlación de fotones, es uno de los métodos más usados para determinar el tamaño de las nanopartículas (Lim et al., 2013). Una suspensión de nanopartículas se expone a un haz de luz (onda electromagnética) y a medida que la luz incidente incide en las nanopartículas, la dirección y la intensidad del haz de luz se alteran debido a la dispersión (Lim et al., 2013).

Tiene varias ventajas sobre otros métodos, ya que se puede realizar experimentos con una amplia gama de tampones de muestra, temperaturas y concentraciones; es una técnica no invasiva que requiere cantidades comparativamente bajas de muestra (Stetefeld et al., 2016). Si se analizan las fluctuaciones de intensidad (provocadas por el movimiento browniano de las macromoléculas en solución) de la luz dispersa, se puede obtener el coeficiente de difusión (D_T) que está relacionado con el radio hidrodinámico, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se puede calcular el radio verdadero (Lim et al., 2013).

Esta técnica que mide el movimiento browniano de macromoléculas en solución que surge por el bombardeo de moléculas de solvente, y relaciona este movimiento con el tamaño de las partículas

con la ecuación de Stokes-Einstein (Lim et al., 2013). Cuando se monitorea el movimiento de partículas en un rango de tiempo, se puede obtener información sobre el tamaño de las macromoléculas; las partículas grandes se difunden lentamente, lo que resulta en posiciones similares en diferentes intervalos de tiempo, en comparación con las partículas pequeñas que se mueven más rápido y no adoptan una posición específica (Lim et al., 2013).

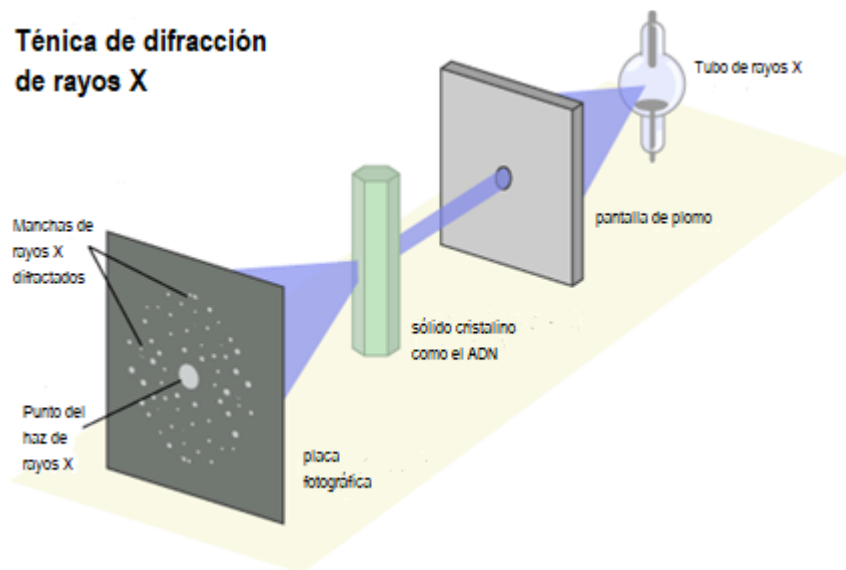
Este método analítico tiene sus limitaciones, no puede emplearse únicamente para obtener la información estructural; pero al combinarse con otras técnicas de microscopía electrónica, proporciona datos estadísticos representativos sobre el tamaño hidrodinámico de los nanomateriales (Lim et al., 2013). La interpretación de los datos de DLS implica la interacción de algunos parámetros (tamaño, concentración, forma, polidispersidad y propiedades superficiales de las nanopartículas involucradas), por lo que se necesita un análisis cuidadoso para extraer la información correcta (Lim et al., 2013).

Difracción de Rayos X (XRD)

Es una técnica muy usada para la caracterización de materiales a nanoescala, permite determinar la estructura cristalina, el tamaño y la forma de la celda unitaria y el tamaño del cristal de un material (Chouhan, 2018; Holder & Schaak, 2019). Analizar una muestra en polvo mediante XRD brinda información importante que es complementaria a varios métodos microscópicos y espectroscópicos, como la identificación de fases, la pureza de la muestra, el tamaño del cristal y, en algunos casos, la morfología (Holder & Schaak, 2019). La información obtenida se puede correlacionar con los datos microscópicos para probar si las observaciones microscópicas en una pequeña cantidad de partículas son representativas de la mayoría de la muestra (Holder & Schaak, 2019).

Figura 6

Esquema de funcionamiento de un equipo XRD.



Nota: Imagen tomada de: (Understanding Science, 2010).

En XRD, el haz de electrones golpea un objetivo metálico y se generan rayos X, los mismos que inciden sobre una muestra en un ángulo (θ), si la muestra es cristalina y las distancias entre los átomos son de la misma magnitud que la longitud de onda de los rayos X, se producirá difracción; la diferencia de trayectoria entre las ondas de rayos X, que se reflejan desde dos planos paralelos es $2d \sin \theta$ (Eraky Mohammed, 2016). La intensidad de los rayos X difractados y la orientación de la muestra se mide en función del ángulo de difracción 2θ ; este patrón de difracción se utiliza para determinar fases cristalinas y propiedades estructurales de la muestra de acuerdo con la ley de Bragg (Eraky Mohammed, 2016):

$$2d \sin \theta = n \lambda \text{ [Ec.3]}$$

Donde:

n es el orden de la reflexión correspondiente y es un entero

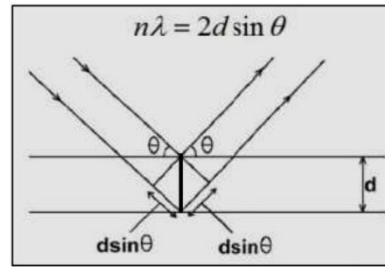
λ es la longitud de onda de los rayos X

d es el espaciado atómico

θ es el ángulo característico

Figura 7

Representación de la ley de Bragg.



Nota: Imagen tomada de: (Eraky Mohammed, 2016).

El tamaño cristalino de las partículas según Chouhan (2018) y (Holzwarth & Gibson, 2011) se puede estimar usando la fórmula de Scherrer:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{B_{hkl} \cos \theta} \quad [\text{Ec.4}]$$

Donde:

D_{hkl} es el tamaño del cristal en la dirección perpendicular a los planos de la red,

hkl son los índices de Miller de los planos que se analizan,

K es un factor numérico también llamado factor de forma del cristal

λ es la longitud de onda de los rayos X,

B_{hkl} es el ancho (ancho completo a la mitad del máximo) del pico de difracción de rayos X en radianes

θ es el ángulo de Bragg.

Los picos de difracción de las nanopartículas de plata normalmente observados son a $38,00^\circ$, $44,16^\circ$, $64,40^\circ$ y $77,33^\circ$ (Chouhan, 2018); y esto se corrobora, ya que en la investigación de Kumar, Smita, Cumbal, & Debut (2017) obtuvieron resultados similares, con picos a 38.04° , 44.06° , 64.34° y 77.17° .

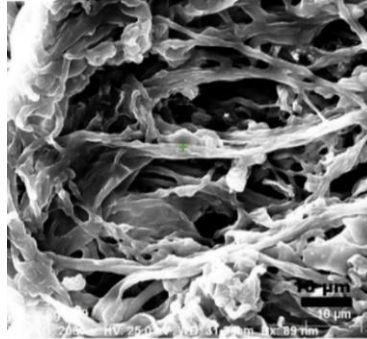
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Con esta técnica, la muestra es analizada mediante un escaneo con un haz fino de electrones enfocado de alta energía en un patrón de barrido de trama y lentes electrostáticos o electromagnéticos para generar imágenes de alta resolución (revelando detalles de entre 1 y 5 nm de tamaño); mientras que la morfología de la superficie de la muestra se determina con ayuda

de los electrones secundarios emitidos por la superficie de la muestra (Chouhan, 2018; Eraky Mohammed, 2016). A continuación se observa una imagen tomada con SEM de nanopartículas de plata:

Figura 8

Imagen de AgNPs tomadas de un microscopio electrónico de barrido (SEM).



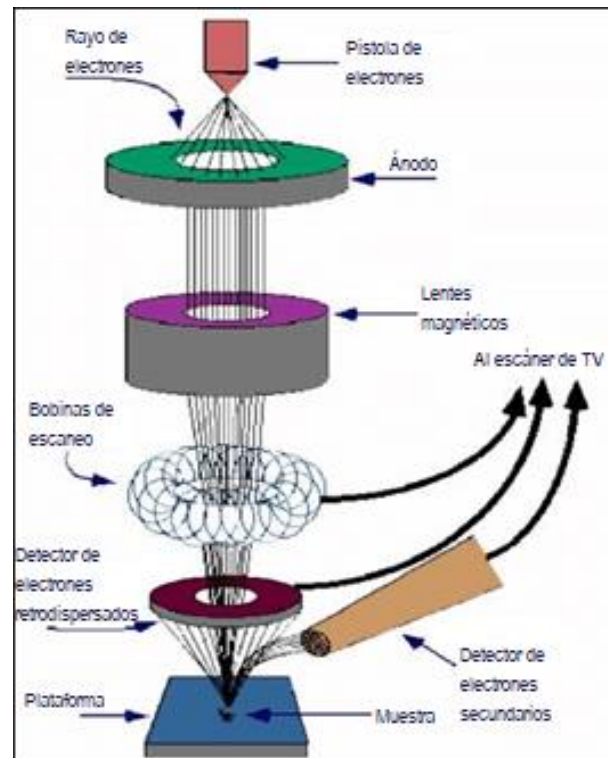
Nota: Imagen tomada de: (Guzmán et al., 2019).

Los electrones interactúan con los átomos de la muestra y producen señales que contienen información sobre la topografía de la superficie de la muestra, su composición y otras propiedades como la conductividad eléctrica (Eraky Mohammed, 2016).

Las micrografías SEM tienen un aspecto a gran profundidad de campo que produce una apariencia tridimensional, algo muy útil para comprender la estructura de la superficie de una muestra (Eraky Mohammed, 2016). En la figura 9 se observa un esquema de un microscopio electrónico de barrido.

Figura 9

Esquema de un microscopio electrónico de barrido (SEM).



Nota: Imagen tomada de: (Eraky Mohammed, 2016).

Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Es una técnica en donde la interacción de un haz de electrones sobre una muestra genera varias emisiones, incluyendo los rayos X característicos; mediante un detector de dispersión de energía (EDS) se separan los rayos X característicos de diferentes elementos en un espectro de energía (Goodge, 2017). El software del sistema EDS permite analizar el espectro de energía con el fin de determinar la abundancia de elementos específicos, es decir se puede encontrar la composición química de los materiales y crear mapas de composición de elementos, lo que brinda información de la composición fundamental para una amplia variedad de materiales (Goodge, 2017). En la figura 10 se observa un detector EDS Bruker X-Flash 6|30, que se puede acoplar a un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Figura 10

Detector EDS Bruker X-Flash 6|30.

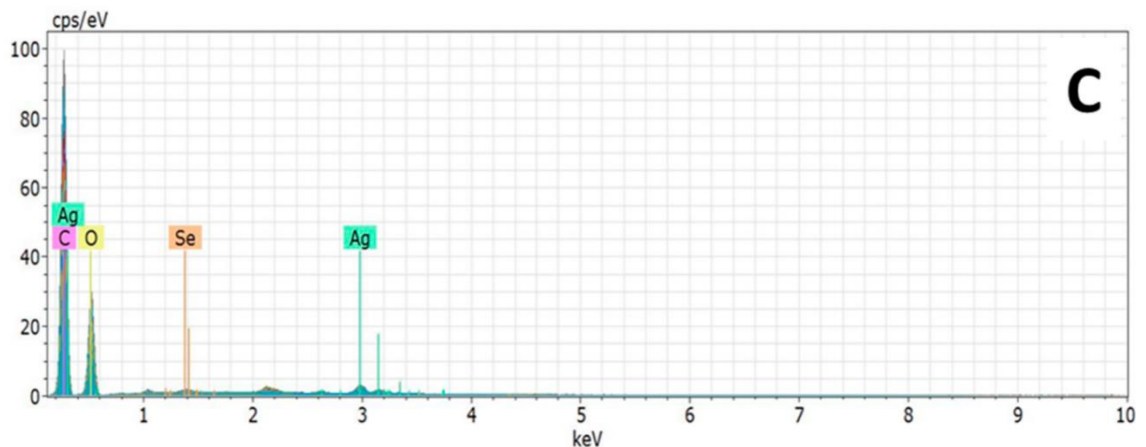


Nota: Imagen tomada de: <https://pik-instruments.pl/wp-content/uploads/2020/03/Detektor-Quantax-EDS-dla-mikroskopii-SEM-.jpg>.

Normalmente un espectro de EDS se representa como un gráfico de recuentos de rayos X frente a energía (en keV), en donde los picos de energía corresponden a cada uno de los elementos presentes en la muestra (Goodge, 2017). Acorde con Goodge (2017) estos picos normalmente son estrechos y se resuelven fácilmente, pero muchos elementos producen múltiples picos, por lo que influye mucho la experticia del operador, además los elementos en baja abundancia generarán picos de rayos X que pueden no se observarán. A continuación se observa un espectro normal de un EDS:

Figura 11

Espectro típico de un análisis EDS.



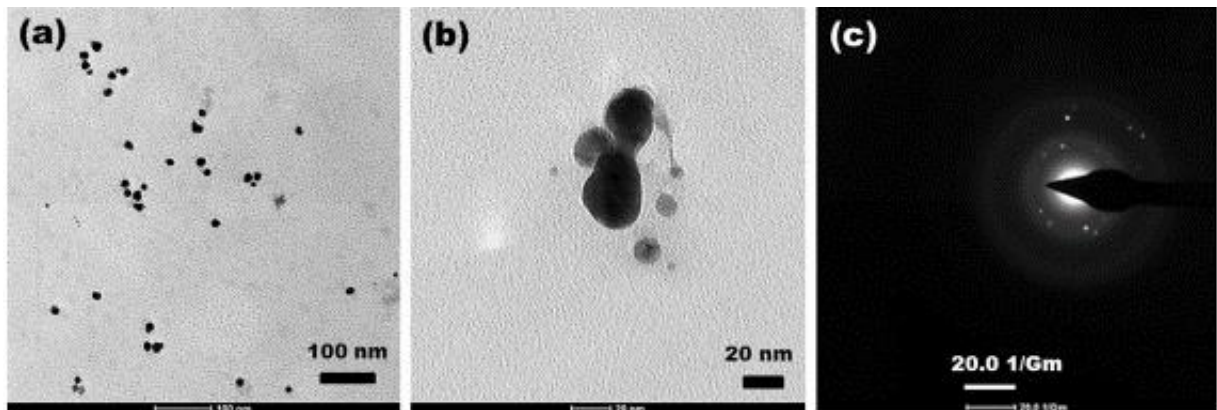
Nota: Imagen tomada de: (García et al., 2020).

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión usa un haz de electrones para enfocar una muestra produciendo una imagen detallada y ampliada de la misma (Mokobi, 2021). Su poder de aumento es de más de 1 millón de veces mejor que el del microscopio óptico, lo que permite realizar fácilmente una caracterización de la imagen en sus características morfológicas, al igual que su composición (Mokobi, 2021). A continuación, se observan imágenes tomadas con un microscopio electrónico de transmisión:

Figura 12

Imagen de AgNPs tomadas de un microscopio electrónico de transmisión (TEM).

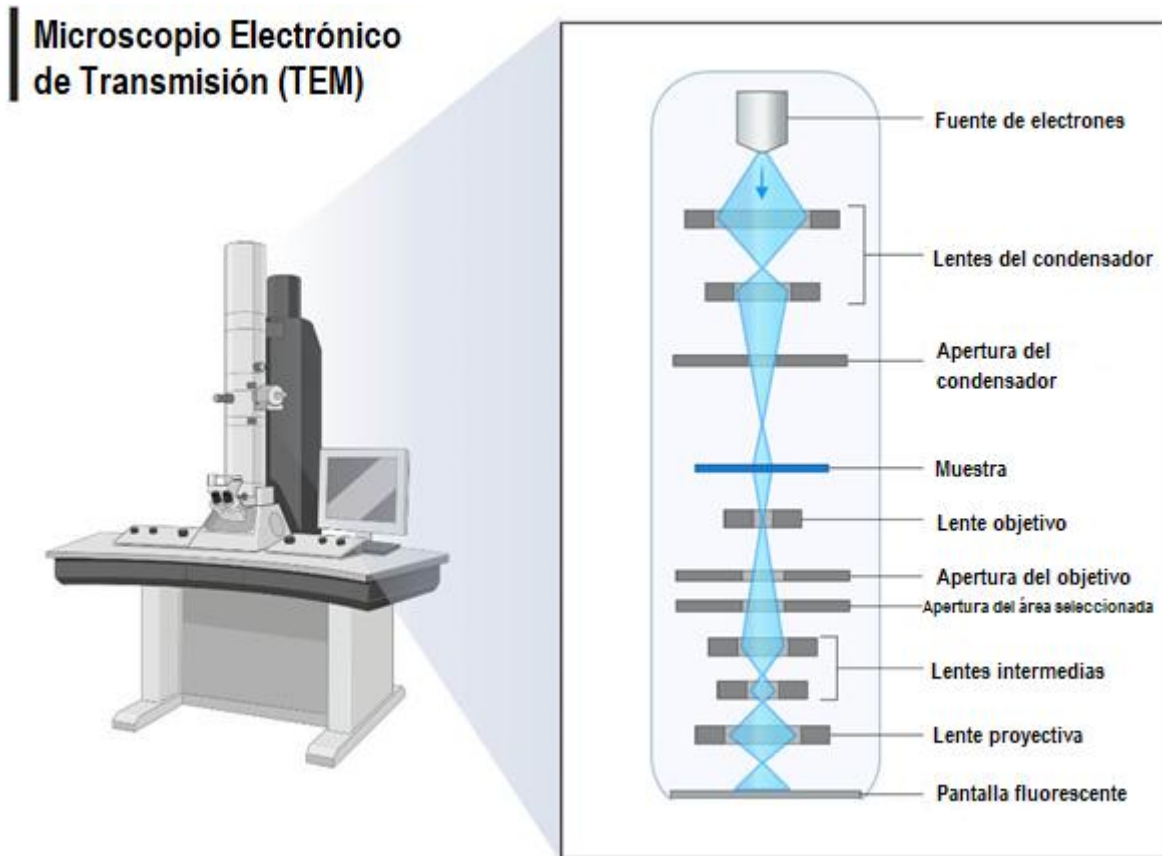


Nota: Imagen tomada de: (Kumar et al., 2015).

En el análisis TEM, un haz incidente de electrones se transmite a través de una muestra ultrafina que interactúa con la muestra y se transforma en electrones no dispersos, dispersos elásticamente o dispersos inelásticamente (Chouhan, 2018). Los electrones dispersos o no dispersos se enfocan con una serie de lentes electromagnéticas y se proyectan en una pantalla para generar una difracción de electrones en una imagen de contraste de amplitud, de fase o de sombra de oscuridad variable acorde a la densidad del electrón no dispersado (Chouhan, 2018). En la figura 13 se observa la apariencia de un microscopio electrónico de transmisión:

Figura 13

Microscopio electrónico de transmisión (TEM) y su respectivo esquema.



Nota: Imagen tomada de: (Aryal, 2022).

Mecanismo de acción antimicrobiana

En la acción antimicrobiana, hay dos pasos importantes en el control del crecimiento de microorganismos, el primero implica la estabilización de la modificación de las superficies de AgNPs y el segundo se refiere a la interacción de nanopartículas de iones Ag^+ con paredes celulares de bacterias (Kailasa et al., 2019). Acorde a lo mencionado por Kailasa et al. (2019) el primer paso depende del entorno microbiano y de procesos de disolución, agregación, reacción fotoredox y liberación de iones Ag^+ de AgNPs; mientras que en el segundo se inhibe las funciones de las proteínas bacterianas, deteniendo su crecimiento y finalmente provocando la muerte de las bacterias. Esto último se relaciona con la concentración de AgNPs, ya que según el estudio

de Guzmán et al. (2019) las concentraciones de las nanopartículas de plata generadas con ácido gálico (GC-AgNPs) de 0,1 y 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fueron suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano.

El grado de actividad antimicrobiana de las AgNPs depende de las propiedades fisicoquímicas, el tamaño, la morfología y la química del ligando de las AgNPs, el medio y el entorno microbiano y la concentración de las AgNPs (Kailasa et al., 2019). Según Kailasa et al. (2019) aún no se sabe el mecanismo antibacteriano exacto de las AgNPs, por ello es recomendable realizar investigaciones futuras para poder comprenderlo de mejor forma.

Las AgNPs presentan una alta tendencia a interactuar con las bacterias, por lo que se acumulan sobre las superficies de la membrana bacteriana, resultando en la formación de agregados de las nanopartículas que dañan las membranas bacterianas (Kailasa et al., 2019). Este daño se da porque estos agregados se anclan a la superficie celular, generando inhibición de las proteínas (Yin et al., 2020). Finalmente esto conllevó a la muerte celular, ya que los agregados entraron lentamente por la membrana, alterando las funciones de los ácidos nucleicos (Kailasa et al., 2019). Las GC-AgNPs sintetizadas no solo se enlazan a la membrana de peptidoglicano bacteriana, sino que penetran en el protoplasma de las bacterias lo que se cree que provoca una desnaturalización de las proteínas (Guzmán et al., 2019).

Acorde con Kailasa et al. (2019) es importante recordar que la propiedad antibacteriana de las AgNPs depende mucho de la interacción de las paredes celulares bacterianas y las superficies de las nanopartículas, el tamaño de las nanopartículas influye significativamente, siendo las más pequeñas las más eficientes mediante su mecanismo de adhesión con paredes celulares bacterianas. Se cree que el ion Ag^+ actúa como un buen agente antibacteriano siendo su fuente las AgNPs, debido a que este ion presenta una alta afinidad para unirse con moléculas bioactivas que contienen grupos amino, fosfato y mercapto, lo que conduce a una inactivación significativa de las vías biológicas de las células bacterianas, también se inhibe la replicación de los ácidos

nucleicos y las funciones de las mitocondrias, provocando la muerte de las bacterias (Kailasa et al., 2019).

Otra hipótesis menciona que los niveles bajos de iones Ag^+ son muy sensibles a perturbar la función celular de las bacterias, lo que provoca la muerte significativa de bacterias; también se ha visto que los ROS se generaron debido a la acción fisicoquímica de las nanopartículas, aunque estos pueden formarse por oxidación fotoquímica de agua en presencia de catalizador (Kailasa et al., 2019). Los ROS generados provocan un estrés oxidativo significativo en el sistema celular de las especies bacterianas, alterando las funciones de las proteínas bacterianas y produciendo la muerte (Kailasa et al., 2019). Guzmán et al. (2019) menciona que se cree que la presencia de GC-AgNPs en la superficie de las bacterias provoca un aumento en la producción de ROS.

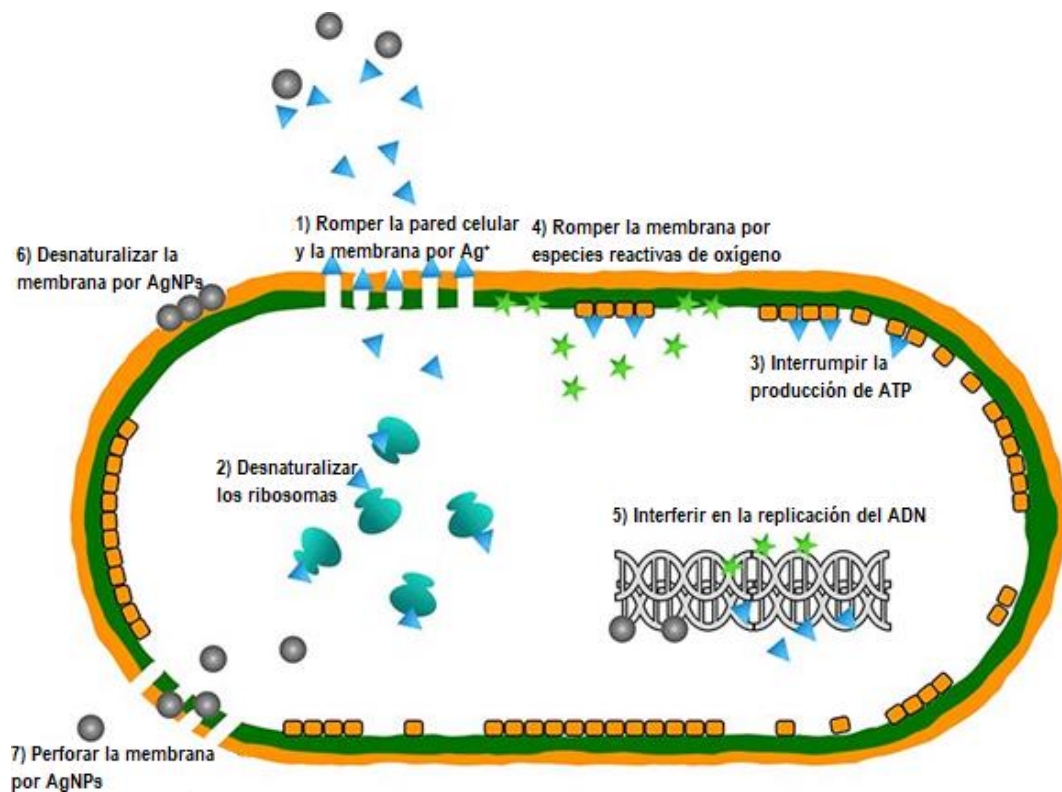
Yin et al. (2020) menciona que los iones de Ag^+ libres podrían provocar la desactivación de las enzimas relacionadas con la respiración celular, provocando la generación de los ROS y la interrupción de la generación del trifosfato de adenosina (ATP). Estos iones también pueden inhibir la síntesis de proteínas al desnaturalizar los ribosomas en el citoplasma (Yin et al., 2020). Las AgNPs presentan una alta afinidad al azufre y fósforo y al interactuar con los que están presentes en el ADN se podría causar problemas en la replicación del ADN, la reproducción celular o incluso provocar la muerte de los microorganismos (Yin et al., 2020).

Las AgNPs nanomolares muestran un alto grado de actividad antibacteriana, mientras que los iones Ag^+ micromolares exhiben actividades antibacterianas eficientes (Kailasa et al., 2019). El oxígeno provoca la oxidación de las AgNPs, generándose iones de Ag^+ a través de la quimisorción, estos últimos presentan una actividad antibacteriana prometedora en *Escherichia coli*, pero esta puede depender del grado de iones Ag^+ quimisorbidos y el tamaño de las nanopartículas (Kailasa et al., 2019). Las GC-AgNPs sintetizadas mostraron una potente eficacia antibacteriana y efectos tóxicos contra *E. coli* (Guzmán et al., 2019).

Las acciones antibacterianas de las AgNPs son las siguientes: (1) ruptura de la pared celular y la membrana citoplasmática, (2) desnaturalización de los ribosomas, (3) interrupción de la producción de ATP, (4) rotura de la membrana por ROS, (5) interferencia de la replicación del ADN, (6) desnaturalización de la membrana y (7) perforación de la membrana (Yin et al., 2020). En la figura 14 se puede ver un esquema de estas acciones.

Figura 14

Acciones antibacterianas de las AgNPs.

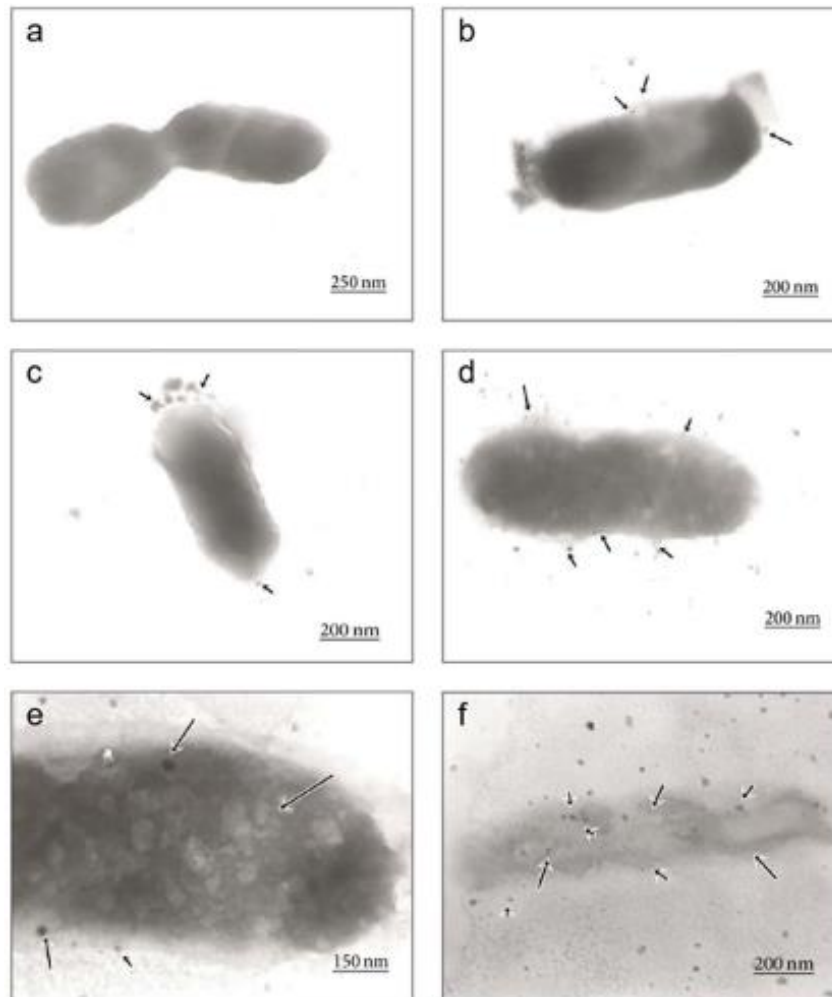


Nota: En la imagen se observan de forma esquemática las diferentes acciones antibacterianas de las AgNPs. Tomado de: (Yin et al., 2020).

En la siguiente figura se puede observar la secuencia de la alteración de la membrana celular de células de *Escherichia coli*, las imágenes se obtuvieron mediante TEM y se las tomaron a lo largo del tiempo, al inicio se tiene la célula bacteriana intacta y al final se puede observar la lisis celular a las 12 horas del experimento, las nanopartículas de plata usadas en este caso fueron sintetizadas con *Aspergillus niger* (Roy et al., 2019):

Figura 15

Secuencia de imágenes que muestran la actividad antibacteriana de AgNPs sintetizadas con *Aspergillus niger* frente a *E. coli*.



Nota: En la figura a se halla la célula de *E. coli* intacta; en la figura b se observa la adhesión de AgNPs en la pared celular de *E. coli* a 1 hora de iniciado el experimento; en la parte c se observa la rotura de la membrana celular a las 5 horas; en la parte d se observa la rotura completa de la pared celular y la membrana; en la figura e se observa la penetración de las AgNPs en la célula de a las 8 horas y finalmente en la figura f se observa la lisis celular a las 12 horas. Tomado de: (Roy et al., 2019).

Métodos de síntesis

Se han utilizado muchas técnicas para la síntesis de AgNPs mediante varios métodos, cada método tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo de la ruta de síntesis seleccionada y las condiciones experimentales se pueden obtener AgNPs de diferentes morfologías, tamaños y formas (Chouhan, 2018). La producción de nanomateriales puede llevarse a cabo mediante los siguientes métodos:

1. **Químicos:** son los más utilizados, algunos ejemplos son: deposición química de vapor, reducción química, síntesis solvotermal, hidrotermal, métodos sol-gel (Chouhan, 2018; Pulit-Prociak & Banach, 2016).
2. **Fotoquímicos:** utilizan dos enfoques principales, el fotofísico (de arriba hacia abajo) y el fotoquímico (de abajo hacia arriba); en el primer enfoque se preparan las nanopartículas mediante la fragmentación de metales a granel y en el segundo se generan a partir de precursores iónicos, las nanopartículas se producen de forma limpia (Chouhan, 2018). Las nanopartículas se forman por fotorreducción directa de un ion metálico utilizando intermediarios generados fotoquímicamente (por ejemplo: moléculas excitadas y radicales), también pueden formarse por fotoirradiación lo que permite fabricar las NPs en varios medios (por ejemplo: emulsiones, micelas de tensioactivo, películas de polímero, vidrios, células, etc.) (Chouhan, 2018).
3. **Físicos:** usados de forma tradicional, permiten obtener una gran cantidad en un solo proceso, algunos ejemplos son: deposición física de vapor, producción de películas delgadas, pulverización catódica de iones, la ablación con láser pulsado (Chouhan, 2018; Pulit-Prociak & Banach, 2016).
4. **Biológicos:** recientemente se están aplicando y presentan varias ventajas respecto a los métodos citados anteriormente, normalmente se utilizan para la producción de nanopartículas microorganismos (levaduras, hongos y bacterias, etc.) y partes de plantas

(hojas, frutos, látex, cáscara, flor, raíz, tallo, etc.) (Chouhan, 2018; Pulit-Prociak & Banach, 2016).

Generalmente los métodos químicos y físicos son costosos, dañinos y peligrosos por los reactivos químicos que usan, en cambio los métodos biológicos son rentables, ahorran energía y tienen protocolos amigables con el medio ambiente (Chouhan, 2018).

Síntesis verde

La síntesis verde, realizada con microorganismos o plantas, se basa en tecnología ecológica, amigable con el medio ambiente y de bajo costo (Bansod et al., 2015; Chouhan, 2018). Este método es muy simple, requiere menos tiempo y energía en comparación con los métodos físicos y químicos, las nanopartículas presentan una alta estabilidad (Chouhan, 2018). Una gran ventaja de este método según Chouhan (2018) es que existe una gran disponibilidad de recursos biológicos y se pueden usar de materiales biodegradables o de desecho.

Figura 16

Síntesis verde de nanopartículas metálicas



Nota: En la imagen se observan las diversas formas y tamaños de NPs metálicas usando microorganismos y extractos de tejidos vegetales. Tomado de: (Chouhan, 2018).

Las ventajas de la síntesis verde respecto a la síntesis química son (Ahmed & Mustafa, 2020):

1. Uso de materiales menos tóxicos y peligrosos y solventes ambientalmente benignos.
2. Es simple, rápida y rentable.
3. Consume menos energía y funciona en condiciones de operación moderadas.

4. Combina la potencia de las nanopartículas con los principios activos de la planta.

Roy et al. (2019) menciona que la síntesis de NPs mediante extractos de plantas es mucho más rápida que otras vías biológicas, además de que si el extracto vegetal usado presenta actividad antimicrobiana las NPs sintetizadas tendrán una actividad antimicrobiana mejorada.

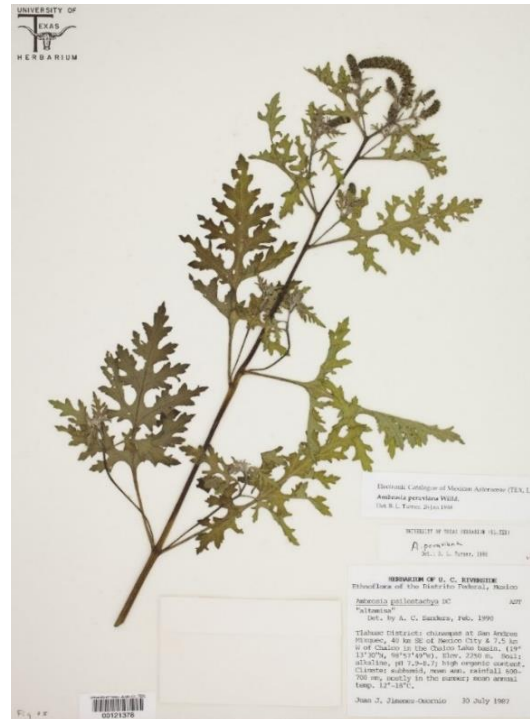
Planta de Marco (*Ambrosia peruviana*)

Las especies del género *Ambrosia* acorde con (Luebert & García, 2020) presentan capítulos unisexuales, los masculinos con los filarios (brácteas de la inflorescencia) fusionados y los femeninos, con los filarios espinosos o tuberculados, los mismos que se reúnen en capitulescencias espiciformes donde los capítulos masculinos se ubican en la porción superior y los femeninos se agrupan en la base; mientras que las espinas o tubérculos de los filarios de los capítulos femeninos se desarrollan en estado de fruto y se dispersan junto con los aquenios (Luebert & García, 2020). Su aparente capacidad para dispersarse por viento o agua les ha permitido como invasoras o colonizadoras en muchas regiones donde no eran nativas (Luebert & García, 2020).

También conocida como Altamisa, pertenece a la familia Asteraceae, orden Asterales y ha sido reportada por la medicina tradicional con potencial antibacteriano, antiparasitario, emoliente, emenagogo, analgésico, entre otros (Mesa Vanegas et al., 2017). Es una hierba de entre 4 y 8 cm de largo con una amplia distribución en el continente americano (desde México hasta América del sur) (Luebert & García, 2020; Yáñez C. et al., 2011).

Figura 17

Ambrosia peruviana



Nota: Imagen tomada de: (University of Texas Herbarium, 1990).

Esta la planta tradicionalmente en infusiones o bebidas para tratar infecciones, artritis, cólicos, regular el ciclo menstrual; también para contrarrestar el estreñimiento, alteraciones de la próstata, aliviar migrañas y dolores de cabeza, disminuir lesiones internas producidas por golpes y fracturas, evitar la formación de llagas y úlceras, propiciar la labor de parto, regular la presión arterial y aliviar los síntomas de picazón en la piel (Mesa Vanegas et al., 2017; Moya Castillo, 2017).

Se la ha usado en la etnoveterinaria para aliviar: inflamaciones, el moquillo, eliminación de parásitos externos como pulgas, nuches, garrapatas y ácaros en forma de baños en el ganado bovino (Mesa Vanegas et al., 2017). También es útil para el desarrollo de una agricultura sustentable, ya que los agricultores han considerado el uso de esta planta para contrarrestar las plagas comunes de huertos y cultivos, además las hojas de marco junto con el eucalipto, la santa

maría y la ortiga se usan para tratar el “mal aire” y hacer las llamadas “limpias” (Moya Castillo, 2017).

Acorde con Mesa Vanegas et al. (2017) se han realizado estudios fitoquímicos en *Ambrosia peruviana* los mismos que han detectado la presencia de monoles, dioles y sesquiterpenlactonas llamadas pseudoguaianolidos, los mismos se han identificado y caracterizado como peruvina, peruvina, psilostaquinas B y C, tetrahidroambrosina, entre otros. En el extracto de aceites esenciales de esta especie se ha identificado el γ -curcumeno (23,99 %), curcumeno (14,08 %), acetato de bornilo (10,35 %), camfor (5,03 %) y epóxido de oximene (4,79 %) (Yáñez C. et al., 2011). Se han detectado otros metabolitos a los cuales se les ha comprobado la actividad antioxidante como los flavonoides y glicósidos (Yáñez C. et al., 2011). También se ha reportado la presencia de alcaloides, taninos, glucósidos cardiotónicos, cumarinas, auronas, esteroides y saponinas en sus hojas; además de que también tiene efecto antiparasitario contra *Toxocara canis* (Guauque et al., 2010).

Toxicidad de las nanopartículas de plata

Se pueden encontrar dos hipótesis principales que explican los efectos tóxicos de las nanopartículas en los organismos vivos, la primera menciona que las actividades nocivas de las nanopartículas se deben a la liberación de iones metálicos; mientras que la segunda establece que la toxicidad es inducida por la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

Los radicales libres resultantes pueden dañar cualquier componente de la célula e iniciar la producción de un número cada vez mayor de especies reactivas de oxígeno (Pulit-Prociak & Banach, 2016). Estos radicales libres pueden: generar estrés osmótico al aumentar la permeabilidad de la membrana (oxidación de ácidos grasos ubicados en la membrana celular) e inhibir la actividad de las enzimas al unirse a ellas y cambiar la hélice del ADN provocando la muerte celular (Pulit-Prociak & Banach, 2016). La formación de mayores cantidades de especies

reactivas de oxígeno es inducida por la mayor superficie de las nanopartículas, además los nanomateriales pueden dañar la membrana celular, oxidar proteínas, ser genotóxicos e interferir con la conducción de energía (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

Equilibrar los riesgos y beneficios de los nanomateriales es fundamental para realizar estudios seguros y responsables de su desarrollo, debido a que se cree que la investigación sobre la toxicidad de los nanomateriales se queda atrás del deseo de su uso comercial; por ello es importante estandarizar la evaluación de la seguridad de los nanomateriales, lo que facilitaría la evaluación de la exposición a los nanomateriales y los riesgos derivados de su uso (Pulit-Prociak & Banach, 2016).

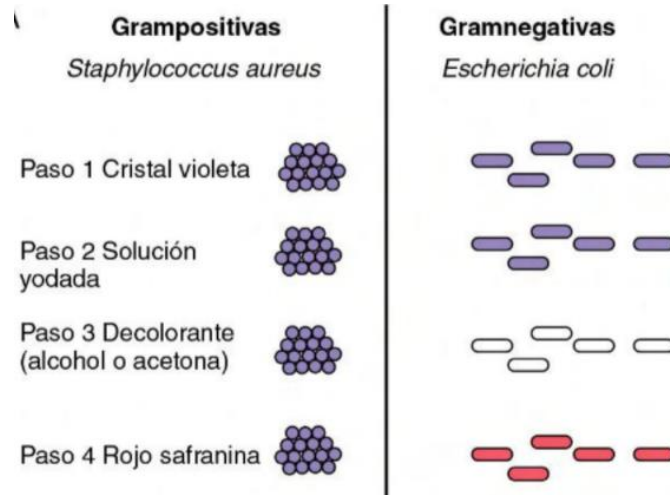
Análisis microbiológico

La microbiología estudia los organismos microscópicos que a menudo son unicelulares, o si son multicelulares, no tienen tejidos muy diferenciados, mediante el uso de diferentes técnicas para su aislamiento e identificación (Willey et al., 2008).

Las bacterias según Murray et al. (2014) son microorganismos unicelulares procariotas, de estructura simple con una reproducción asexual. Sin embargo, la pared celular que las rodea es compleja. Existen dos formas básicas: una pared celular Gram positiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular Gram negativa con una delgada capa de peptidoglucano (Murray et al., 2014). Debido a esto que en tinción Gram las Gram positivas permanecen de color violeta y las Gram negativas en color rojo, ya que estas últimas al tener una capa delgada de peptidoglucano no pueden retener el cristal violeta y se tiñen con el color de la safranina (Willey et al., 2008).

Figura 18

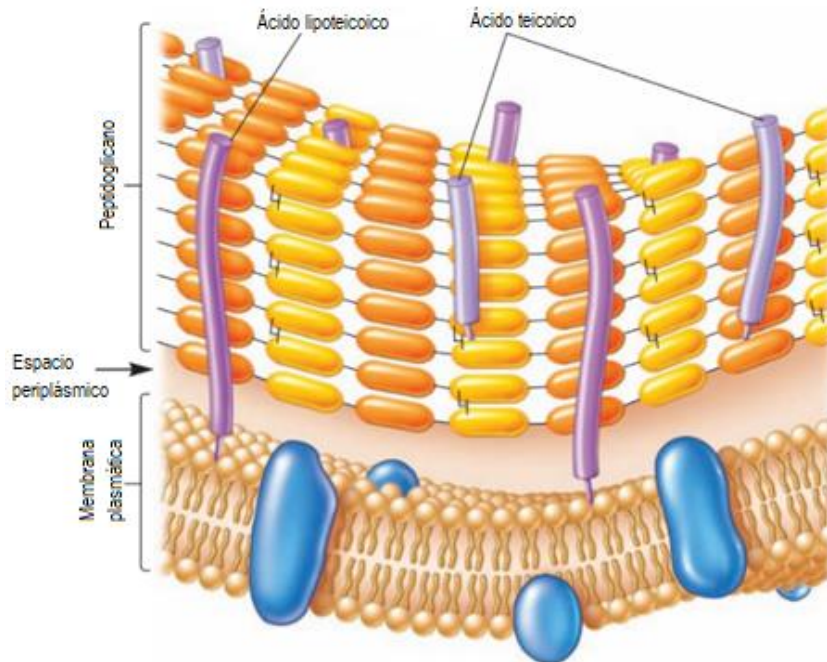
Pasos de la tinción Gram.



Nota: En la imagen se muestran las diferencias de la tinción Gram, tomando de referencia a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Tomado de: (Murray et al., 2014).

Figura 19

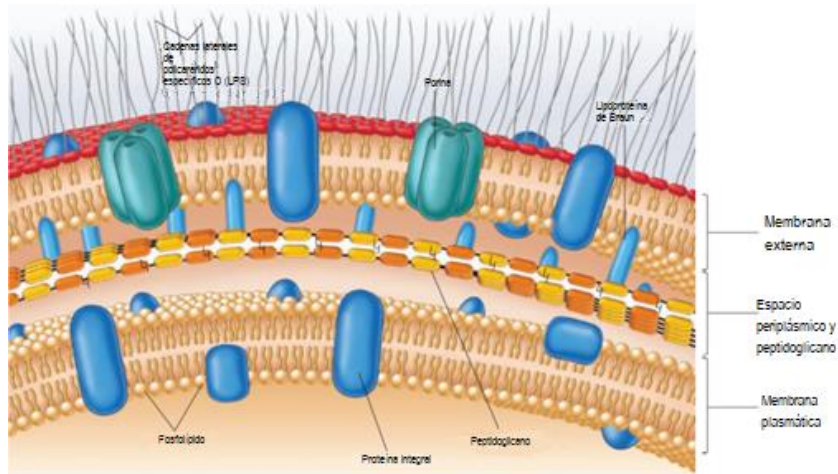
Estructura de la membrana de una bacteria Gram positiva.



Nota: Imagen tomada de: (Willey et al., 2008).

Figura 20

Estructura de la membrana de una bacteria Gram negativa.

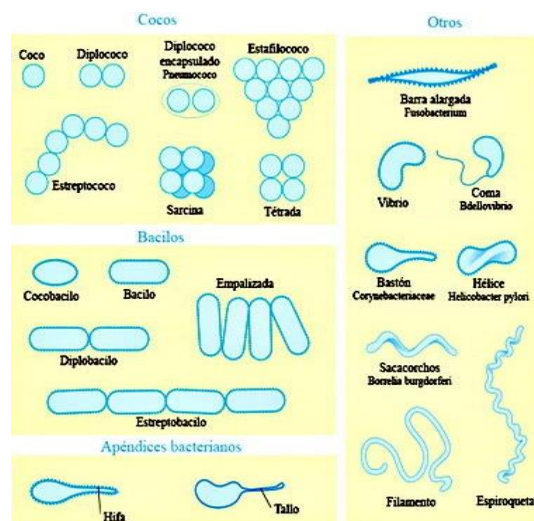


Nota: Imagen tomada de: (Willey et al., 2008).

Para clasificar a las bacterias de forma preliminar se utiliza su tamaño (de 1 a 20 μm o más), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas, formando cúmulos), en cambio para su clasificación definitiva se utiliza sus propiedades fenotípicas y genotípicas (Murray et al., 2014).

Figura 21

Morfología y agrupaciones bacterianas.



Nota: Imagen tomada de: (Lira Gómez, 2018).

Las bacterias se encuentran en muchos sitios del ambiente incluyendo el organismo humano y sus alimentos; aunque muchas son relativamente avirulentas, otras pueden provocar enfermedades potencialmente mortales, debido a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles (Murray et al., 2014).

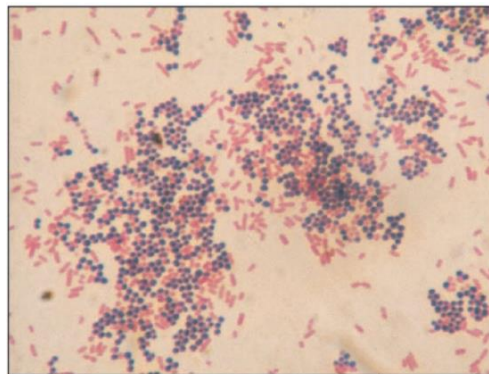
Escherichia coli

Es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae se le asocia a múltiples enfermedades (gastroenteritis, infecciones del tracto urinario, meningitis y sepsis) (Murray et al., 2014). Muchas cepas pueden producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia por ejemplo *Escherichia coli* O157 es la causa más frecuente de colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico (Murray et al., 2014).

Son bacilos gramnegativos anaerobios facultativos y oxidasa-negativos; su temperatura de incubación es de 40°C con un tiempo de generación de 0,35 horas, es mesófilo con un crecimiento óptimo entre 20 y 45°C, pero su temperatura óptima de crecimiento es de un rango entre 30 y 37°C (Murray et al., 2014; Willey et al., 2008).

Figura 22

Tinción Gram de una muestra



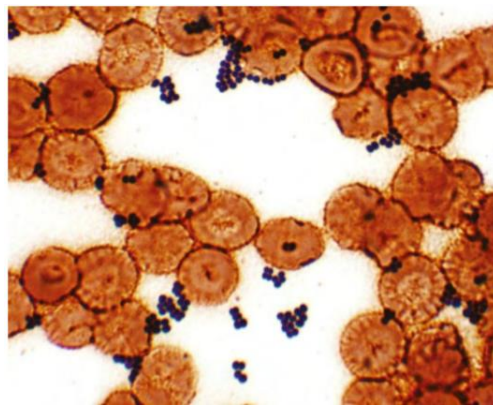
Nota: En la imagen se puede observar a *Staphylococcus aureus* en color violeta (Gram positivo) y *Escherichia coli* en color rojo (Gram negativo). Tomado de: (Willey et al., 2008).

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos que se desarrollan en un patrón similar a un racimo de uvas, aunque en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas (Murray et al., 2014). *Staphylococcus aureus* es el miembro más virulento y mejor conocido del género, forma parte de la flora normal de la piel y mucosas, su estudio es importante porque produce graves infecciones en pacientes hospitalizados y de forma extrahospitalaria en niños y adultos (Murray et al., 2014). SARM o *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina es la cepa más virulenta de *S. aureus* (Murray et al., 2014).

Figura 23

Tinción Gram de Staphylococcus aureus en un hemocultivo

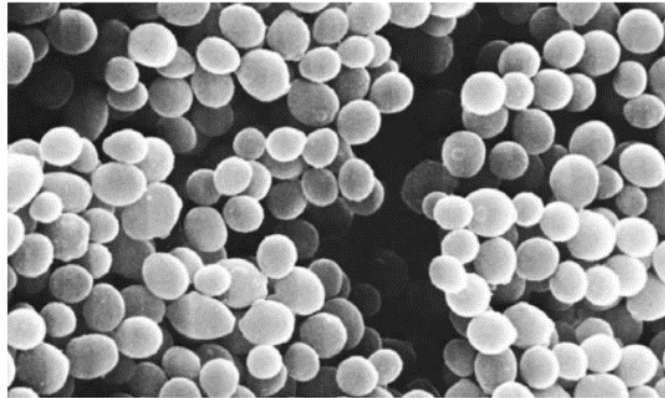


Nota: Imagen tomada de: (Murray et al., 2014)

Su temperatura de incubación óptima es de 37°C con un tiempo de generación de 0,47 horas (Willey et al., 2008). A continuación, se observan una imagen tomada con SEM de *Staphylococcus aureus*.

Figura 24

Staphylococcus aureus observado en SEM.



Nota: Imagen tomada de: (Willey et al., 2008).

Las colonias de *S. aureus* presentan un color amarillo o dorado por los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento y que dan el nombre a la especie, la cual es la más común presente en las personas (Murray et al., 2014). Produce la enzima coagulasa (algo útil para una prueba diagnóstica), otras especies de estafilococos no producen esta enzima por lo que son coagulasa-negativos; en agar sangre presenta una β -hemólisis (Murray et al., 2014), esto se observa en la siguiente figura:

Figura 25

Colonias de Staphylococcus aureus en una placa de agar de sangre de carnero.



Nota: Imagen tomada de: (Murray et al., 2014)

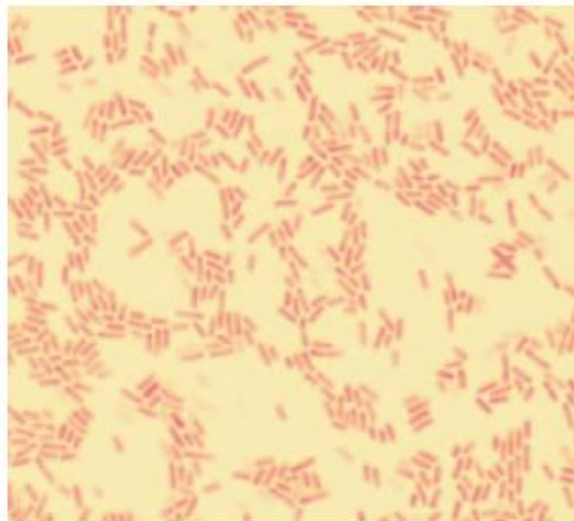
Pseudomonas aeruginosa

Este género consta de bacilos Gram negativos, móviles y aerobios, presentan una amplia distribución en el suelo, el agua, las plantas y los animales (Carroll et al., 2016). El principal patógeno del grupo es *Pseudomonas aeruginosa* la cual se presenta a menudo en pequeñas cantidades en la microbiota intestinal normal y la piel del ser humano, aunque su distribución es amplia en la naturaleza y suele encontrarse en todos los ambientes hospitalarios (Carroll et al., 2016; Murray et al., 2014).

Puede colonizar al ser humano, comportándose como saprofito, muchas de las infecciones son de carácter oportunista, tiene forma de bastón con un tamaño aproximado de $0,6 \times 2 \mu\text{m}$, se la observa como bacteria individual, en pares y, a veces, en cadenas cortas, tal y como se observa en la siguiente figura (Carroll et al., 2016).

Figura 26

Colonias de Pseudomonas aeruginosa con tinción Gram.



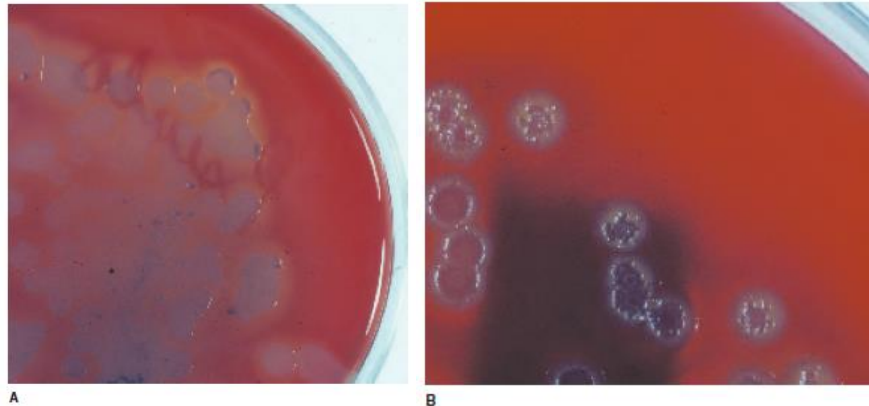
Nota: Imagen tomada de: (Carroll et al., 2016)

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo aerobio obligado que crece fácilmente en muchos tipos de medios de cultivo, algunas cepas presentan hemólisis, otras pueden producir ciertas sustancias con una pigmentación característica que se observa en el medio de cultivo como

piocianina (verde fluorescente), pioverdina (verde), piorrubina (rojo oscuro) o piomelanina (negro), esto se puede observar en las figuras 27 y 28 (Carroll et al., 2016).

Figura 27

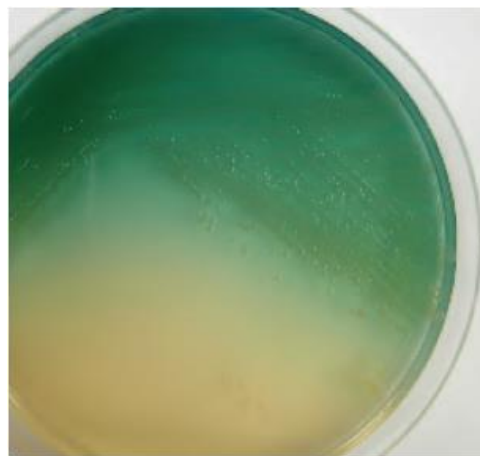
Colonias de Pseudomonas aeruginosa en placas de agar sangre.



Nota: Se puede observar la variación de la morfología de estas colonias, ya que en la figura A se observan colonias de color gris verdoso con hemólisis, mientras que en la figura B las colonias presentan un color plateado sin hemólisis. Tomado de: (Carroll et al., 2016).

Figura 28

Colonias de Pseudomonas aeruginosa en una placa de agar Mueller-Hinton.



Nota: se observa coloración verde azulada en la placa debido a la segregación de piocianina (azul) y pioverdina (verde). Tomado de: (Carroll et al., 2016).

Un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* puede originar múltiples tipos de colonias que presentan distintas actividades bioquímicas, enzimáticas y antimicrobianas, por lo que no es difícil saber si las estas colonias son diferentes cepas o si son variantes de la misma cepa (Carroll et al., 2016). Crece de forma óptima a una temperatura de entre 37°C y 42 °C con un tiempo de generación de 0,58 horas, es psicótrofo, es oxidasa positiva, no fermenta carbohidratos, y tiende a formar biofilms en las superficies (Carroll et al., 2016; Willey et al., 2008).

Método de difusión en agar con discos de Kirby-Bauer

La prueba de Kirby-Bauer, también llamada método de difusión en disco, es la prueba de susceptibilidad a los antibióticos más utilizada para determinar la mejor elección de antibióticos para tratar una infección (Student Health Center, 2019). También se la puede usar con otra sustancia que tenga el mismo efecto del antibiótico, se basa en la difusión de la sustancia de prueba desde los discos de filtro hasta los cultivos bacterianos lo cual genera una inhibición del crecimiento bacteriano medido en condiciones estándar (Kourmouli et al., 2018; Student Health Center, 2019).

Fue desarrollada por primera vez en la década de 1950, perfeccionada por W. Kirby y A. Bauer, luego estandarizado por la Organización Mundial de la Salud en 1961; la concentración de antibiótico que se difunde en el medio disminuye al aumentar la distancia desde la fuente (Reynolds, 2021). Para esta prueba se utiliza como medio de cultivo el agar Mueller-Hinton, el mismo que es inoculado de manera uniforme y aséptica con el organismo de prueba y posteriormente se colocan discos de papel de filtro impregnados con una concentración específica de un antibiótico particular o sustancia de prueba (Kourmouli et al., 2018; Student Health Center, 2019).

Se incuba la placa con el medio con el fin de que el organismo crezca, mientras la sustancia trata de inhibir el crecimiento; si este es susceptible, no habrá crecimiento alrededor del disco pudiéndose observar y medir una zona de inhibición para determinar la susceptibilidad a un

antibiótico para ese organismo en particular, tal y como se observa en la Figura 20 (Student Health Center, 2019). El organismo puede clasificarse como Resistente (R), Intermedio (I) o Susceptible (S) (Student Health Center, 2019). Cuanto más sensibles sean las bacterias a un antibiótico determinado, mayor será la zona de inhibición, la misma que se mide en milímetros (mm) con ayuda de una regla; si no se presenta zona de inhibición en los resultados se debe colocar el número cero (Reynolds, 2021).

Figura 29

Método de Kirby – Bauer aplicado con antibióticos.



Nota: Imagen tomada de: (Reynolds, 2021).

Es recomendable usar agar Mueller-Hinton porque asegura que las zonas de inhibición se puedan reproducir del mismo organismo y no inhibe las sulfonamidas, además de que debe tener solo 4 mm de profundidad para asegurar la estandarización y la reproducibilidad del estudio (Student Health Center, 2019). Pero este método también puede ser usado con agar nutriente obteniéndose buenos resultados (Supraja et al., 2018). El tamaño del organismo inoculado debe estandarizarse porque si el tamaño del inóculo es muy pequeño, la zona de inhibición será mayor de lo que en realidad es, y viceversa (Student Health Center, 2019). El método de Kirby-Bauer se puede utilizar para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas, pero

hay que recordar que la actividad antibacteriana está relacionada con el potencial de las NPs para liberar iones tóxicos y altamente difusivos en el medio de crecimiento del cultivo (Kourmouli et al., 2018).

Figura 30

Método de Kirby – Bauer aplicado con una solución de AgNPs en E. coli.



Nota: En la imagen se observa la zona de inhibición generada en un cultivo de *E. coli* con discos impregnados de una solución de AgNPs. Tomado de: (Kourmouli et al., 2018).

Capítulo 2: Metodología

Participantes

El presente estudio fue elaborado por Hyllary Rossalyn Borja Borja, con la colaboración de la ingeniera Katherine Pazmiño y la guía, como tutor del proyecto, del Dr. Alexis Debut, Ph.D. director del Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT); también la guía, como co-tutora del proyecto, de la Dra. Marbel Torres, Ph.D. directora del laboratorio de Inmunología y Virología. Su financiamiento fue otorgado por el Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales y el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – “ESPE”.

Zona de estudio

El proyecto constó de dos fases, las cuales son:

Obtención del material vegetal

El material vegetal se lo obtuvo en el Mercado Central localizado en la provincia Pichincha, cantón Quito, parroquia Centro Histórico, Barrio San Blas, Avenida Pichincha entre Manabí y Esmeraldas (coordenadas 0° 13' 12.61" Sur, 78° 30' 25.74" Oeste).

Trabajo de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura y al Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT), Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, provincia Pichincha, cantón Rumiñahui, autopista General Rumiñahui y S.N. (coordenadas 0° 18' 53.5" Sur, 78° 26' 36.5" Oeste).

Periodo de investigación

La investigación inició en octubre del 2021 y finalizó en agosto del 2022, con una duración aproximada de 10 meses.

Tratamiento del material vegetal

El material vegetal fue lavado cinco veces con agua potable, dos veces con agua purificada y una vez con agua destilada tipo I, con el fin de remover toda la suciedad presente. Posteriormente se lo puso a secar al ambiente durante 16 días en oscuridad. Luego se lo secó en una estufa a 60°C por 6 horas para eliminar toda el agua presente en el material. Finalmente se lo molió en un molino de bolas (Pulverisette 6 Classic Line, Fritsch, ver anexo A.3 figura a) a 200 rpm por 15 minutos, obteniéndose un polvo fino que se guardó en un desecador.

Obtención del extracto

Para la obtención del extracto se adaptó las metodologías usadas por Vu et al. (2019), Elez Garofulić et al. (2020) y Vázquez-González et al. (2020), el extracto se obtuvo colocando 2.5 g de hojas trituradas secas en 50 mL de agua destilada en el microondas (Anton Paar Multiwave PRO Microwave Reaction System, ver figura 31) a una potencia de 1200 W por 2 minutos. Posteriormente se lo filtró usando un cedazo y dos filtrados al vacío.

Figura 31

Microondas, Anton Paar Multiwave PRO Microwave Reaction System.



Caracterización del extracto

Se cuantificaron los flavonoides del extracto adaptando la metodología de Valenzuela Mena (2020). Se diluyó el extracto a varias concentraciones, se tomó 500 μL de cada una de estas soluciones, a cada una se le agregó 200 μL de una solución de AlCl_3 al 10% y se aforó con etanol absoluto a 5 mL; esta mezcla se agitó con vórtex y se almacenó en oscuridad, a temperatura ambiente por 30 minutos y finalmente se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 425 nm por triplicado, realizando diez lecturas por cada repetición.

Se hizo una curva de calibración de quercetina, mediante la cual se cuantificaron los flavonoides, para ello se siguió la metodología de Colina Ramos (2016) y de Valenzuela Mena (2020). Se hizo una solución madre de quercetina de 200 ppm para lo cual se mezclaron 0,005 gramos de quercetina dihidratada en 25 mL de etanol absoluto. A partir de esta solución se hicieron diluciones a las siguientes concentraciones: 1.5, 2, 4.5, 6, 7.5 y 9 ppm (Valenzuela Mena, 2020). Para la elaboración de la curva de calibración se tomaron lecturas a 425 nm en el espectrofotómetro UV-Vis. Con la siguiente fórmula se calculó la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina (μg de quercetina/mL de solución):

$$X = \frac{A_m - b}{m} \text{ [Ec.5]}$$

Donde:

X es la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina (μg quercetina / mL de solución)

A_m es la absorbancia de la solución muestra

b es la intersección de la recta

m es la pendiente de la recta

Para medir la capacidad antioxidante o actividad antioxidante se adaptó los métodos usados por Kumar et al. (2014b) y El Moussaoui et al., (2019). Se tomó una alícuota de 1 a 0,2 mL de extracto o control negativo (metanol absoluto) y 1 a 1,8 mL de agua destilada, se mezcló con 2 mL de la solución 0,2 mM de DPPH en metanol absoluto, la mezcla se agitó con vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro

UV-Vis a 517 nm, la actividad de eliminación de radicales libres se expresó como porcentaje de actividad de eliminación de radicales libres de DPPH (mL) con la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto de barrido (\%)} = 1 - \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del control}} \text{ [Ec.6]}$$

Síntesis de las AgNPs

Para sintetizar las AgNPs se adaptó el método usado por Morejón et al. (2018), se usó 20 mL de una solución de nitrato de plata (AgNO_3) que se goteo de forma uniforme en el de extracto de marco, usando una plancha de calentamiento y agitación con una agitación constante de 350 rpm.

Se hizo la optimización de la síntesis de AgNPs para obtener los parámetros adecuados, los mismos fueron: cantidad de extracto, concentración de nitrato de plata, temperatura, tiempo y pH. Para cada parámetro se consideró cuatro valores y cada síntesis se hizo por separado, variando solo un parámetro y manteniendo los otros parámetros restantes constantes. En la siguiente tabla se muestra los valores de prueba para cada parámetro:

Tabla 2

Parámetros analizados en la optimización de la síntesis de AgNPs.

Cantidad de extracto (mL)	Concentración de AgNO_3 (mM)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH
1	0,1	40 ± 1	6,14
1,5	0,5	45 ± 1	7
2	1	50 ± 1	8
2,5	2,5	55 ± 1	9

Caracterización de las AgNPs

Se adaptaron los métodos y técnicas usadas por Kumar et al. (2015) y Morejón et al. (2018), para la caracterización se realizaron varias pruebas, las cuales son: espectrofotometría UV-vis, DLS, XRD, SEM y TEM, se interpretaron los resultados de los mismos usando los programas

específicos para cada prueba, los cuales vienen integrados en los equipos utilizados. En cada prueba se preparó la muestra para su correcto análisis.

Espectrofotometría UV-Vis

Se referenció con los parámetros adecuados y se diluyó 50 μ L de muestra en 3 mL de agua destilada, utilizando una celda de cuarzo. Las mediciones se hicieron por triplicado utilizando el equipo Analytik jena SPECORD S 600 (figura 32).

Figura 32

Espectrofotómetro UV-Vis, Analytik jena SPECORD S 600.

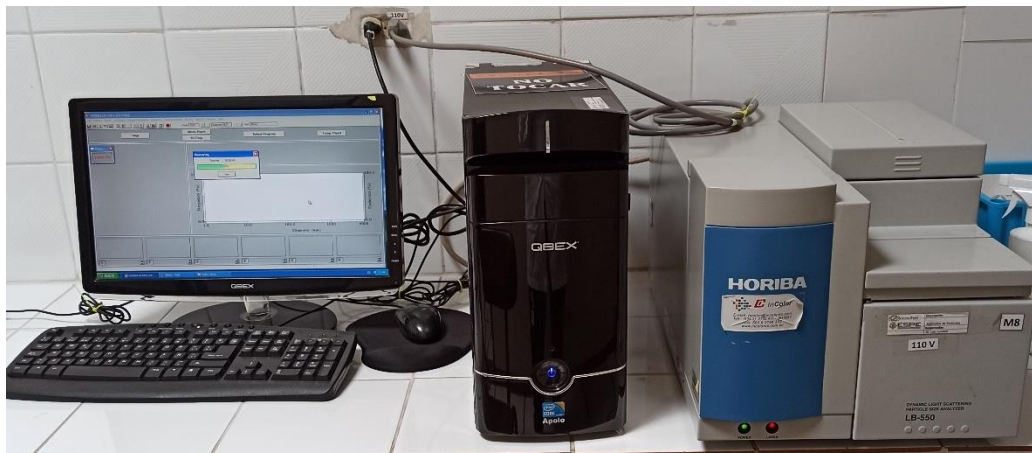


Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se referenció con los parámetros adecuados y se diluyó 250 μ L de muestra en 3 mL de agua destilada, utilizando una celda de cuarzo. Las mediciones se hicieron por triplicado utilizando el equipo HORIBA LB-550 Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer (figura 33).

Figura 33

Equipo HORIBA LB-550 Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer.

**Difracción de rayos X (XRD)**

Se centrifugó 14 mL de la muestra en tubos falcon a 6000 rpm por 30 min, se retiró el sobrenadante dejando 3 mL y se lo agitó constantemente con ayuda de un vórtex. Se secó los 3 mL de muestra en placas portaobjetos con ayuda de un calentador de placas, formando capas iguales de la muestra. Se analizó en el XRD realizando 4 repeticiones con el equipo PANalytical Empyrean (figura 34) operando en una configuración θ - 2θ (geometría Bragg-Brentano) y equipado con un tubo de rayos X de cobre ($K\alpha$ radiation $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) a 45kV y 40mA. Se hicieron los respectivos análisis de los difractogramas obtenidos, utilizando el software HighScore Plus versión 4.1.

Figura 34

Difractómetro de rayos X, PANalytical Empyrean.



Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Se tomó una muestra de 20 μL de las nanopartículas de plata sintetizadas y se las colocó en un portamuestra de aluminio para microscopía electrónica de barrido con doble cinta de carbono, posteriormente se dejó evaporar el líquido en una estufa a 40°C. El análisis se realizó dentro de la cámara de muestras del Microscopio Electrónico de Barrido SEM marca Tescan, Mira 3 equipado con un emisor de campo Schottky, usando el detector marca Bruker, X-Flash 6|30 con una resolución de 123 eV a Mn K α .

Figura 35

Microscopio electrónico de barrido Tescan, Mira 3.

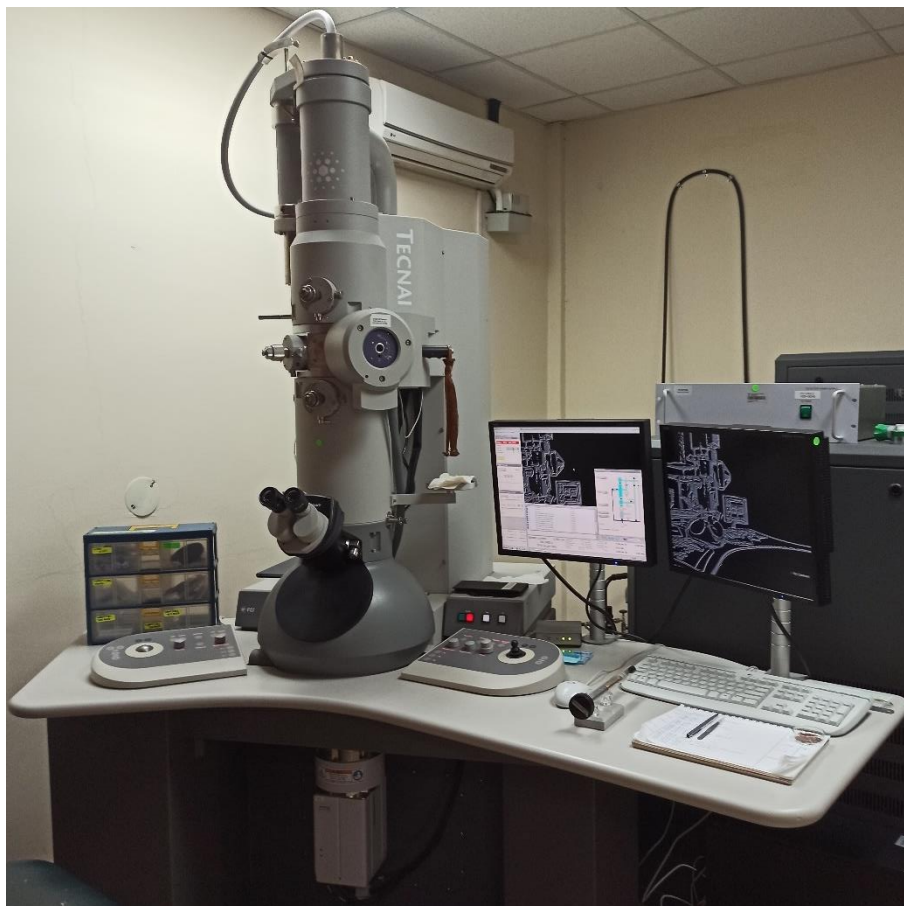


Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se tomó una muestra de las nanopartículas de plata sintetizadas de aproximadamente 5 μL y se las colocó en un grid para microscopía electrónica de transmisión (formvar/carbono, 300 mesh), se eliminó el solvente con papel filtro. Se hizo el análisis en el equipo FEI, Tecnai G2 Spirit Twin equipado con una cámara Eagle 4k HR a 80kV. Para calcular el diámetro de las nanopartículas de plata se utilizó el software FIJI.

Figura 36

Microscopio electrónico de transmisión FEI, Tecnai G2 Spirit Twin



Concentración de AgNPs

Se concentró las AgNPs en el rotavapor Buchi 23022A120. Se colocó 50 mL por unas 2 horas y 15 minutos, el baño maría estuvo a 23°C, con una rotación constante. Posteriormente se verificó mediante espectrofotometría UV-Vis la concentración de AgNPs, diluyendo 50 μ L de muestra en 3 mL de agua destilada, utilizando una celda de cuarzo (las mediciones se hicieron por triplicado).

Figura 37

Rotavapor Buchi 23022A120.



Formulación del jabón

Se adaptó el método planteado por Proaño (2021), se calentó la base para jabón de glicerina a baño maría cambiando a fase líquida, se mezclaron los principios activos y se lo colocó en un molde de silicona adecuado a temperatura ambiente hasta que solidifique.

Según Proaño (2021) el principio activo no debe superar el 5% del peso del jabón, por lo que se colocó el extracto y las AgNPs a esta concentración. Los jabones tuvieron un pH de 7 (neutro) el mismo se lo midió con ayuda de bandas para medir pH. Para la regulación del pH se usó una solución de ácido cítrico al 1%, colocándose 40 μ L de la solución por cada gramo del jabón para llegar al pH deseado.

Se elaboraron tres tipos de jabones, uno con nanopartículas de plata, otro solo con extracto vegetal y uno solo con glicerina, el peso de cada jabón fue de 3 gramos aproximadamente. Se utilizaron variaciones en la cantidad de AgNPs y de extracto, siendo estos: 1,25%, 2,5%, 3,75% y 5%.

Caracterización del jabón

Se derritió cada tipo de jabón elaborado, mediante baño maría a 70°C en un porta-muestras para XRD de silicio “zero background”, donde se trató de formar una capa uniforme y delgada y se dejó solidificar. Se hizo el análisis en el XRD realizando 4 repeticiones con el equipo PANalytical Empyrean operando en una configuración θ -2 θ (geometría Bragg-Brentano) equipado con un tubo de rayos X de cobre ($K\alpha$ radiation $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) a 45kV y 40mA (figura 34). Se hicieron analizar los difractogramas obtenidos en el software HighScore Plus versión 4.1.

Preparación de la técnica de difusión en agar

Se adaptó el método usado por Garibo et al. (2020), utilizando las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; como control negativo un jabón solo de glicerina y agua destilada estéril; en cambio como control positivo se utilizó un jabón comercial con triclocarbán y penicilina / estreptomicina (antibiótico).

Se preparó el medio de agar nutriente siguiendo las instrucciones del fabricante, se lo esterilizó y se lo colocó en placas Petri de vidrio, previamente esterilizadas. Una vez solidificado el medio, se inoculó las bacterias en la placa Petri a la que corresponde. Se dejó que estas crezcan por 24 horas.

Se diluyó 1 gramo de cada jabón (con AgNPs y extracto de marco a las concentraciones mencionadas anteriormente) en 5 mL de agua destilada estéril. Se colocó cada solución en discos estériles de 5 mm y estos se colocaron en las placas Petri previamente inoculadas (esto se lo hizo por triplicado). Se midió el halo de inhibición después de 72 horas.

Análisis Estadístico

Los datos en los que el trabajo sustentará la actividad antimicrobiana (proveniente de las nanopartículas de plata), la misma se obtendrá mediante experimentos controlados.

El diseño experimental será un Diseño Factorial compuesto por dos factores, los datos se sometieron a un ANOVA y un test de Duncan al 95% de confianza para comparar las medias y varianzas entre los distintos factores y sus interacciones.

Se utilizó el software Minitab 19 e InfoStat 2019e para el análisis de los datos y el software Microsoft Excel para la elaboración de las gráficas.

Hipótesis de investigación

H1: El jabón con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (*Ambrosia peruviana*) presenta mayor actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* respecto al jabón sin nanopartículas.

H0: El jabón con nanopartículas de plata y extracto de marco (*Ambrosia peruviana*) presenta menor actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* respecto al jabón sin nanopartículas.

Operatividad de las variables

La operatividad de las variables y su respectivo factor a determinar se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 3

VARIABLES A MEDIR DURANTE LA FASE DE EXPERIMENTACIÓN.

Objetivos	VARIABLES	Factor a determinar
Elaborar un jabón sólido de glicerina enriquecido con nanopartículas de plata sintetizadas en extracto de marco (<i>Ambrosia peruviana</i>).	pH	Escala de 1-14
Obtener y caracterizar el extracto acuoso de marco (<i>Ambrosia peruviana</i>).	Temperatura	Grados Celsius (°C)
Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) mediante una síntesis fitoquímica con extracto de marco (<i>Ambrosia peruviana</i>).		
Evaluar la actividad antibacteriana del jabón frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el método de difusión en agar.	Tiempo	Horas (h)
Evaluar la actividad antibacteriana del jabón frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el método de difusión en agar.	Tamaño del halo de inhibición	Milímetros (mm)

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Caracterización del extracto

La extracción de metabolitos de plantas vía microondas es un nuevo método innovador que se está aplicando actualmente (Elez Garofulić et al., 2020). Este requiere menos tiempo para obtener un extracto vegetal, además de que permite una buena extracción de componentes fitoquímicos como lo son los flavonoides (Elez Garofulić et al., 2020; Wu et al., 2021). Según Saifullah et al., (2019) se encontró la mayor cantidad de flavonoides al usar potencias de 960 W y 1200 W, pero esto puede depender de la especie de planta con la que se trabaje, ya que en el estudio de Wu et al., (2021) se encontró que a altas potencias puede disminuir el rendimiento. Otro factor importante es la temperatura, pero en el microondas solo se puede controlar un parámetro, ya sea temperatura o potencia (Saifullah et al., 2019), en este caso se controló la potencia. Según Wu et al., (2021) el aumento en la temperatura es beneficioso para la extracción de flavonoides, pero un tiempo prolongado no lo es. En este caso se escogió un tiempo corto el cual fue de 2 minutos que fue apropiado para el caso según la metodología que se adaptó.

De la cuantificación de flavonoides se obtuvo la siguiente curva de calibración:

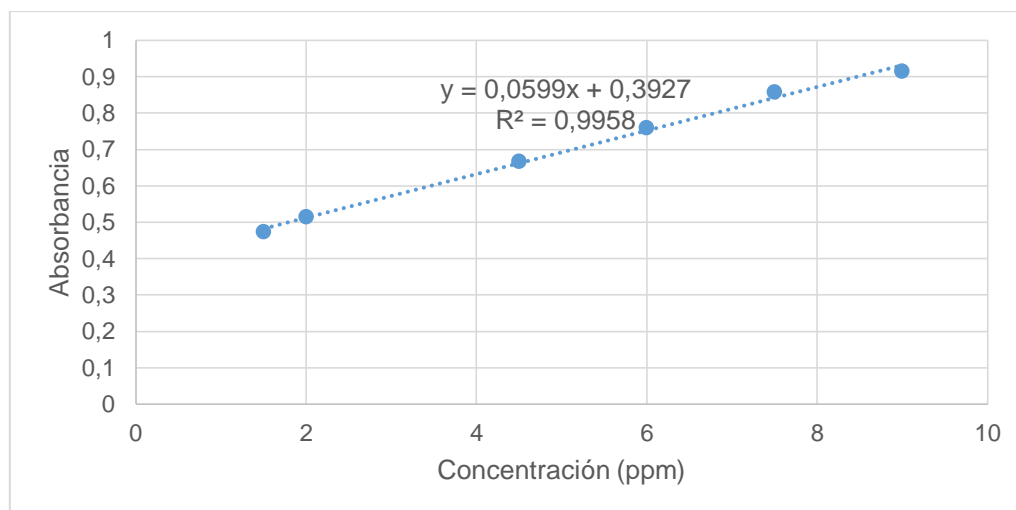
Tabla 4

Datos de la curva de calibración de quercetina

Concentración (ppm)	Absorbancia a 425 nm (promedio)
1,5	0,0876
2	0,1167
4,5	0,2905
6	0,3909
7,5	0,4962
9	0,6603

Figura 38

Curva de calibración de quercetina.



La ecuación de la recta obtenida es la siguiente:

$$y = 0,0599x + 0,3927$$

Para el cálculo de la concentración de flavonoides se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración}_{\text{flavonoides}} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - 0,3927}{0,0599} \text{ (}\mu\text{g Quercetina/mL de solución) [Ec.7]}$$

Obteniéndose los resultados que se observan en la tabla 5, en las figuras 38 y 39 se observa de forma gráfica los resultados obtenidos y se observa que no hay un error significativo en los datos obtenidos. Conforme aumenta la concentración de extracto aumenta la concentración de flavonoides. A una concentración de 0,1 g/mL la concentración de flavonoides fue de 5,8181 μg de Quercetina/mL solución, una cantidad menor a la obtenida por Novillo Logroño & Chamorro Rodríguez (2020) en donde se obtuvo la máxima cantidad de 6,57 μg Quercetina/mL solución, pero esta fue de un extracto etanólico (etanol al 76%) y en extracto metanólico la cantidad máxima obtenida fue de 5,99 μg Quercetina/mL solución para el extracto de *Ambrosia arborescens* a una concentración de 0,1 g/mL. En el estudio de Guauque et al. (2010) se encontró una notoria presencia de flavonoides en el extracto acuoso de *Ambrosia peruviana* utilizando una prueba

cualitativa con el reactivo de Shinoda, aquí se detectó más cantidad de flavonoides en el extracto etanólico que en el acuoso.

Tabla 5

Resultados de la concentración de flavonoides

Concentración de Extracto (g/mL)	Repetición	Concentración de Flavonoides (μg Quercetina/mL solución) (promedio por repetición)	Concentración de Flavonoides (μg Quercetina/mL solución) (promedio total)
0,0025	R1	0,472	0,4542
	R2	0,4407	
	R3	0,4499	
0,005	R1	1,9943	2,0109
	R2	2,0255	
	R3	2,0127	
0,0075	R1	3,9356	3,9573
	R2	3,9746	
	R3	3,9616	
0,01	R1	5,8267	5,8181
	R2	5,8045	
	R3	5,8232	
0,025	R1	8,3139	8,2033
	R2	8,076	
	R3	8,2202	

Figura 39

Diagrama de cajas de la concentración de flavonoides.

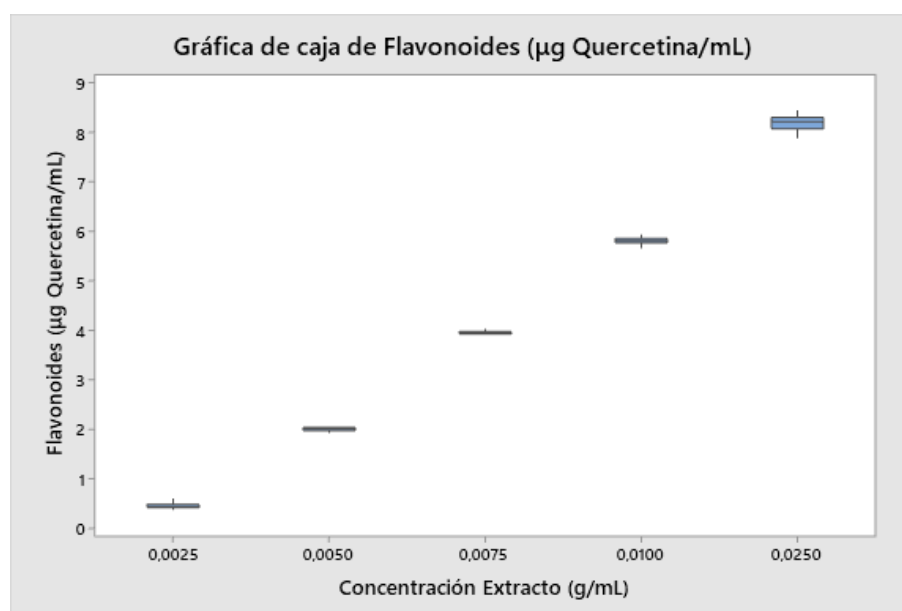
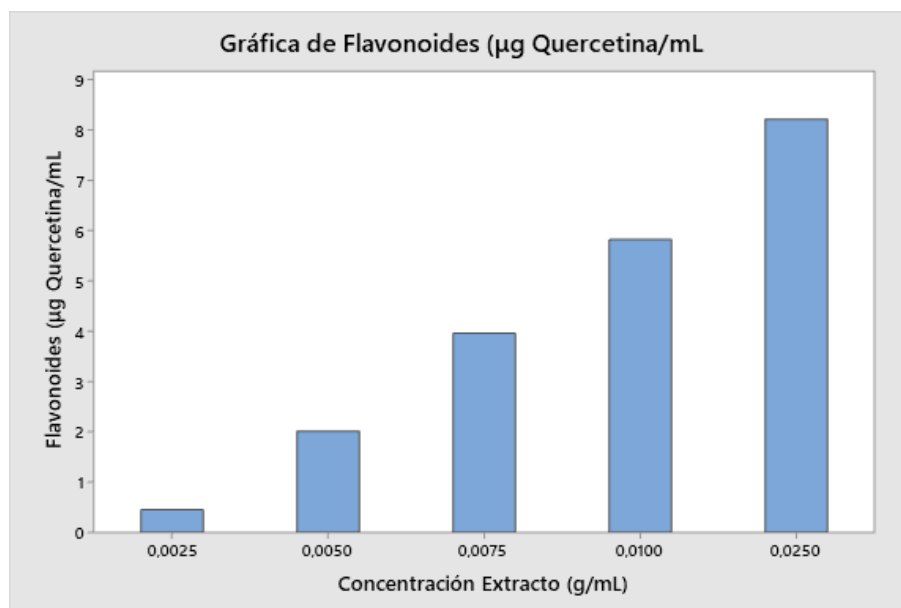


Figura 40

Resultados de la concentración de flavonoides.



En el estudio de la actividad antioxidante se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto del barrido (\%)} = 1 - \frac{\text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \times 100 \quad [\text{Ec.8}]$$

Los resultados de la actividad antioxidante se los observan en la tabla 6 y de forma gráfica en las figuras 40 y 41, se observa que el error obtenido es muy pequeño en los datos obtenidos. Conforme aumenta el volumen de muestra aumenta la actividad antioxidante (expresada como efecto del barrido). En el estudio de Novillo Logroño & Chamorro Rodríguez (2020) se realizó una variación en la concentración del DPPH utilizando como unidades partes por millón (ppm), variando la concentración desde 2 ppm a 10 ppm, aumentando la actividad antioxidante conforme aumenta esta concentración, se encontró la mayor actividad antioxidante en el extracto etanólico (etanol al 76%) variando desde 2 ppm de DPPH con una actividad antioxidante de 49,78% a 10 ppm de DPPH con una actividad de 82,07% en *Ambrosia arborescens*. Los resultados obtenidos por Fernandez Delgado (2019) en el extracto acuoso de *Ambrosia peruviana* fueron de 89,92 mM de Trolox Eq./ 1 g de muestra seca, esto se lo obtuvo al realizar una curva de calibración con

BHT (Butilhidroxitolueno) o Trolox, una solución estándar para cuantificar la capacidad antioxidante.

Tabla 6

Resultados de la actividad antioxidante

Volumen de la muestra (mL)	Repetición	Actividad Antioxidante (%) (promedio por repetición)	Actividad Antioxidante (%) (promedio total)
0,2	R1	14,3392	14,0975
	R2	14,0201	
	R3	13,9331	
0,4	R1	16,4412	16,6668
	R2	16,6452	
	R3	16,9139	
0,6	R1	22,7572	23,025
	R2	22,9823	
	R3	23,3355	
0,8	R1	25,6293	25,8896
	R2	25,9203	
	R3	26,1192	
1	R1	30,6625	30,7199
	R2	30,7134	
	R3	30,7838	

Figura 41

Diagrama de cajas de la actividad antioxidante.

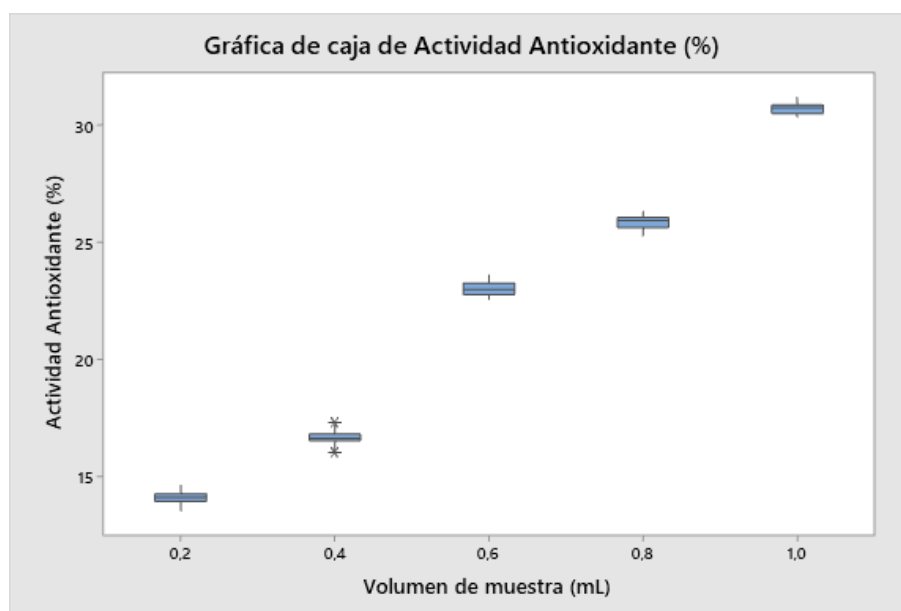
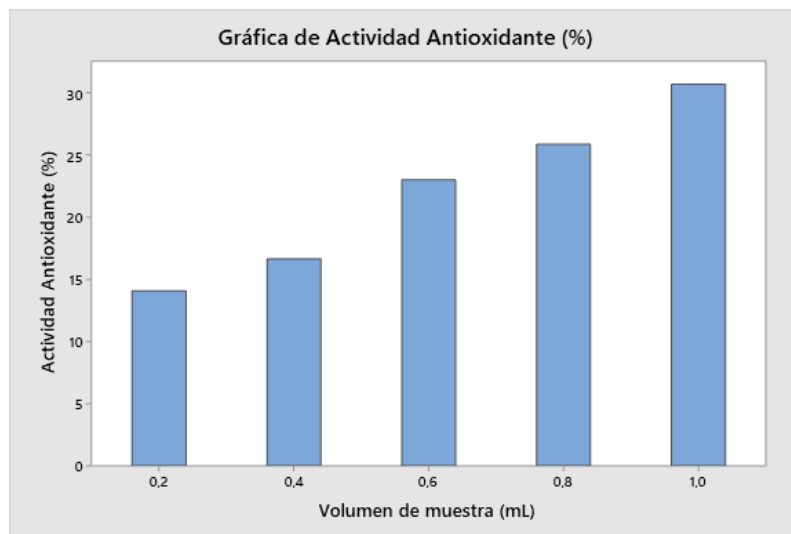


Figura 42

Resultados de la actividad antioxidante.

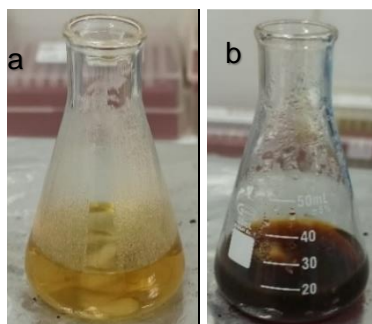


Síntesis de las AgNPs

Al formarse las nanopartículas de plata hubo un cambio en la coloración de la solución, la solución presentó un color inicial café claro (figura 43a) que cambió a un color café oscuro (figura 42b), lo que brinda un indicio de la formación de AgNPs. Este cambio en la coloración se ha observado en el extracto de *Ambrosia arborescens* (Morejón et al., 2018) y en el de *Clinacanthus nutans* (Mat Yusuf et al., 2020) en donde también se oscureció el color inicial de la solución, ambas plantas son ricas en flavonoides.

Figura 43

Síntesis de AgNPs en extracto de marco



Nota: En la figura (a) se observa la apariencia antes de la formación de AgNPs y en la figura (b) la apariencia después de la formación de AgNPs

Caracterización de las AgNPs

Para la optimización de la síntesis se utilizaron las técnicas de Espectrofotometría UV-Vis y DLS que permitieron identificar los parámetros apropiados para la síntesis de AgNPs. En cada uno de los análisis se hizo tres lecturas y se mostró como resultado el promedio de las mismas. Una vez identificados las mejores condiciones de síntesis se hicieron los análisis de XRD, SEM, EDS y TEM con el mejor resultado obtenido. De acuerdo con Akintelu et al. (2020) la concentración del extracto de la planta, el pH, el tiempo de la síntesis, la concentración de la sal de plata (como el AgNO_3) y la temperatura son condiciones apropiadas para la optimización para la síntesis de AgNPs; y estas se evaluaron.

Efecto del tiempo

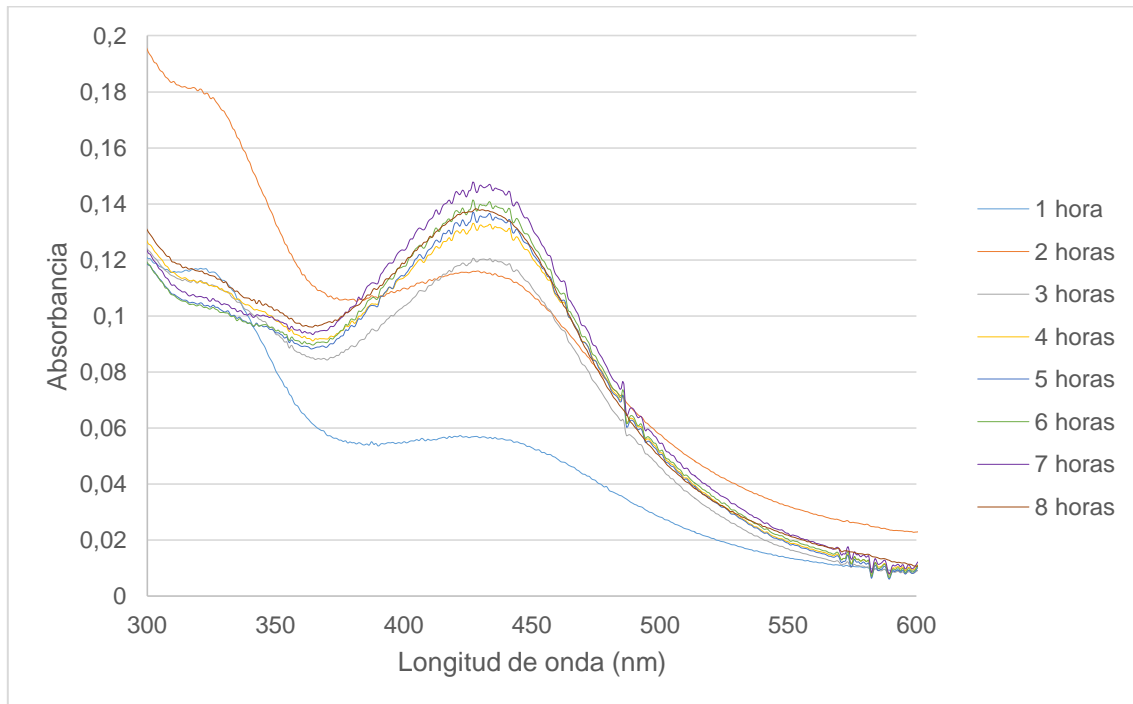
Se realizó la síntesis manteniendo constantes todos los parámetros menos el tiempo, se tomó una alícuota de 500 μL cada hora por 8 horas y se analizó en el espectrofotómetro (diluyendo 50 μL en 3 mL) y en el DLS (diluyendo 250 μL en 3 mL), obteniéndose que el mejor resultado es a las 7 horas, tal y como se observa en la figura 44. Acorde con Akintelu et al. (2020) el tiempo de la síntesis depende de los otros factores de optimización, pero también de los metabolitos presentes en el extracto vegetal.

Se observa que conforme pasa el tiempo la absorbancia aumenta hasta llegar a las 7 horas, pasado ese tiempo disminuye la absorbancia. De acuerdo con Mat Yusuf et al. (2020) conforme aumenta el tiempo de reacción se da un aumento de la intensidad de la absorbancia de la longitud de onda y esto se debe al aumento del número de nanopartículas formadas a partir de la reducción de iones de plata y biomoléculas presentes en la solución acuosa del extracto vegetal. Aunque Domenech Gordillo (2017) menciona que una disminución de la absorbancia en un tiempo posterior puede deberse a una aglomeración de las nanopartículas sintetizadas.

A una longitud de onda de 427 nm se obtuvo una absorbancia de 0,1477. Esta longitud de onda ratifica la presencia de AgNPs, ya que según Guzmán et al. (2019) la absorbancia máxima para estas nanopartículas está dentro del rango de 380 nm a 480 nm.

Figura 44

Espectros observados en las AgNPs sinterizadas variando el tiempo.



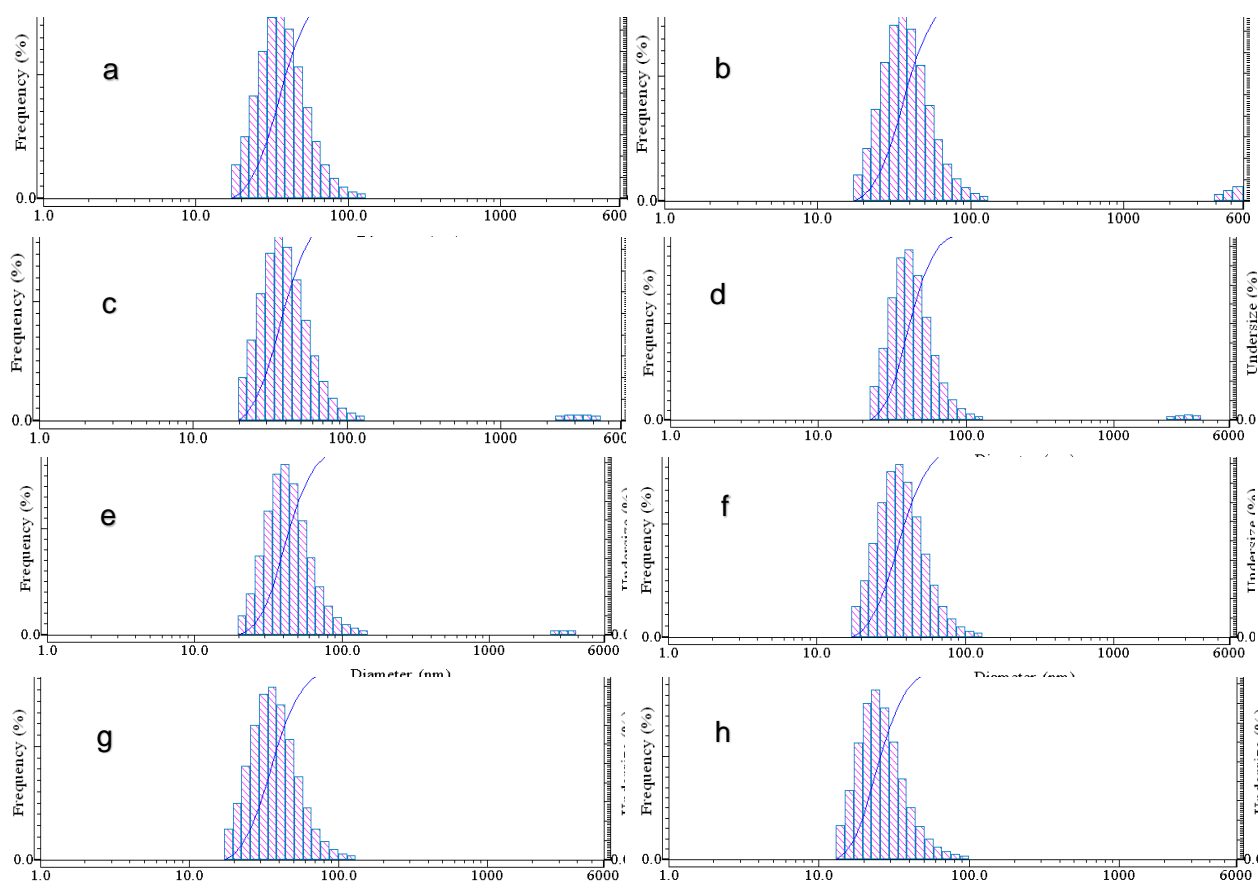
En DLS se pudo observar la disminución del tamaño de las nanopartículas a lo largo del tiempo (figura 45). A la primera hora se tuvo un diámetro promedio de aproximadamente $585,2 \text{ nm} \pm 1455,47 \text{ nm}$, en la segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta hora los diámetros fueron de aprox. $199,73 \text{ nm} \pm 688,17 \text{ nm}$, $111,13 \text{ nm} \pm 468,53 \text{ nm}$, $92,37 \text{ nm} \pm 413,57 \text{ nm}$, $80,63 \text{ nm} \pm 363,83 \text{ nm}$ y $36,2 \text{ nm} \pm 14,8 \text{ nm}$ respectivamente; pero el mejor resultado se obtuvo a las 7 horas con un diámetro promedio de $32 \text{ nm} \pm 14,7 \text{ nm}$. Según Mat Yusuf et al. (2020) conforme aumenta el tiempo de reacción se da un aumento de la cantidad de AgNPs sintetizadas, por lo que va disminuyendo el tamaño de las NPs obtenidas.

Todas las nanopartículas obtenidas son menores a 114,5 nm con un 64,55% que oscilan entre 19,1 y 38,7 nm. A las 8 horas hubo un pequeño aumento del diámetro promedio a $33,93 \text{ nm} \pm$

14,43 nm, esto pudo deberse a una aglomeración de las nanopartículas; algo que Domenech Gordillo (2017) menciona como una posible razón.

Figura 45

Diagramas observados del análisis en DLS a lo largo del tiempo (a. 1 hora, b. 2 horas, c. 3 horas, d. 4 horas, e. 5 horas, f. 6 horas, g. 7 horas y h. 8 horas).



Efecto de la cantidad de extracto

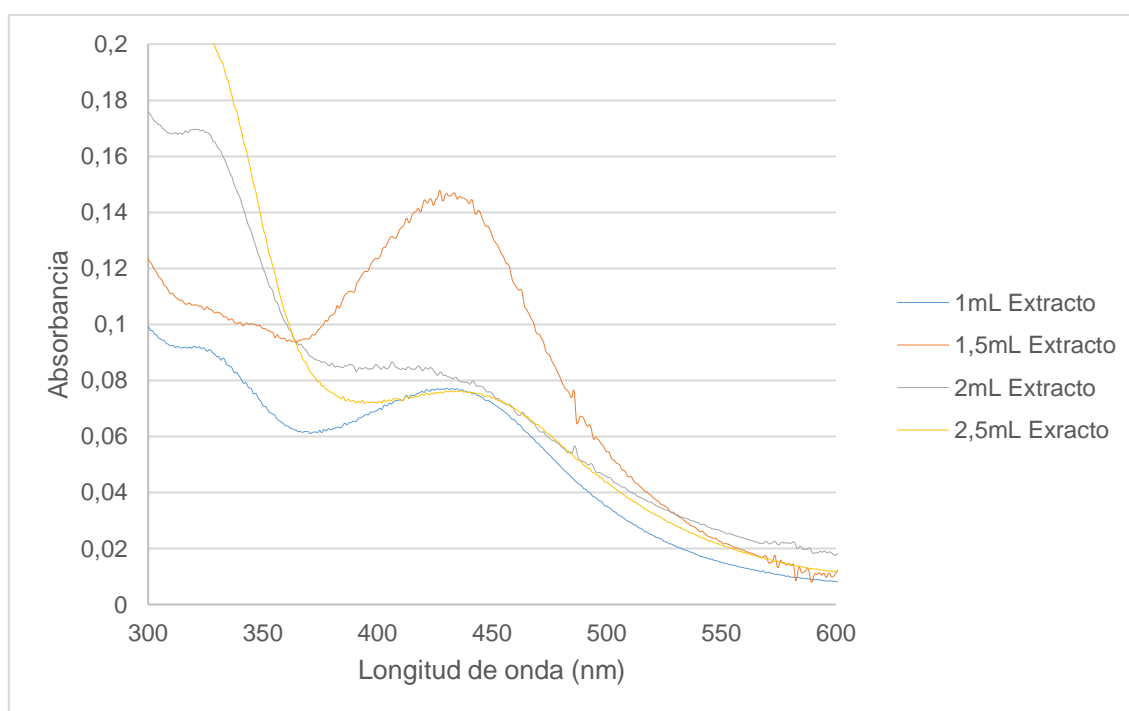
Se realizó la síntesis manteniendo variando la cantidad de extracto, se pudo observar que conforme aumenta la cantidad de extracto aumenta la absorbancia, pero al pasar 1,5 mL esta disminuye, siendo esta cantidad la idónea para la síntesis (figura 46). Esto se corrobora acorde a lo que Mat Yusuf et al. (2020) menciona, ya que también se observó un comportamiento similar con el extracto de otra planta rica en flavonoides. Un aumento en la nitidez de la curva es signo de la formación de AgNPs esféricas (Mat Yusuf et al., 2020). Pero es de suma importancia

entender que esto depende mucho de los componentes del extracto (Akintelu et al., 2020; Mat Yusuf et al., 2020).

A una longitud de onda de 427 nm se obtuvo una absorbancia de 0,1477, la misma que se halla dentro del rango que Guzmán et al. (2019) propone. En este caso 1,5 mL fue la cantidad idónea para la síntesis, algo que coincide con lo que Amarasinghe et al. (2020) utilizó que fue una proporción 1:10 entre la cantidad de extracto y la de la solución de AgNO_3 .

Figura 46

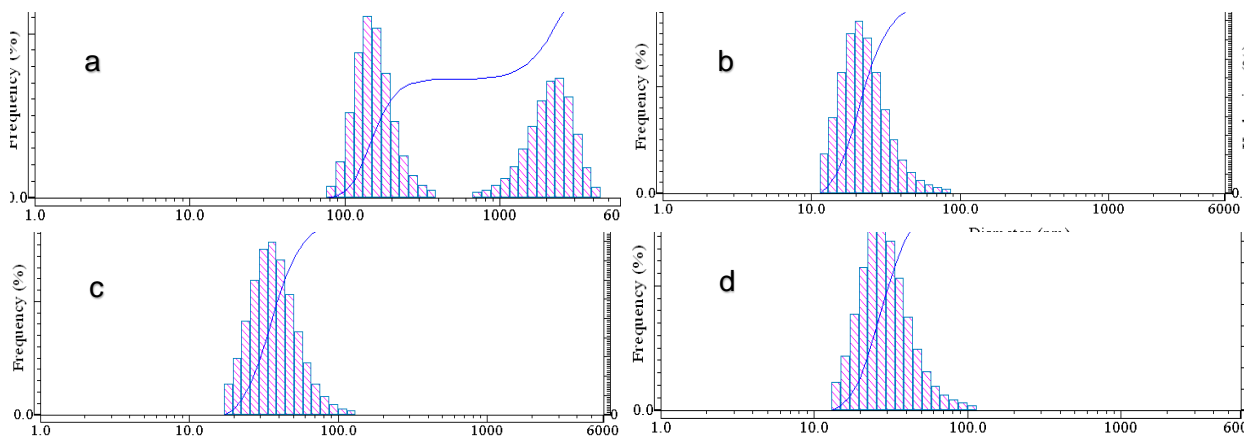
Espectros observados en las AgNPs sintetizadas variando la cantidad de extracto



En el caso del DLS se observaron varios tamaños, con las cantidades de 1 mL, 2 mL y 2,5 mL se obtuvieron los tamaños de $1080,27 \text{ nm} \pm 1269,73 \text{ nm}$, $25,73 \text{ nm} \pm 10,87 \text{ nm}$ y $32,07 \text{ nm} \pm 14,07 \text{ nm}$ respectivamente. Pero el mejor resultado fue con 1,5 mL de extracto con un tamaño de $32 \text{ nm} \pm 14,7 \text{ nm}$ (figura 47b). Acorde con Mat Yusuf et al. (2020) al encontrarse la cantidad de extracto apropiada se reduce el tamaño de las NPs.

Figura 47

Diagramas observados del análisis en DLS variando la cantidad de extracto (a. 1 mL, b. 1,5 mL, c. 2 mL y d. 2,5 mL).



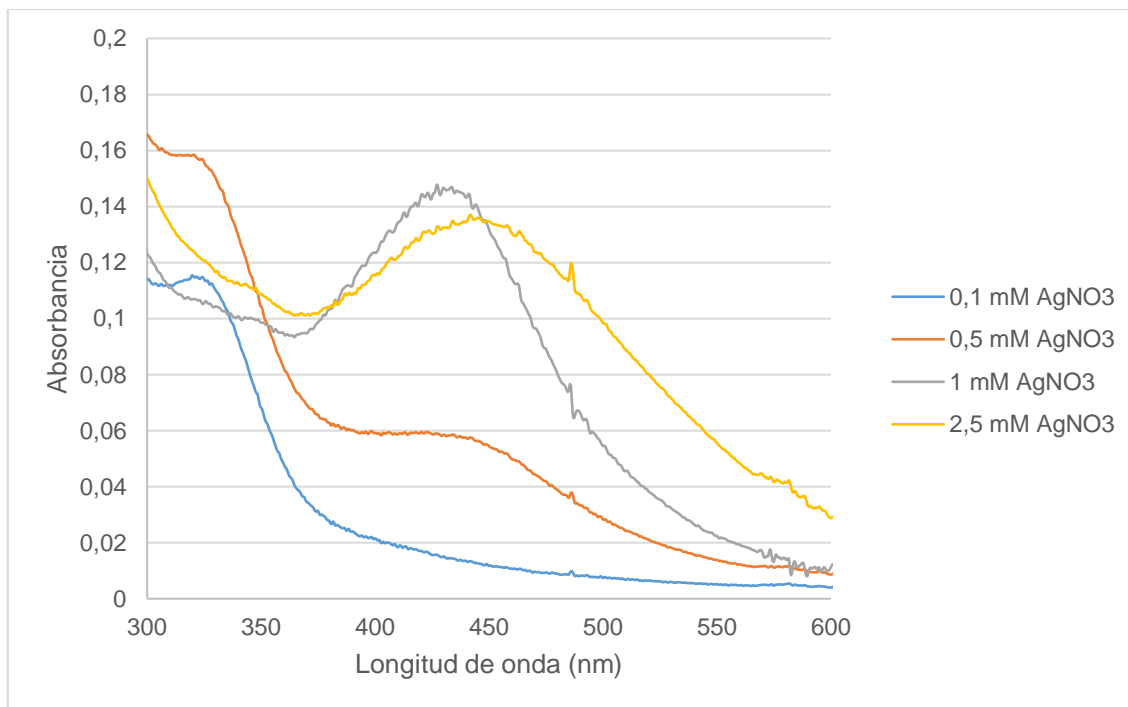
Efecto de la concentración de nitrato de plata

Al variar la concentración de nitrato de plata se pudo observar un aumento de la absorbancia al aumentar la concentración, pero al pasar 1 mM el pico se desplaza conforme se observa en la figura 48, por lo que la concentración adecuada es la de 1 mM. Según Akintelu et al. (2020) la concentración apropiada de la solución de la sal de plata para una síntesis verde oscila entre 1 y 5 mM; pero Hussain et al. (2017) menciona que la concentración de sal de plata puede variar de 0,25 a 10 mM y la concentración óptima es de 1 mM.

Aumentar la concentración de AgNO_3 aumenta el rendimiento de las NPs, pero un aumento superior a 10 mM puede generar una deposición de AgNO_3 en las AgNPs y su inestabilidad (Hussain et al., 2017). Esto depende mucho del extracto vegetal que se use (Akintelu et al., 2020; Mat Yusuf et al., 2020). Estas son las posibles razones por las que se observó el desplazamiento del pico a mayores concentraciones de AgNO_3 . A 427 nm se obtuvo una absorbancia de 0,1477, esta longitud de onda se halla dentro del rango que Guzmán et al. (2019) menciona.

Figura 48

Espectros observados en las AgNPs obtenidas al variar la concentración de AgNO_3 .

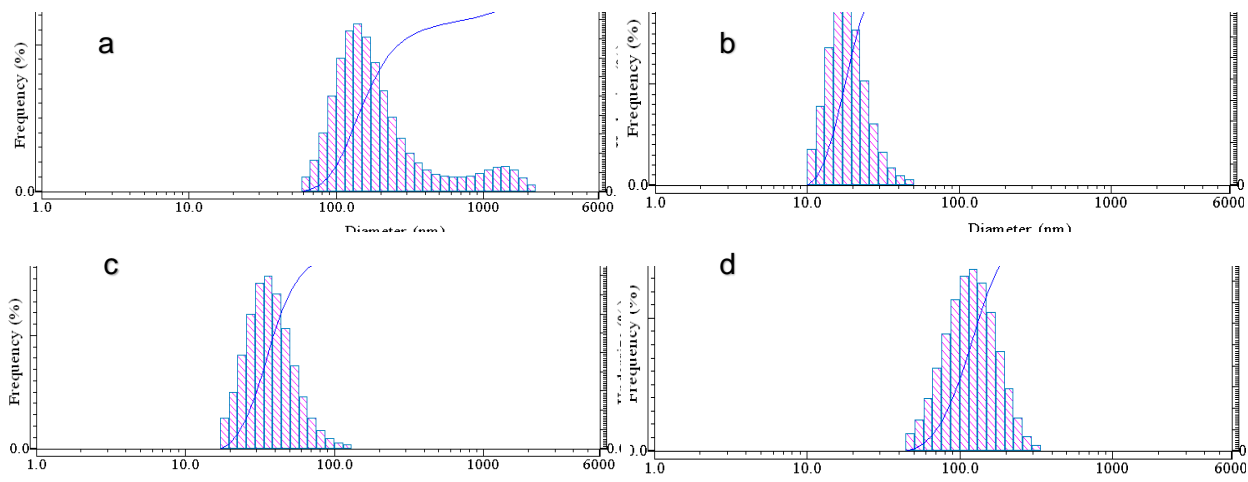


En el análisis DLS se observaron varios tamaños, $151,933 \text{ nm} \pm 597,8 \text{ nm}$, $19,133 \text{ nm} \pm 6,37 \text{ nm}$ y $126 \text{ nm} \pm 52,73 \text{ nm}$ para las concentraciones de 0,1 mM, 0,5 mM y 2,5 mM de AgNO_3 respectivamente.

El mejor resultado se dio a una concentración de AgNO_3 de 1 mM fue de $32 \text{ nm} \pm 14,7 \text{ nm}$ (figura 49c). Esto se corrobora con lo que Akintelu et al. (2020), Hussain et al. (2017) & Mat Yusuf et al. (2020) mencionan que el aumento de la concentración puede generar precipitación de la sal de plata, lo que altera el tamaño de las AgNPs porque la sal precipita en las nanopartículas de plata, además de que su forma deja de ser regular.

Figura 49

Diagramas observados del análisis en DLS variando la concentración de AgNO_3 (a. 0,1 mM, b. 0,5 mM, c. 1 mM y d. 2,5 mM).



Efecto de la temperatura

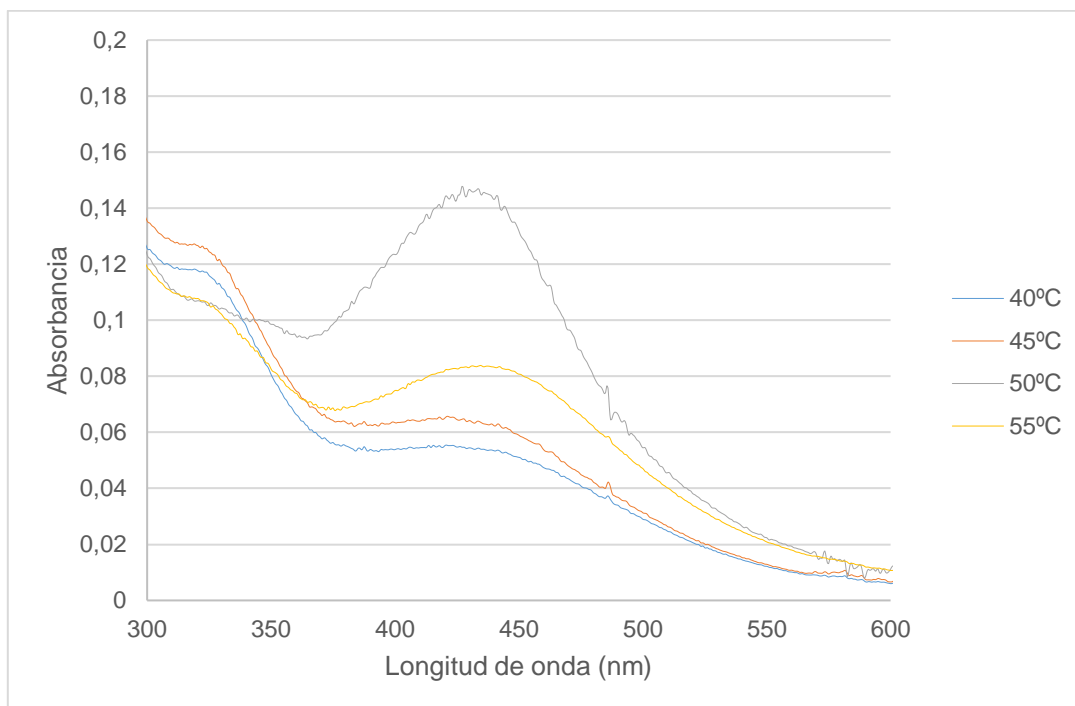
Al variar la temperatura se pudo observar un aumento de la absorbancia al incrementar la temperatura hasta los 50°C , ya que al aumentar más la temperatura la absorbancia disminuye, aquí se tomó el rango de $\pm 1^\circ\text{C}$ en cada una de las temperaturas estudiadas, por lo que la temperatura adecuada es de $50^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (figura 50). De acuerdo con Mat Yusuf et al. (2020) la producción de AgNPs aumenta conforme aumenta la temperatura. Aunque Akintelu et al. (2020) menciona que una temperatura ambiente es mejor para una síntesis fitoquímica, esto depende mucho de los metabolitos que están presentes en el extracto. En el caso de la síntesis de AgNPs obtenidas con extracto de *Ambrosia arborescens* se utilizó la temperatura de $50^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, la cual fue la óptima para la síntesis (Morejón et al., 2018).

A una temperatura de $55^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ hubo un desplazamiento del pico y ensanchamiento del mismo, aunque la absorbancia disminuyó. Esto coincide con lo Hussain et al. (2017) menciona, una alta temperatura genera picos anchos, mientras que una baja temperatura produce picos agudos que indican que las AgNPs son de tamaño uniforme. Las AgNPs que generan un pico ancho son de

un diámetro mayor que las que provienen de un pico agudo (Mat Yusuf et al., 2020). A una longitud de onda de 427 nm se obtuvo una absorbancia de 0,1477, esta longitud de onda está dentro del rango que Guzmán et al. (2019) menciona como normal para AgNPs.

Figura 50

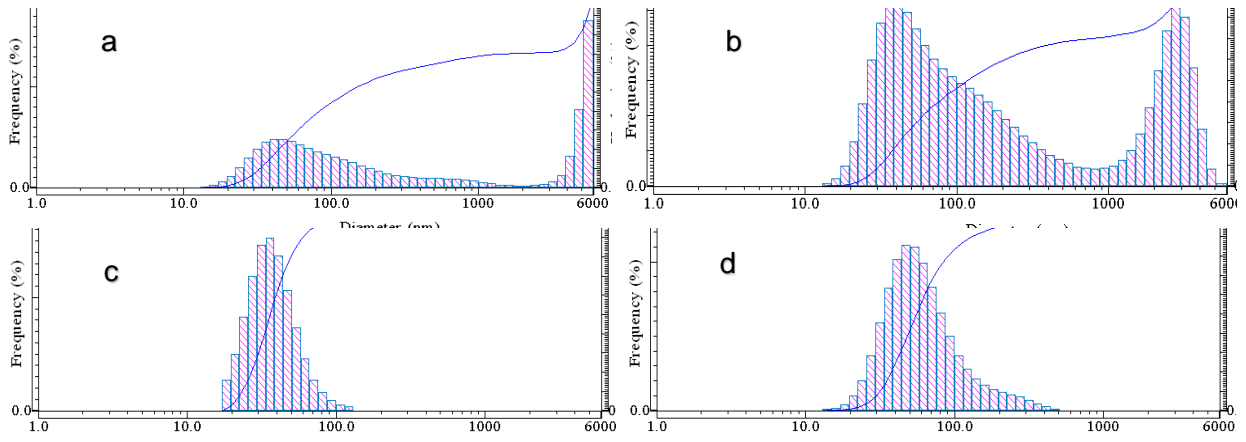
Espectros observados en las AgNPs sintetizadas variando la temperatura.



Hubo serias variaciones en el diámetro promedio de acuerdo al análisis DLS, para las temperaturas de 40°C, 45°C y 55°C, y son de 129,23 nm \pm 2337,17 nm, 113,07 nm \pm 1350,7 nm y 75,23 nm \pm 61,77 nm respectivamente. El mejor resultado se obtuvo a una temperatura de 50°C \pm 1°C, con un diámetro de 32 nm \pm 14,7 nm (figura 51c). Acorde a lo que Hussain et al., (2017) & Mat Yusuf et al. (2020) mencionan que a esta temperatura las AgNPs sintetizadas presentan un tamaño uniforme y menor.

Figura 51

Diagramas observados del análisis en DLS variando la temperatura (a. 40°C, b. 45°C, c. 50°C y d. 55°C).



Efecto del pH

El incremento de pH se hizo con soluciones 0,1 N y 1 N de hidróxido de sodio, el pH se midió con un pH metro, el pH inicial (sin la variación) fue de 6,141. Se pudo observar que al incrementar el pH aumenta la absorbancia, pero al pasar el valor de 7,042 esta disminuye y el pico se ensancha (figura 52). Según Vanlalveni et al. (2021) en la síntesis de AgNPs en extracto de hoja de *Ziziphus jujuba* se observó que el valor de absorbancia aumenta de forma lineal al incrementar el pH de 4 a 9, esto significa que la tasa de formación de AgNPs aumenta al pasar de un medio ácido a uno básico. La presencia de bandas más anchas es un indicativo de un aumento en el tamaño de las partículas; pero si estas son más estrechas, indica una disminución del tamaño de las partículas (Mat Yusuf et al., 2020).

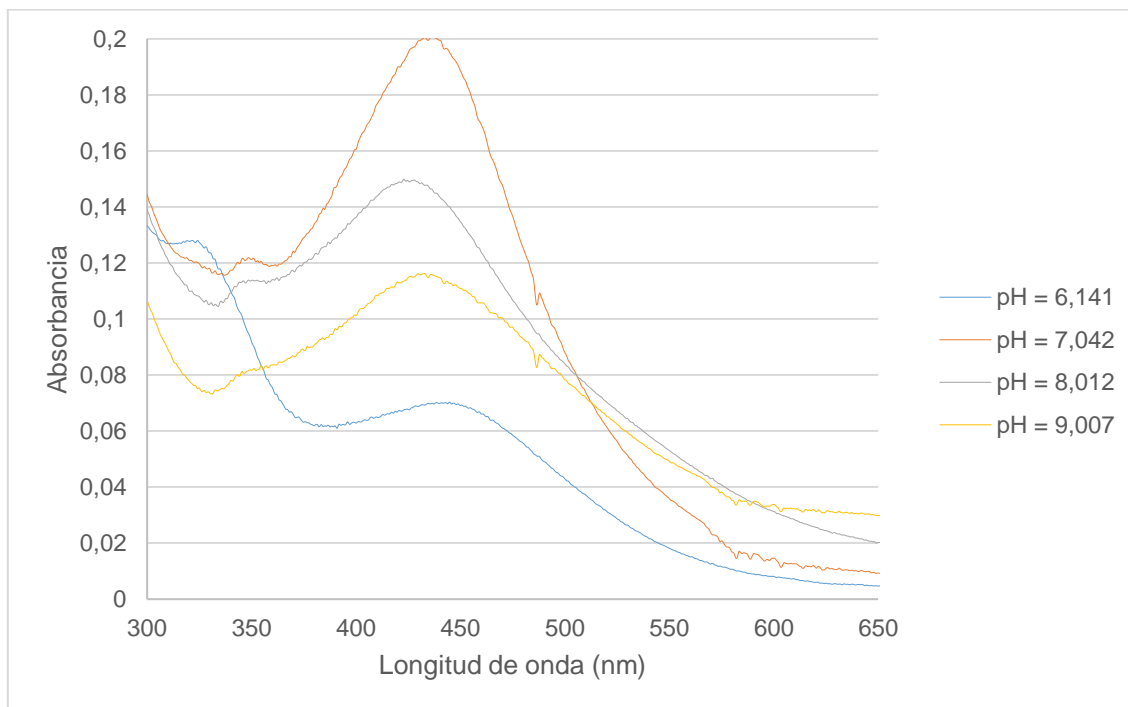
La mejor síntesis se dio con un valor de pH de 7,042. Acorde con Akintelu et al. (2020) & Vanlalveni et al. (2021) en un pH neutro se da una rápida formación de AgNPs y una reducción total de Ag^+ a Ag^0 , posiblemente en pH neutro y básico se da la ionización de grupos fenólicos presentes en el extracto de hoja. Es importante mencionar que a un pH básico existe la posibilidad de precipitación de $AgOH$ (hidróxido de plata) que debe evitarse, por lo que la condición óptima

para la preparación de AgNPs con el tamaño y la estabilidad deseados es un medio neutro (Vanlalveni et al., 2021).

A una longitud de onda de 436,5 nm se obtuvo una absorbancia de 0,2009, esta longitud de onda está dentro del rango apropiado para las AgNPs que Guzmán et al. (2019) menciona. Además Mat Yusuf et al. (2020) menciona que se puede predecir la forma de las NPs acorde a la longitud de onda donde se halla la mayor absorbancia, siendo esféricas en un rango de 400 a 490 nm, en forma de pentágono entre 500 y 590 nm, y triangulares en el rango de 600 a 700 nm. Por lo que de acuerdo a lo mencionado anteriormente se puede afirmar que las AgNPs obtenidas son esféricas.

Figura 52

Espectros observados en las AgNPs sintetizadas variando el pH.

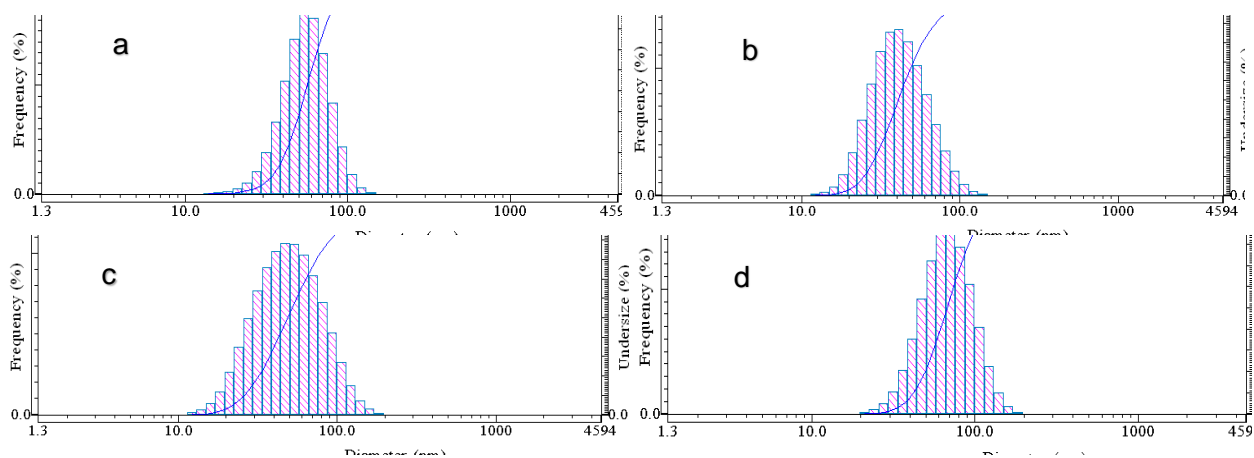


En el análisis DLS se obtuvieron varios valores de diámetro promedio a las diferentes condiciones de pH que fueron $57 \text{ nm} \pm 19,9 \text{ nm}$, $54,47 \text{ nm} \pm 24,5 \text{ nm}$ y $71,5 \text{ nm} \pm 26,53 \text{ nm}$ aprox. para un pH de 6,141, 8,012 y 9,007 respectivamente. El mejor resultado se obtuvo a un pH de 7,042 con un diámetro de $44,73 \text{ nm} \pm 20,8 \text{ nm}$ que se observa en la figura 53b. Esto corrobora lo

mencionado por Vanlalveni et al. (2021), ya que se obtuvo un tamaño de NPs estables y de menor tamaño.

Figura 53

Diagramas observados del análisis en DLS variando el pH (a. pH 6,141, b. pH 7,042, c. pH 8,012 y d. pH 9,007).

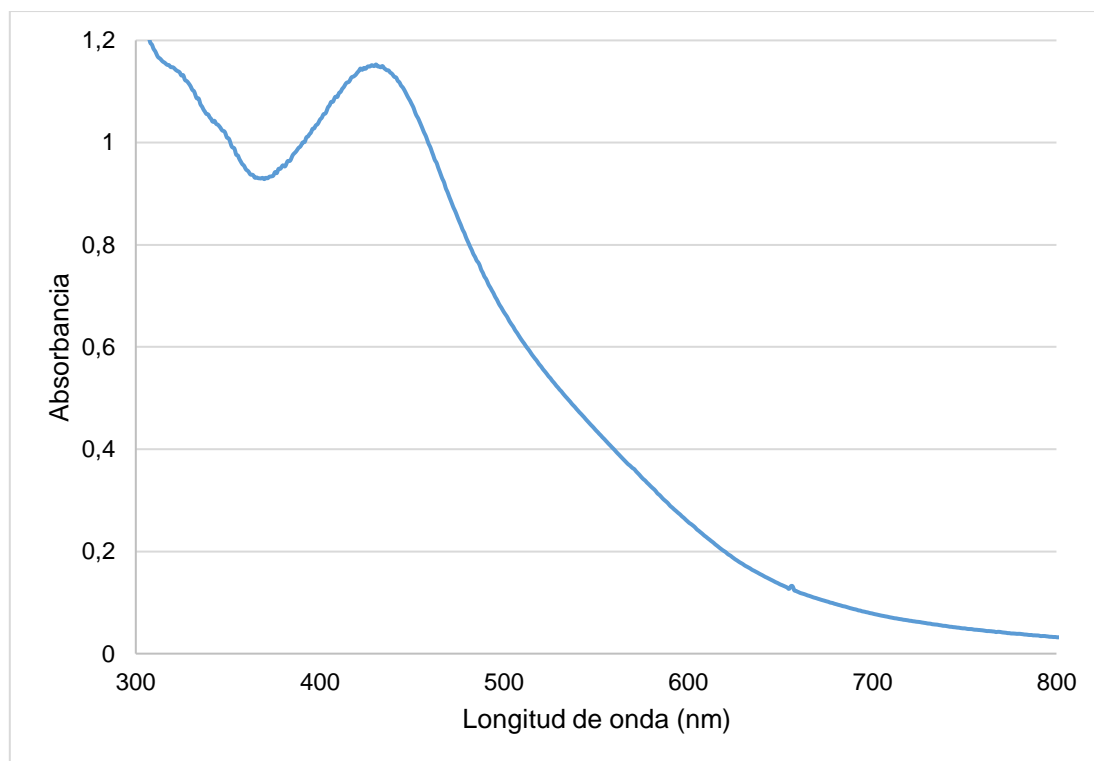


La mejor síntesis se dio con una solución de nitrato de plata a una concentración de 1 mM, con 1,5 mL de extracto de marco a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 horas, acorde a los resultados obtenidos de la optimización. Según Akintelu et al. (2020) & Mat Yusuf et al. (2020) este procedimiento de optimización es de suma importancia y los valores hallados para cada condición son los que se debe hallar de forma experimental para encontrar la mejor metodología de obtención de AgNPs.

Luego de la concentración en rotavapor se obtuvo una absorbancia de 1,1530 a una longitud de onda de 430 nm (figura 54). Se observa que no hay cambios en la amplitud del pico hallado, salvo un aumento en la absorbancia que demuestra la efectividad del método de concentración. En la figura 55 se puede observar la apariencia de las AgNPs concentradas siendo estas de un color café mucho más oscuro que las observadas en la figura 43b, esto también ratifica que el proceso de concentración fue exitoso.

Figura 54

Espectro observado en las AgNPs sintetizadas después de concentrarlas en rotavapor.

**Figura 55**

AgNPs concentradas en rotavapor.



Difracción de rayos X (XRD)

En la figura 56 se muestra el difractograma obtenido con las mejores condiciones, observándose solo la presencia de nanopartículas de plata. Se observa que la posición 2θ obtenida de los picos fue: $38,0611^\circ$; $44,0815^\circ$; $64,4455^\circ$; $77,3287^\circ$ (valores de reflexión de Bragg). Esto coincide con lo que Chouhan (2018) afirma, ya que los picos de difracción de las nanopartículas de plata normalmente observados son a $38,00^\circ$, $44,16^\circ$, $64,40^\circ$ y $77,33^\circ$. Según Jabbar et al. (2020) los valores de reflexión de Bragg para las AgNPs son 38° , 44° , 64° y 77° , los mismos que corresponden al conjunto de planos de red: (111), (200), (220) y (311). La presencia de estos últimos valores indica la formación de una estructura cristalina cúbica centrada en la cara (fcc) de nanoestructura de plata (Jabbar et al., 2020). El análisis se lo obtuvo del programa HighScore Plus versión 4.1, en donde se reconoció a la muestra con AgNPs como plata en forma de nanoestructura con un score de 49. Mediante la ecuación de Scherrer (Ec. 4) se estimó el tamaño de las AgNPs utilizando el valor del ancho completo a la mitad del máximo (FWHM) siendo este de 11,42 nm.

Acorde a los resultados obtenidos se puede inferir que se tiene una red fcc simétrica de plata, y acorde a Jabbar et al. (2020) esto significa que no hubo favorecimiento para la síntesis de AgNPs anisótropas por la ruptura de la simetría en los metales fcc que presentan una tendencia a la nucleación y al crecimiento en partículas gemelas en la escala nanométrica.

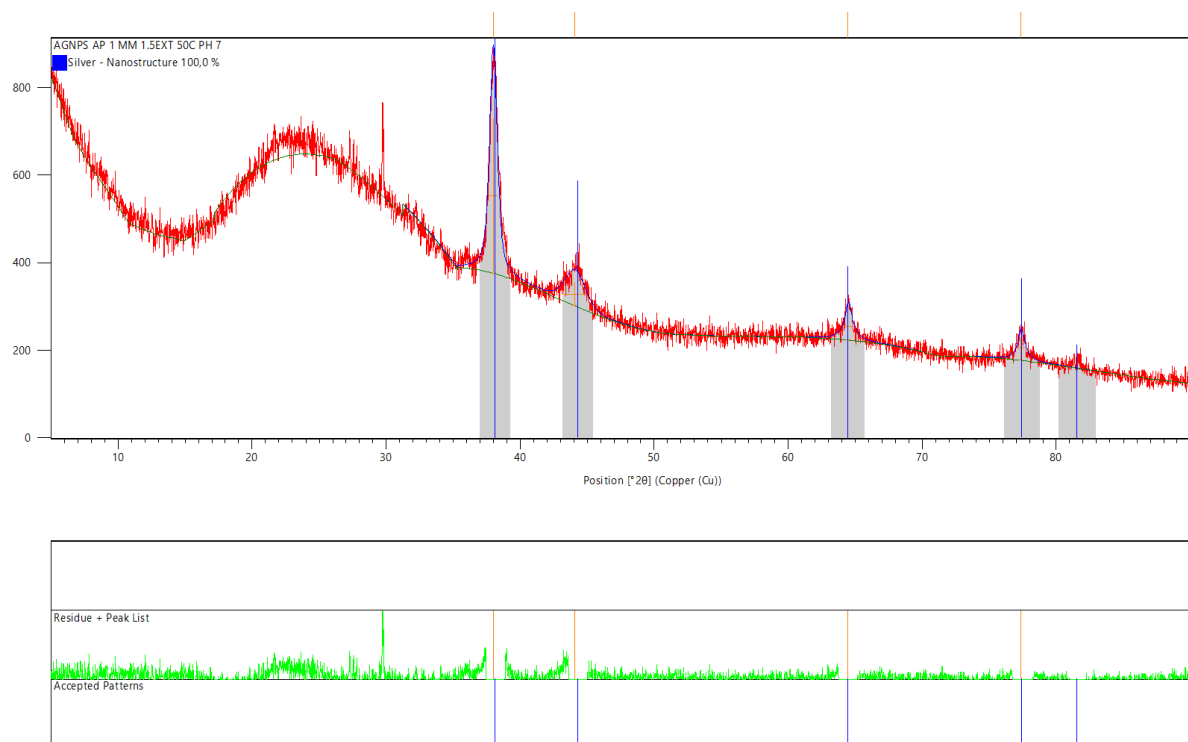
El pico relacionado con el plano de la red (111) es el más intenso como se lo puede observar en la figura 55, y de acuerdo con Jabbar et al. (2020) esto sugiere su orientación más predominante y la naturaleza cristalina de las AgNPs sintetizadas. No se observa presencia de AgOH (hidróxido de plata) debido al cambio de pH, ya que este se subió a un pH neutro (7,042) tal y como menciona Vanlalveni et al. (2021) en su estudio. Tampoco hay presencia de Ag₂O (óxido de plata). Los picos que pertenecen al óxido de plata son $26,2^\circ$, $32,9^\circ$, $38,1^\circ$, $55,2^\circ$, $65,7^\circ$ y $69,1^\circ$ correspondientes al conjunto de planos en red (110), (111), (200), (220), (311) y (222) que dan

un Ag_2O en forma de estructura cúbica (Elyamny et al., 2021). El hidróxido de plata es formado por la reacción entre el nitrato de plata y el hidróxido de sodio, este compuesto es muy inestable por lo que se transforma en óxido de plata (Al-Essa et al., 2021).

También se observa otro pico en $2\theta = 30^\circ$, y esto es por la presencia de los compuestos orgánicos del extracto de marco, tal y como se observa en los estudios de Aslam et al., (2021) y Rautela et al., (2019) que muestran otros picos diferentes a los de la plata debido al uso de un extracto vegetal.

Figura 56

Difractograma obtenido del análisis con el Difractómetro de rayos X (XRD).



Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)

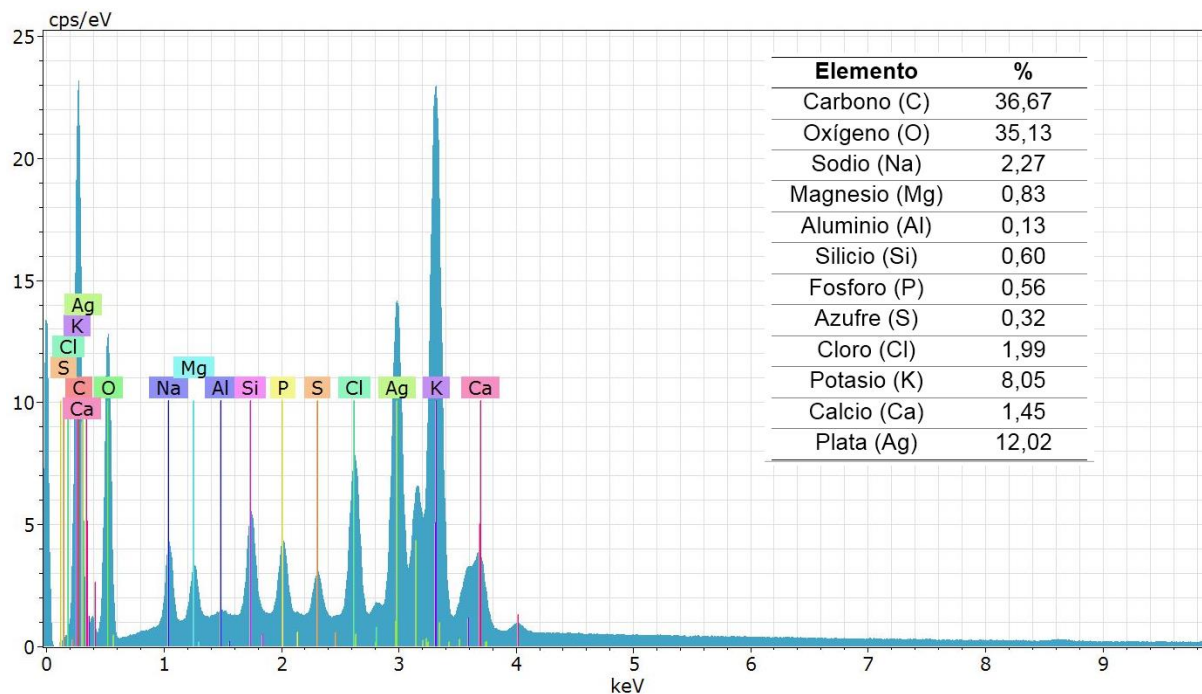
En la figura 57 se puede observar el porcentaje en masa de cada elemento químico encontrado en la muestra de AgNPs analizada, se observa el promedio de las tres repeticiones. Los elementos con mayor presencia son el carbono, oxígeno y plata.

La presencia de varios elementos químicos puede deberse al uso del extracto vegetal de marco, que es rico en componentes orgánicos (polifenoles, flavonoides, entre otros), tal y como mencionan Alsammarraie et al., (2018) y Raj et al., (2018) en sus estudios donde también se hallaron algunos elementos químicos, siendo el carbono el mayoritario por la composición orgánica del extracto vegetal usado. Otros elementos también hallados son: oxígeno, cloro, aluminio, potasio, fósforo, magnesio (Balciunaitiene et al., 2021); calcio, oro (Jebriil et al., 2020) silicio (Hamelian et al., 2018); azufre (Kumar et al., 2016). El sodio se observa debido al uso de una solución de NaOH 0,1 N para subir el pH a 7 durante el proceso de síntesis de las AgNPs.

En la figura 57 se observa el espectrograma obtenido con el análisis EDS, en donde se puede observar un pico de la plata en aproximadamente 3 keV, esto corresponde a las nanopartículas de plata (Alsammarraie et al., 2018).

Figura 57

Resultados obtenidos del análisis con espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS).



En la figura 58 se observa el mapeo elemental realizado con SEM, donde se confirma la presencia de los elementos citados en la figura 57. Se observa a cada elemento de un color diferente, en la tabla 7 se detallan cada uno de los colores observados. En el análisis XRD no se observó estos elementos debido a una baja concentración o un bajo grado de cristalinidad de los mismos, factores que contribuyeron a que no se emita señal alguna por estar bajo los límites de detección del equipo, su límite de detección es del 3% (Karimi-Maleh et al., 2020; Safavipour et al., 2020).

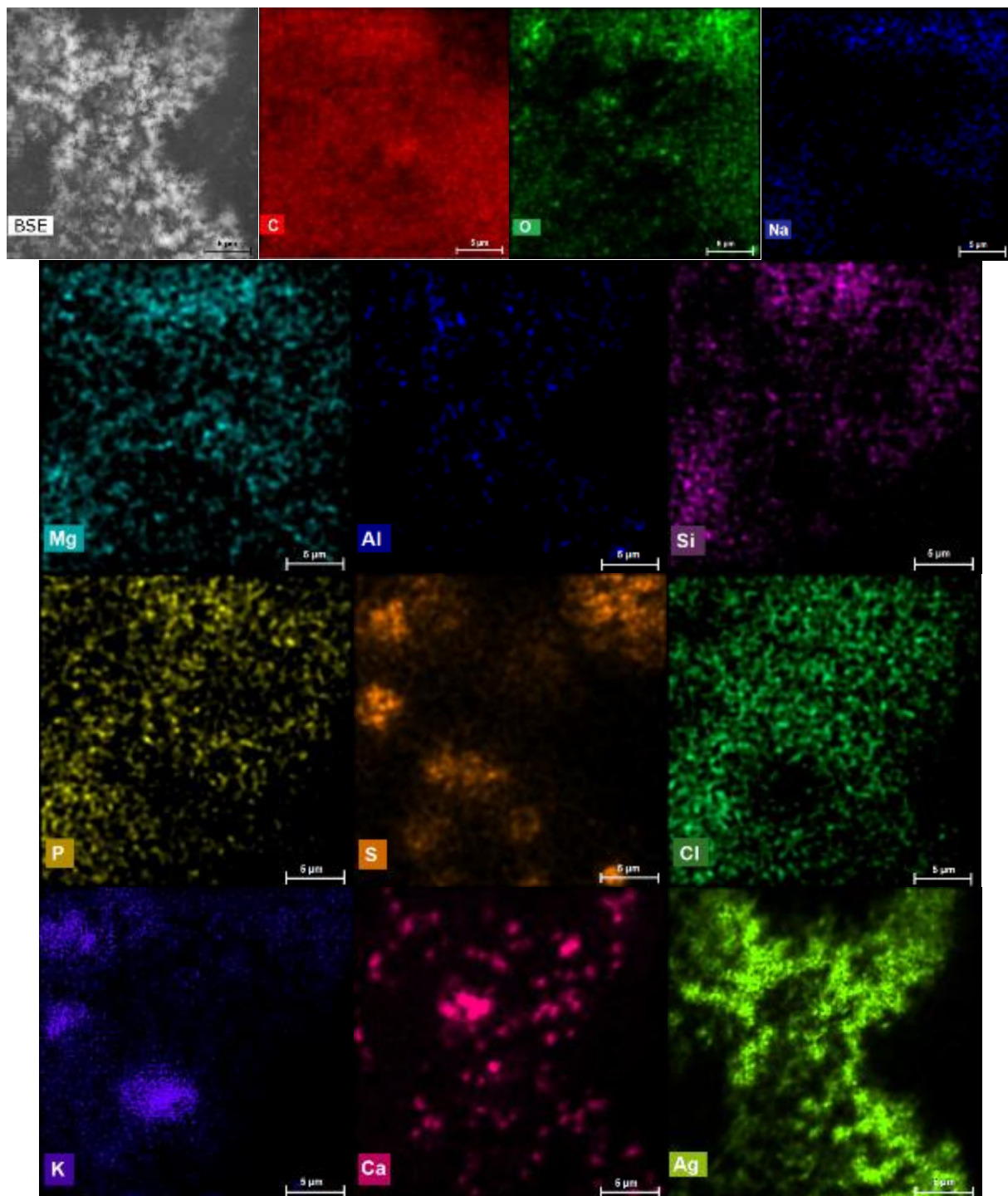
Tabla 7

Colores observados en el mapeo elemental realizado con SEM de los elementos hallados

Elemento	Color
Carbono	Rojo
Oxigeno	Verde oscuro
Sodio	Azul
Magnesio	Celeste
Aluminio	Azul
Silicio	Fucsia
Fosforo	Amarillo
Azufre	Anaranjado
Cloro	Turquesa
Potasio	Morado
Calcio	Rosado
Plata	Verde claro

Figura 58

Imágenes obtenidas del análisis con espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).



Nota: Cada color representa a cada elemento químico encontrado, también está la imagen BSE

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

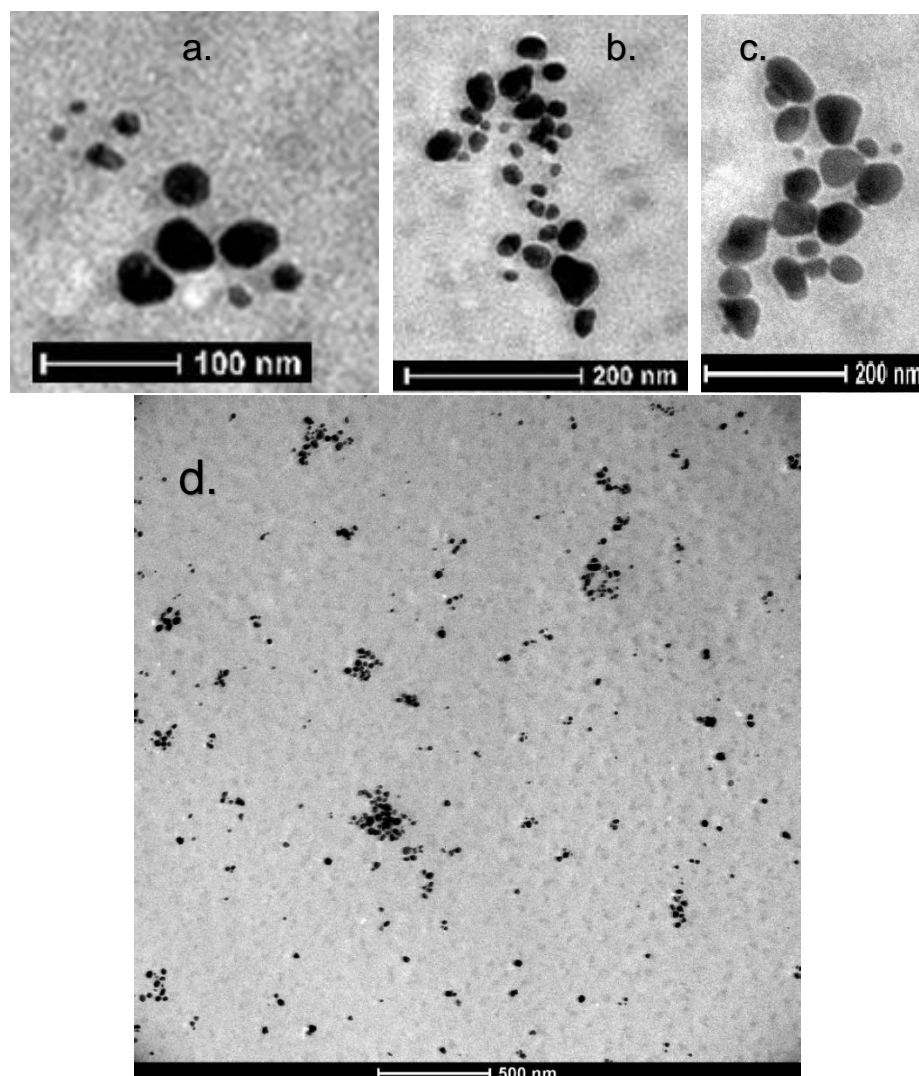
En la figura 59a se puede observar la morfología de las AgNPs obtenidas, esta es similar a una elipse, no son totalmente esféricas posiblemente al ser sintetizadas en un extracto vegetal. A esto también concluye Alsammarraie et al., (2018), quienes obtuvieron AgNPs cuasi esféricas y elipsoidales. Se observa una homogeneidad de las nanopartículas, con el análisis DLS de la figura 53b también se observa lo mismo; esto también encontró Ebrahimzadeh et al. (2020) quienes mostraron similares resultados.

También se observa cierto grado de aglomeración entre las nanopartículas (figuras 59b y 59d), confirmándose los resultados hallados en DLS (un mayor diámetro por la aglomeración de AgNPs), ya que este equipo tiene un menor grado de precisión en la medición respecto al TEM porque en su medición asume que todas las partículas son esféricas (Alsammarraie et al., 2018; Rautela et al., 2019).

Otra razón de que el análisis DLS presente un mayor diámetro es que las AgNPs sintetizadas presentan un recubrimiento del extracto vegetal. Esto halló Ebrahimzadeh et al. (2020) en su estudio, en donde en las imágenes obtenidas con el TEM se puede observar un recubrimiento de un color grisáceo alrededor de las AgNPs que se observan de un color oscuro. Este recubrimiento se lo observa de mejor forma en la figura 59c, el mismo que tiene la misma apariencia de que observó Ebrahimzadeh et al. (2020) en su estudio. El análisis DLS calcula el radio hidrodinámico, el mismo que es mayor al del radio verdadero que solamente se lo puede calcular mediante microscopía electrónica de transmisión (Lim et al., 2013), y el valor del diámetro hidrodinámico calculado en este análisis fue de $44,73 \text{ nm} \pm 20,8 \text{ nm}$.

Figura 59

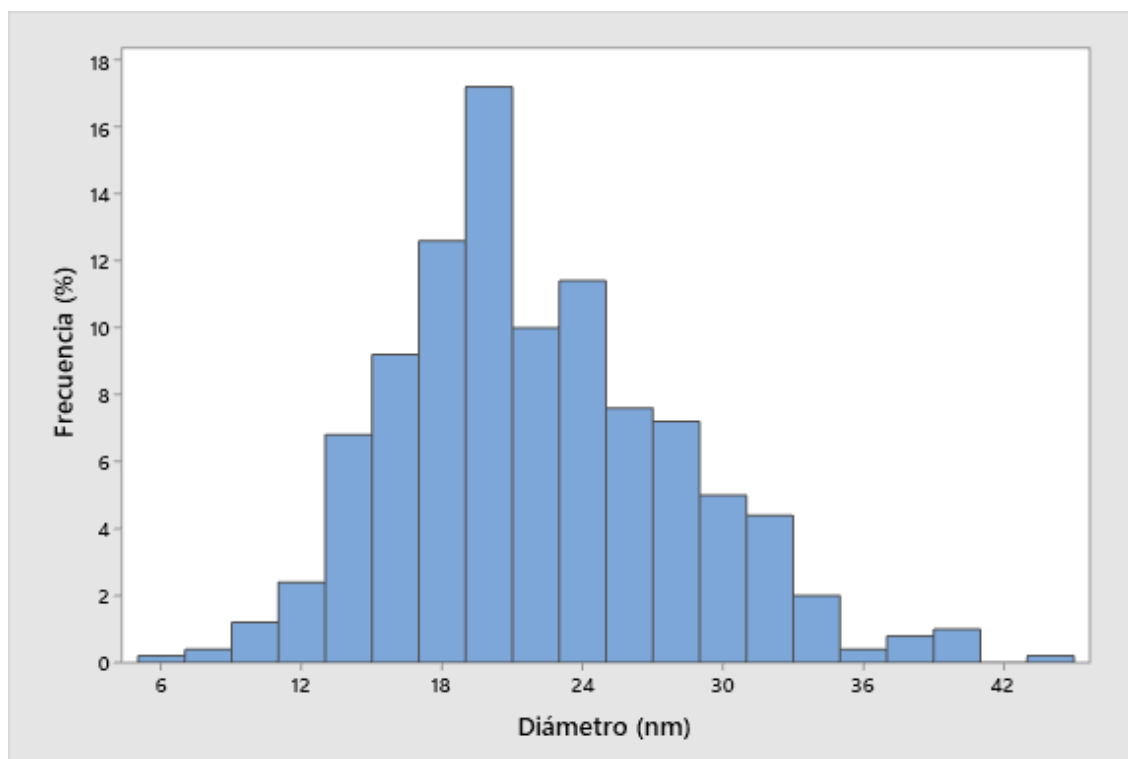
Imágenes obtenidas con el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).



El promedio del diámetro de las AgNPs encontradas es de $22,12 \text{ nm} \pm 6,09 \text{ nm}$. Esta información fue obtenida de las imágenes de TEM usando el Software FIJI. Este resultado es diferente al hallado en DLS (figura 53b), siendo mayor posiblemente debido a una aglomeración de las nanopartículas y a la presencia de un recubrimiento de extracto vegetal. Esto es comprobado en los estudios de Ebrahimzadeh et al. (2020) y Rautela et al. (2019) quienes también observan estas variaciones en el diámetro de las nanopartículas.

Figura 60

Histograma del diámetro de las AgNPs obtenidas por TEM.

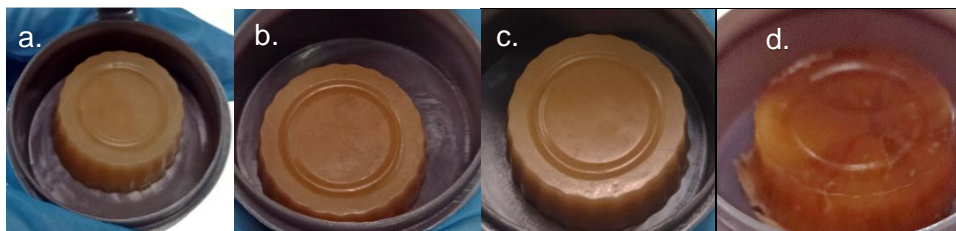


Formulación del jabón

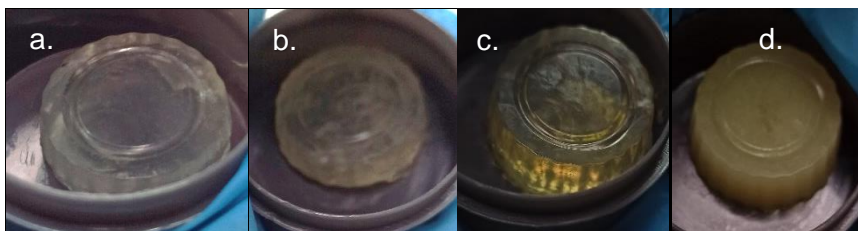
Se elaboró el jabón siguiendo las recomendaciones de Proaño, (2021), en las figuras 60, 61 y 62 se pueden observar los jabones elaborados. Su apariencia se debe al uso de base de jabón de glicerina transparente y el uso de ácido cítrico para bajar el pH a un valor de 7, algo que Proaño, (2021) menciona que puede suceder. Se puede observar que mientras más concentración de AgNPs o extracto esté en el jabón más intenso es el color.

Figura 61

Jabones elaborados con AgNPs sintetizadas en extracto de marco a concentraciones de: a. 1,5%, b. 2,5%, c. 3,75% y d. 5%

**Figura 62**

Jabones elaborados con extracto de marco a concentraciones de: a. 1,5%, b. 2,5%, c. 3,75% y d. 5%

**Figura 63**

Jabón elaborado sin AgNPs ni extracto de marco usado como control



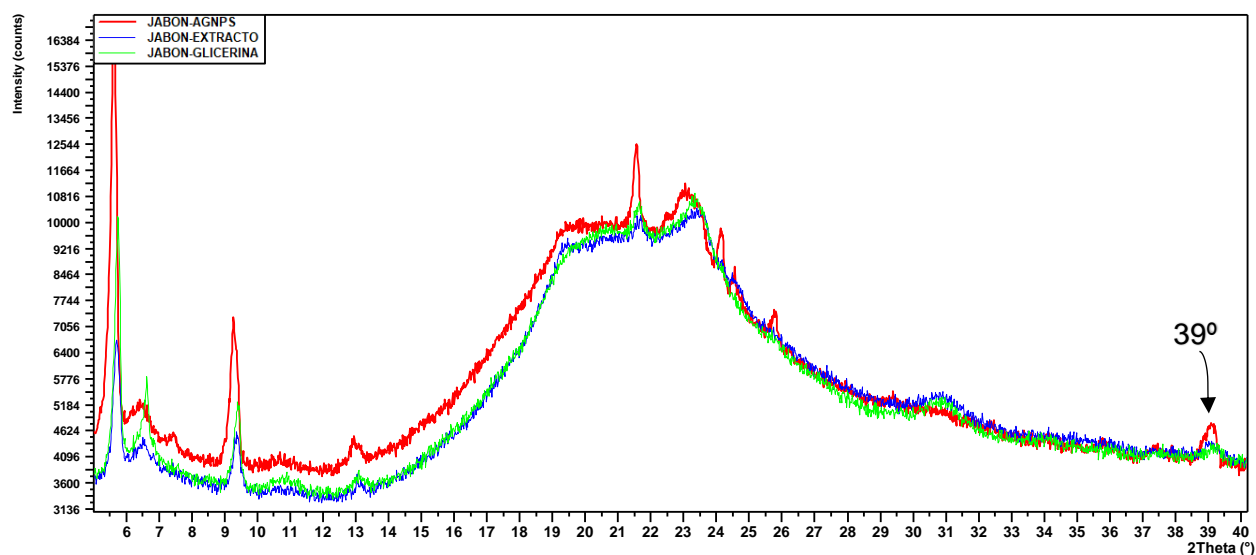
Caracterización del jabón

Se analizaron los tres tipos de jabones observándose los picos de la base del jabón de glicerina que se hallan al inicio de la gráfica. Se observó un pico en $2\theta = 39^\circ$ en el jabón con AgNPs (figuras 64 y 65).

Esta desviación puede deberse a la presencia de los componentes de la base de jabón de glicerina, debido a que se ha observado estas desviaciones en otros casos (Aslam et al., 2021; Rautela et al., 2019).

Figura 64

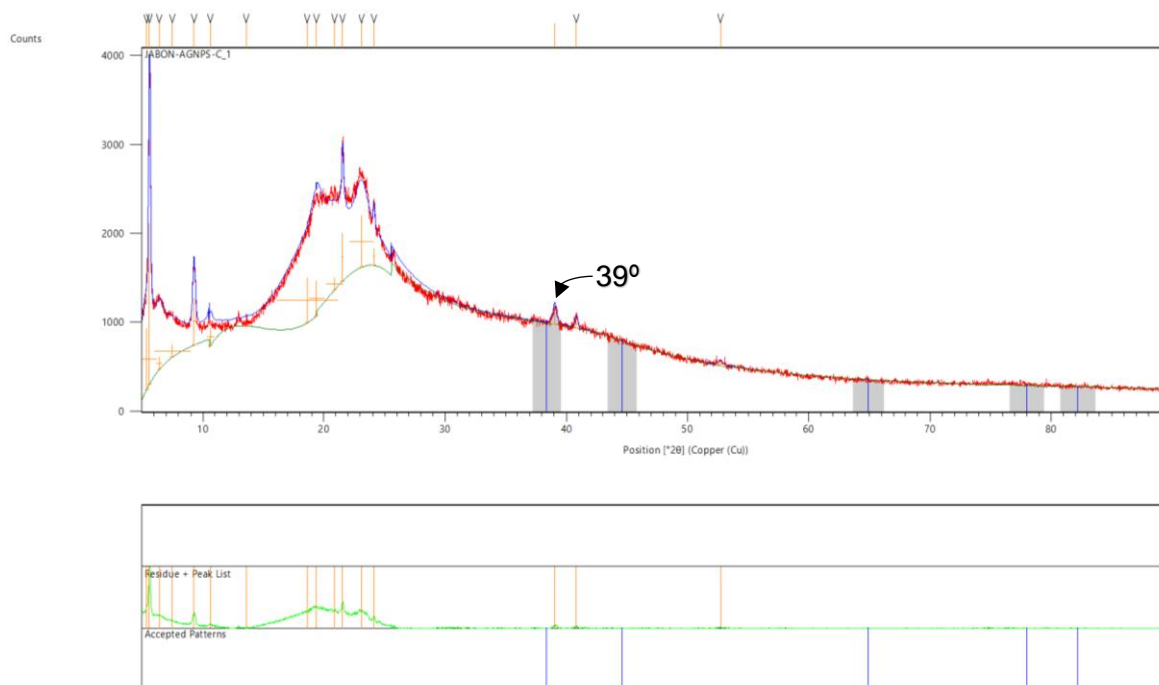
Difractograma obtenido del análisis de los jabones con AgNPs, extracto y sin ningún principio activo con el Difractómetro de rayos X (XRD).



Nota: En la figura el color rojo representa el jabón con AgNPs, el azul al jabón con extracto y el verde el jabón solo con glicerina.

Figura 65

Difractograma obtenido del análisis del jabón con AgNPs realizado con el Difractómetro de rayos X (XRD).



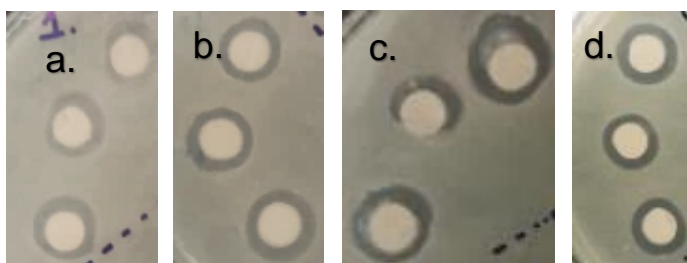
Actividad antimicrobiana

Se midió la actividad antimicrobiana después de 72 horas encontrándose un halo de inhibición de 2 mm en la bacteria *Staphylococcus aureus* y no se halló actividad antimicrobiana en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, tal y como se lo puede observar en la tabla 8 y las figuras 66, 67, 68, 69, 70 y 71.

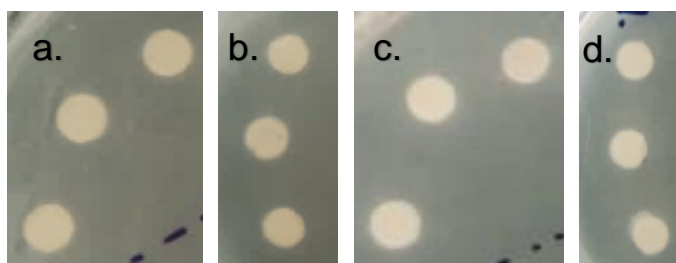
Hubo un pequeño halo de inhibición presente en el jabón con glicerina (sin extracto ni AgNPs) en *Staphylococcus aureus*. Esto también lo observó De la Vega & Cava Vergiu (2019) en su estudio en esta misma bacteria y se debe a que esta bacteria Gram positiva presenta una cierta sensibilidad a la glicerina, la cual está presente en este jabón.

Figura 66

Resultados obtenidos con el jabón de extracto de marco en *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%.

**Figura 67**

Resultados obtenidos con el jabón de extracto de marco en *Escherichia coli* a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%.

**Figura 68**

Resultados obtenidos con el jabón de extracto de marco en *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%.

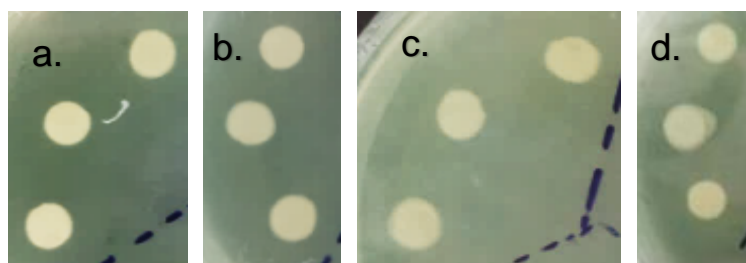
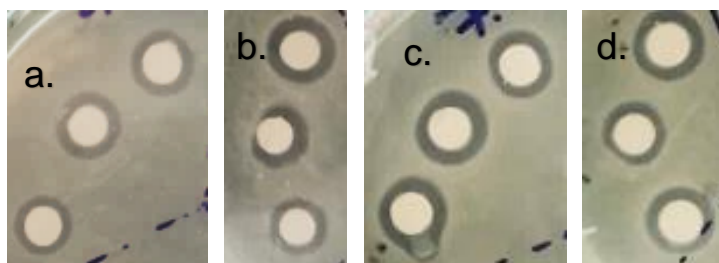
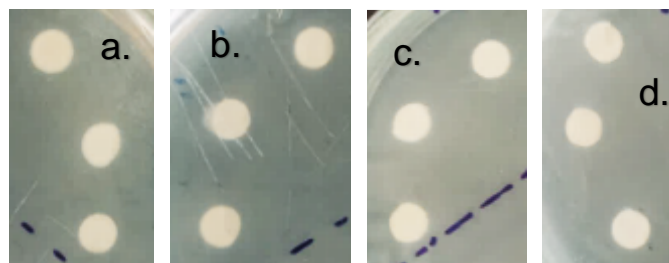


Figura 69

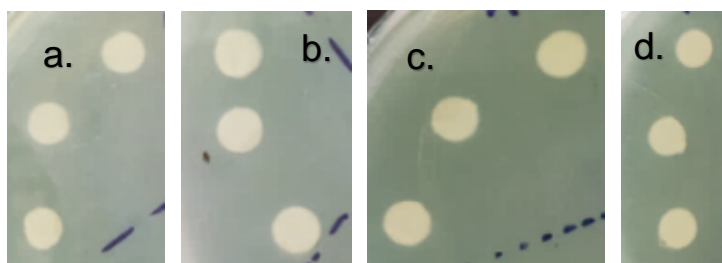
Resultados obtenidos con el jabón de AgNPs en *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%.

**Figura 70**

Resultados obtenidos con el jabón de AgNPs en *Escherichia coli* a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%.

**Figura 71**

Resultados obtenidos con el jabón de AgNPs en *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones de: a. 1,25%, b.2,5%, c.3,75% y d. 5%.



Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana

Se utilizaron los datos que se encuentran en la tabla 8, en el análisis del diseño factorial se pudo comprobar que los datos no siguen una distribución normal, según las gráficas de residuos analizadas (ver figura 72). De acuerdo a los diagramas de Pareto (figura 73) se puede observar que la concentración de extracto, de AgNPs, el tipo de microorganismo y la respectiva interacción entre los mismos tiene un efecto significativo en el tamaño del halo de inhibición.

En las gráficas de efectos principales se puede observar que el control positivo es el que mayor efecto ejerce, pero en el caso del jabón con extracto se puede observar que los mejores efectos se dan con concentraciones del 1,25%, 2,5% y 3,75%, mostrando un halo de inhibición de un promedio de 2,33 mm. En el caso del jabón con AgNPs se puede observar que los mejores efectos se dan con una concentración del 5% de AgNPs, mostrando un halo de inhibición de un promedio de 2,67 mm; el cual es mayor que el mostrado con el jabón de extracto de marco frente a *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli y *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias Gram negativas y *Staphylococcus aureus* es Gram positiva, por lo que se puede afirmar que se tiene un mejor efecto en bacterias Gram positivas debido a la diferencia en la estructura de su membrana porque estas últimas no tienen una membrana externa y su espacio periplásmico es más pequeño (Ali et al., 2022). Esta membrana externa actúa como una barrera que impide el ingreso de moléculas extrañas (Carvalho et al., 2018). Además el espacio periplásmico presenta enzimas que pueden descomponer partículas extrañas que provengan del exterior (Ali et al., 2022).

En bacterias Gram negativas se ha observado una adhesión y acumulación de AgNPs en la superficie celular y estas pueden penetrar la membrana externa a través de las porinas; pero es probable que la pared celular más gruesa de las bacterias Gram positivas produzca la penetración de iones de plata en el citoplasma (Mikhailova, 2020). Es posible los lipopolisacáridos presentes en la pared celular de las bacterias Gram negativas contribuyan en la integridad estructural de la

misma, haciendo que sean menos susceptibles que las Gram positivas (Mikhailova, 2020). El mecanismo exacto de actuación de las AgNPs en las bacterias es desconocido, aunque se tienen muchas hipótesis, una de ellas es que estas generan cambios estructurales en la membrana celular de las bacterias ocasionando su destrucción (Mikhailova, 2020).

Hay mucha información respecto a la resistencia bacteriana al Ag iónico, se identifica la eliminación de iones de Ag^+ a través de bombas de expulsión o la reducción al estado de oxidación de Ag^0 , como mecanismos de resistencia (Stabryla et al., 2021). De acuerdo con Stabryla et al. (2021) las cepas mutantes de *Escherichia coli* resistentes a la plata tienen membranas celulares deficientes en porinas, reduciéndose la absorción de la plata. A nivel genético, la resistencia al ion plata está asociada con el operón sil en bacterias Gram negativas, este codifica dos bombas de expulsión: una ATPasa de tipo P (SilP) y un antiportador (SilCBA), también están dos proteínas chaperonas periplásmicas de unión a plata (SilE y SilF) que funcionan de forma sinérgica para expulsar los iones plata de las bacterias (Stabryla et al., 2021).

Se ha demostrado que la resistencia a las AgNPs depende de los microorganismos, a pesar de que se tiene resultados contradictorios, la mayoría de la comunidad científica atribuye la resistencia a las AgNPs a la premisa de que estas nanopartículas sirven como reservorios para los iones Ag^+ y la eliminación de estos iones se produce a través de los mecanismos mencionados anteriormente (Stabryla et al., 2021). También se han encontrado genes de resistencia a Ag expresados de forma constitutiva (siempre activos), incluso en ausencia de Ag e independientemente de su forma (Stabryla et al., 2021).

Acorde con Stabryla et al. (2021) se ha encontrado una mutación genética permanente que se transmite de forma hereditaria en *Escherichia coli*. Esta se halla en el gen *cusS* que codifica una histidina quinasa sensorial, la misma que forma parte de un sistema regulador de dos componentes con CusR, que activa la expresión de la bomba de expulsión periplásmica *cusCFBA* en respuesta a la exposición a cobre o plata (Stabryla et al., 2021). La mutación cambia el residuo

de arginina cargado positivamente (residuo 292) a uno de leucina hidrofóbico no polar, se desconoce todavía el efecto funcional de este cambio, pero está relacionado con la resistencia a las AgNPs en *Escherichia coli* (Stabryla et al., 2021).

La motilidad, según Stabryla et al. (2021) es un rasgo clave para la supervivencia de muchas bacterias, ya que confiere una ventaja al permitir que las células escapen de malas condiciones y busquen ambientes más favorables. Se corroboró que este aspecto no influye en la resistencia a las AgNPs, en el caso de la flagelina; ya que se comparó una cepa hipermóvil de *Escherichia coli* con una no móvil y ambas mostraron una agregación de AgNPs similar, lo que lleva a suponer que podría haber otras proteínas que promuevan esta agregación y deberían investigarse (Stabryla et al., 2021).

Se puede observar que las diferencias de los halos de inhibición halladas entre los jabones con extracto de marco y con AgNPs no son significativas según la prueba de Duncan al 5% de significancia, lo que significa que pese a que el jabón con AgNPs es mejor que el jabón con extracto de marco y el jabón comercial, este efecto no es significativo. Con esta misma prueba estadística se puede corroborar que existe homocedasticidad en los datos obtenidos. Los datos de la prueba de Duncan se pueden observar en las figuras 76 y 77 para el jabón con extracto y nanopartículas respectivamente.

Para un mejor análisis de los efectos de cada microorganismo y la concentración de extracto de marco, así como de AgNPs, del control positivo y del jabón comercial se asignó con un número al tipo de microorganismo y tratamiento usado, observándose en las siguientes tablas las asignaciones para una mejor comprensión de las gráficas posteriores:

Tabla 9

Asignaciones dadas en el diseño factorial al tipo de microorganismo

Microorganismo	Asignación
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3

Tabla 10

Asignaciones dadas en el diseño factorial al tipo de microorganismo

Tratamiento	Asignación
Jabón con extracto al 1,25%	1
Jabón con extracto al 2,5%	2
Jabón con extracto al 3,75%	3
Jabón con extracto al 5%	4
Jabón con AgNPs al 1,25%	1
Jabón con AgNPs al 2,5%	2
Jabón con AgNPs al 3,75%	3
Jabón con AgNPs al 5%	4
Penicilina/Estreptomicina (Control positivo)	5
Jabón comercial con triclocarbán	6

Figura 72

Gráficas de la probabilidad normal para a. el jabón con extracto de marco y b. el jabón con nanopartículas de plata.

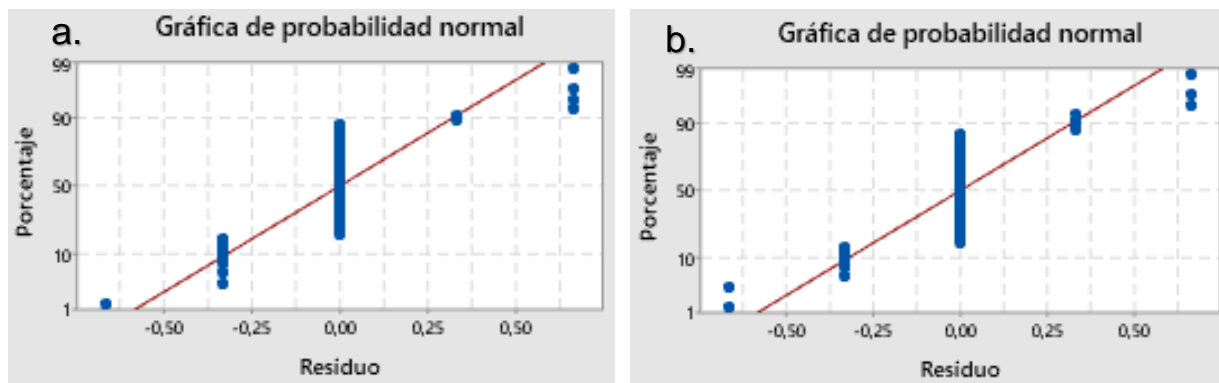


Figura 73

Diagramas de Pareto para a. el jabón con extracto de marco y b. el jabón con nanopartículas de plata

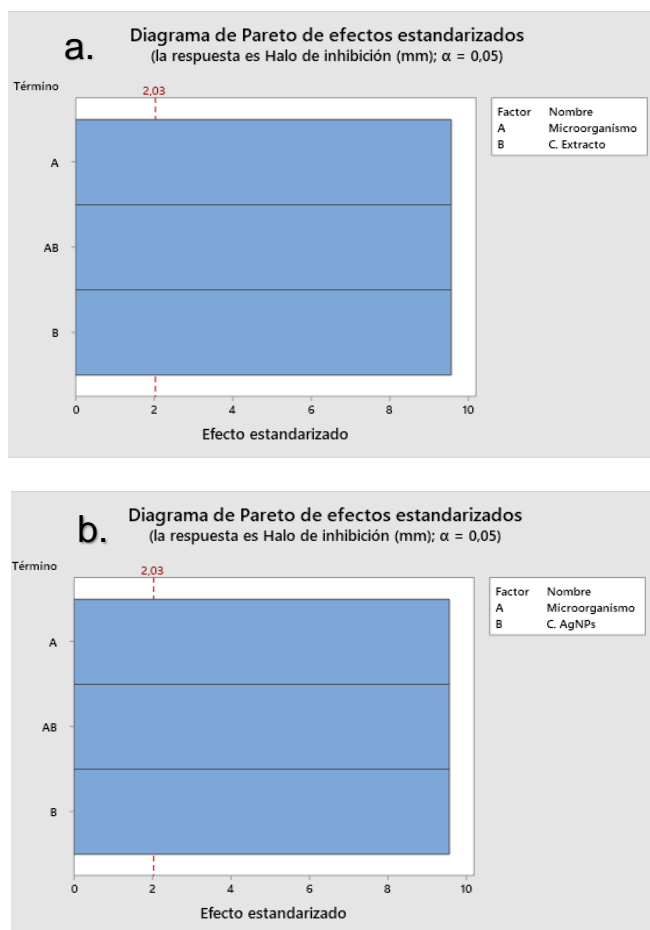


Figura 74

Gráficas de efectos principales para el halo de inhibición para: a. jabon con extracto de marco y b. jabón con AgNPs.

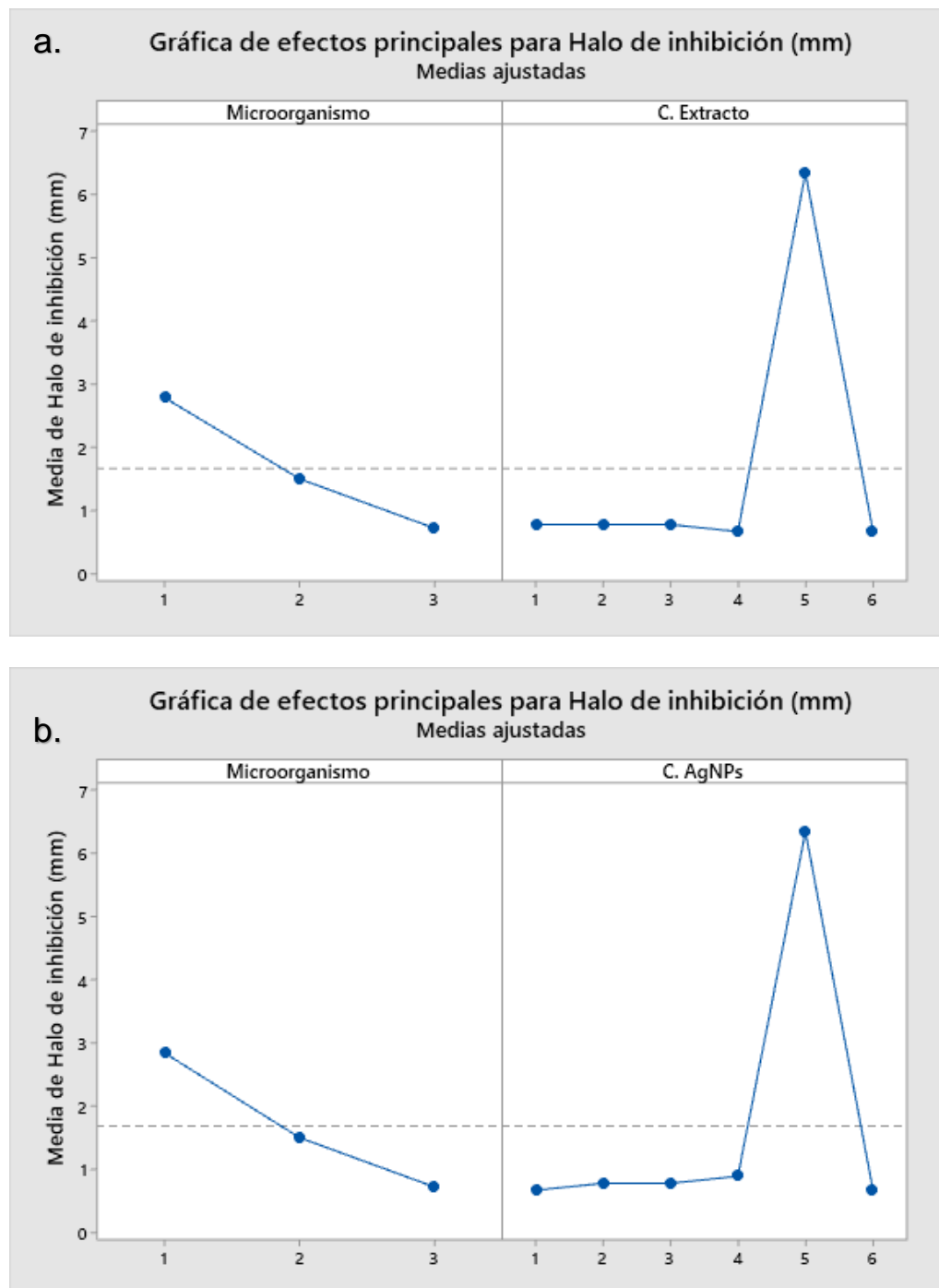


Figura 75

Resultados de la prueba de Duncan con la varianza y las medias para el jabón con extracto de marco.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halo de inhibición (mm)	54	0,99	0,98	18,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	318,67	17	18,75	202,45	<0,0001
Microorganismo	38,78	2	19,39	209,40	<0,0001
C. Extracto	235,33	5	47,07	508,32	<0,0001
Microorganismo*C. Extracto..	44,56	10	4,46	48,12	<0,0001
Error	3,33	36	0,09		
Total	322,00	53			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0926 gl: 36

Microorganismo	Medias	n	E.E.	
3	0,72	18	0,07	A
2	1,50	18	0,07	B
1	2,78	18	0,07	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0926 gl: 36

C. Extracto	Medias	n	E.E.	
4	0,67	9	0,10	A
6	0,67	9	0,10	A
3	0,78	9	0,10	A
2	0,78	9	0,10	A
1	0,78	9	0,10	A
5	6,33	9	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0926 gl: 36

Microorganismo	C. Extracto	Medias	n	E.E.	
2	1	0,00	3	0,18	A
2	2	0,00	3	0,18	A
2	3	0,00	3	0,18	A
2	4	0,00	3	0,18	A
3	2	0,00	3	0,18	A
3	3	0,00	3	0,18	A
3	4	0,00	3	0,18	A
3	1	0,00	3	0,18	A
2	6	0,00	3	0,18	A
3	6	0,00	3	0,18	A
1	6	2,00	3	0,18	B
1	4	2,00	3	0,18	B
1	3	2,33	3	0,18	B
1	2	2,33	3	0,18	B
1	1	2,33	3	0,18	B
3	5	4,33	3	0,18	C
1	5	5,67	3	0,18	D
2	5	9,00	3	0,18	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 76

Resultados de la prueba de Duncan con la varianza y las medias para el jabón con AgNPs.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halo de inhibición (mm)	54	0,99	0,98	18,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	320,31	17	18,84	203,49	<0,0001
Microorganismo	41,04	2	20,52	221,60	<0,0001
C. AgNPs	233,65	5	46,73	504,68	<0,0001
Microorganismo*C. AgNPs	45,63	10	4,56	49,28	<0,0001
Error	3,33	36	0,09		
Total	323,65	53			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0926 gl: 36

Microorganismo	Medias	n	E.E.	
3	0,72	18	0,07	A
2	1,50	18	0,07	B
1	2,83	18	0,07	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0926 gl: 36

C. AgNPs	Medias	n	E.E.	
1	0,67	9	0,10	A
6	0,67	9	0,10	A
3	0,78	9	0,10	A
2	0,78	9	0,10	A
4	0,89	9	0,10	A
5	6,33	9	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0926 gl: 36

Microorganismo	C. AgNPs	Medias	n	E.E.	
2	4	0,00	3	0,18	A
2	3	0,00	3	0,18	A
2	2	0,00	3	0,18	A
3	1	0,00	3	0,18	A
3	4	0,00	3	0,18	A
3	3	0,00	3	0,18	A
3	2	0,00	3	0,18	A
2	1	0,00	3	0,18	A
3	6	0,00	3	0,18	A
2	6	0,00	3	0,18	A
1	1	2,00	3	0,18	B
1	6	2,00	3	0,18	B
1	3	2,33	3	0,18	B C
1	2	2,33	3	0,18	B C
1	4	2,67	3	0,18	C
3	5	4,33	3	0,18	D
1	5	5,67	3	0,18	E
2	5	9,00	3	0,18	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Capítulo 4: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Se hizo la cuantificación de flavonoides y la evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso de hojas *Ambrosia peruviana*. De acuerdo a lo que se ha hallado en la literatura se puede afirmar que el solvente influye significativamente para estos análisis, siendo el mejor el etanol; pero al realizarse una síntesis ecológica es conveniente utilizar agua como solvente, la misma que mostró buenos resultados en los análisis.

Se realizó la síntesis fitoquímica de AgNPs a partir del extracto acuoso de hojas de *Ambrosia peruviana*. Se encontró que el proceso era relativamente económico, no tóxico y respetuoso con el medio ambiente. Los parámetros optimizados para las nanopartículas de plata sintetizadas mediadas por extracto acuoso de hojas de *Ambrosia peruviana* se obtuvieron de la siguiente manera: 1,5 mL de extracto, una concentración de 1 mM de AgNO_3 , a una temperatura de $50^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por un tiempo de 7 horas con un pH de 7. Estos parámetros afectan la forma de las nanopartículas y su tamaño. Las AgNPs sintetizadas tenían forma cuasi-esférica y tamaños medios de $22,122 \text{ nm} \pm 6,091 \text{ nm}$.

Se realizó la caracterización de las AgNPs utilizando: espectrofotometría UV- Vis, que ratificó la presencia de AgNPs al observarse un pico en una longitud de onda igual a 436,5 nm, DLS, que demostró un tamaño promedio de $44,733 \text{ nm} \pm 20,8 \text{ nm}$; XRD, que observó los siguientes valores de reflexión de Bragg $38,0611^\circ$; $44,0815^\circ$; $64,4455^\circ$; $77,3287^\circ$ que corresponde a las AgNPs, además de que mediante la ecuación de Scherrer se estimó el tamaño de las AgNPs usando el valor del ancho completo a la mitad del máximo (FWHM) siendo este de 11,42 nm.; SEM-EDS, encontrando una variada composición elemental con la presencia de carbono, oxígeno, sodio, magnesio, aluminio, silicio, fósforo, azufre, cloro, potasio, calcio y plata, esta última con un pico ubicado en aproximadamente 3 keV concerniente a las AgNPs; TEM, que ratificó la forma cuasi-esférica de las AgNPs y un tamaño promedio de $22,122 \text{ nm} \pm 6,091 \text{ nm}$.

Se concentraron las AgNPs en rotavapor obteniéndose una absorbancia de 1,1530 a una longitud de onda igual a 430 nm. Se elaboraron los jabones con AgNPs y extracto de marco a las concentraciones de 1,25%, 2,5%, 3,75% y 5%. Se caracterizó el jabón con AgNPs en XRD encontrándose un pico en $2\theta = 39^\circ$ concerniente a las AgNPs.

Se evaluó la actividad antibacteriana, el jabón con AgNPs al 5% demostró ser el mejor, ya que mostró un mayor halo de inhibición (2,67 mm) respecto al jabón con extracto de marco (2,33 mm) y al jabón comercial (2 mm) frente a *Staphylococcus aureus*. No se halló actividad antimicrobiana en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que estas son bacterias Gram negativas y la estructura de su membrana es diferente a la de *Staphylococcus aureus* que es una bacteria Gram positiva. También se ha observado la presencia de otros mecanismos de resistencia a las AgNPs en *Escherichia coli*.

Recomendaciones

Con el extracto de marco es recomendable usar una plancha de calentamiento y agitación para la síntesis de AgNPs, ya que este reacciona demasiado rápido con el nitrato de plata, por lo que no es posible su síntesis en microondas.

No hubo halos de inhibición significativos por lo que se recomienda repetir el experimento midiendo las concentraciones bacterianas porque existe la posibilidad de que la sobresaturación de bacterias genere resultados alterados.

Es recomendable a futuro realizar posteriores investigaciones en la toxicidad de las AgNPs obtenidas así como probar este jabón *in vivo* para poder saber si presenta otras propiedades que sean beneficiosas; de igual forma verificar la estabilidad del jabón en el tiempo.

Bibliografía

- Ahmed, R. H., & Mustafa, D. E. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles mediated by traditionally used medicinal plants in Sudan. *International Nano Letters*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40089-019-00291-9>
- Akintelu, S. A., Bo, Y., & Folorunso, A. S. (2020). A Review on Synthesis, Optimization, Mechanism, Characterization, and Antibacterial Application of Silver Nanoparticles Synthesized from Plants. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/3189043>
- Al-Essa, K., Radha, A. V., & Navrotsky, A. (2021). Drop Solution Calorimetric Studies of Interface Enthalpy of Cubic Silver (I) Oxide (Ag₂O) Nanocrystals. *Key Engineering Materials*, 878, 73–80. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.878.73>
- Alharbi, F. A., & Alarfaj, A. A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles from *Neurada procumbens* and its antibacterial activity against multi-drug resistant microbial pathogens. *Journal of King Saud University - Science*, 32(2), 1346–1352. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.026>
- Ali, A., Zam, W., & Husein, F. (2022). Study of Antimicrobial Activity of Thyme and Oregano Extracted by Glycerin Using Maceration. *Int J Med Microbiol Immunol*, 1(1), 1–5. <https://manuscriptscientific.com/article/25/international-journal-of-medical-microbiology-immunology/84/1>
- Alsammarrarie, F. K., Wang, W., Zhou, P., Mustapha, A., & Lin, M. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.059>
- Amarasinghe, L. D., Wickramarachchi, P. A. S. R., Aberathna, A. A. A. U., Sithara, W. S., & De

- Silva, C. R. (2020). Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Heliyon*, 6(6), e04322. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04322>
- Antylia Scientific Blog Team. (2012). *Seeing the Light: An Overview of Visible and UV-VIS Spectroscopy*. <https://www.coleparmer.in/blog/2012/12/13/seeing-the-light-an-overview-of-visible-and-uv-vis-spectroscopy/>
- Arias Ortiz, J. D., & Palma Holguín, M. I. (2019). *Elaboración de un compuesto antimicrobial con nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto de hojas de romero (Rosmarinus officinalis), para ser aplicado en frutas frescas* [Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/39845>
- Aryal, S. (2022). *Electron Microscope- Definition, Principle, Types, Uses, Labeled Diagram*. <https://microbenotes.com/electron-microscope-principle-types-components-applications-advantages-limitations/>
- Aslam, M., Fozia, F., Gul, A., Ahmad, I., Ullah, R., Bari, A., Mothana, R. A., & Hussain, H. (2021). Phyto-Extract-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Sanvitalia procumbens*, and Characterization, Optimization and Photocatalytic Degradation of Azo Dyes Orange G and Direct Blue-15. *Molecules*, 26(20), 6144. <https://doi.org/10.3390/molecules26206144>
- Balciunaitiene, A., Viskelis, P., Viskelis, J., Streimikyte, P., Liaudanskas, M., Bartkiene, E., Zavistanaviciute, P., Zokaityte, E., Starkute, V., Ruzauskas, M., & Lele, V. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of *Artemisia absinthium* L., *Humulus lupulus* L. and *Thymus vulgaris* L., Physico-Chemical Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Activity. *Processes*, 9(8), 1304. <https://doi.org/10.3390/pr9081304>

- Bansod, S. D., Bawaskar, M. S., Gade, A. K., & Rai, M. K. (2015). Development of shampoo, soap and ointment formulated by green synthesised silver nanoparticles functionalised with antimicrobial plants oils in veterinary dermatology: treatment and prevention strategies. *IET Nanobiotechnology*, 9(4), 165–171. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0042>
- Betancur, C. P., Hernández Montes, V., & Buitrago Sierra, R. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 35(4), 366–381. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v35n4/ibi09416.pdf
- Carroll, K. C., Pinto, J. R. B., Mietzner, T. A., Miller, S., Hobden, J. A., Morse, S. A., Detrick, B., McKerrow, J. H., Mitchell, T. G., & Sakanari, J. . (2016). *Jawetz, Melnick, & Adelberg Microbiología médica* (27th ed.). McGraw-Hill Education.
- Carvalho, M., Albano, H., & Teixeira, P. (2018). In Vitro Antimicrobial Activities of Various Essential Oils Against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 5(2), 41–48. <https://doi.org/10.29252/jfqhc.5.2.3>
- Castillo-Henríquez, L., Alfaro-Aguilar, K., Ugalde-Álvarez, J., Vega-Fernández, L., Montes de Oca-Vásquez, G., & Vega-Baudrit, J. R. (2020). Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles from Plant Extracts and Their Possible Applications as Antimicrobial Agents in the Agricultural Area. *Nanomaterials*, 10(9), 1763. <https://doi.org/10.3390/nano10091763>
- Chamba-Tandazo, M. J., Mora-Veintimilla, G. del R., Paccha-Tamay, C. L., Reyes-Rueda, E. Y., & Figueroa-Samaniego, S. E. (2020). Conocimientos, actitudes y prácticas de la medicina ancestral en la población de Casacay, Ecuador. *Polo Del Conocimiento*, 5(1), 700–714. <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/1244>

- Chand, K., Cao, D., Eldin Fouad, D., Hussain Shah, A., Qadeer Dayo, A., Zhu, K., Nazim Lakhan, M., Mehdi, G., & Dong, S. (2020). Green synthesis, characterization and photocatalytic application of silver nanoparticles synthesized by various plant extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(11), 8248–8261. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.01.009>
- Chouhan, N. (2018). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. In *Silver Nanoparticles - Fabrication, Characterization and Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75611>
- Colina Ramos, A. C. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco)* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/10/916203/analisis-fitoquimico-determinacion-cualitativa-y-cuantitativa-d_7TSqx4x.pdf
- De la Vega, M., & Cava Vergiu, C. (2019). Presencia de *Staphylococcus aureus* después del lavado de manos quirúrgico en estudiantes de odontología. *Kiru*, 16(2), 52–60. <https://doi.org/10.24265/kiru.2019.v16n2.01>
- Deepa, C., Suresh, G., Devagi, P., Kowsalya, A., Kavitha, K., & Ramesh, B. (2021). Evaluation of the antibacterial activity of silver nanoparticles, doxycycline, collagen and their amalgamation – An in vitro study. *Materials Today: Proceedings*, 43, 3050–3053. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.396>
- Domenech Gordillo, F. N. (2017). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de *Ambrosia arborescens* (marco) como reductor químico* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13216/Tesis - Flavia Domenech.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13216/Tesis_Flavia_Domenech.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Ebrahimzadeh, M. A., Naghizadeh, A., Amiri, O., Shirzadi-Ahodashti, M., & Mortazavi-Derazkola, S. (2020). Green and facile synthesis of Ag nanoparticles using *Crataegus pentagyna* fruit extract (CP-AgNPs) for organic pollution dyes degradation and antibacterial application. *Bioorganic Chemistry*, *94*, 103425. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103425>
- El Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Almehti, A. M., Elmsellem, H., Fikri Benbrahim, K., Bousta, D., & Bari, A. (2019). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens* L. *Bioorganic Chemistry*, *93*, 103337. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103337>
- Elez Garofulić, I., Kruk, V., Martić, A., Martić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović, S., & Dragović-Uzelac, V. (2020). Evaluation of Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Pistacia lentiscus* L. Leaves and Fruit Extract Obtained by Optimized Microwave-Assisted Extraction. *Foods*, *9*(11), 1556. <https://doi.org/10.3390/foods9111556>
- Elyamny, S., Eltarahony, M., Abu-Serie, M., Nabil, M. M., & Kashyout, A. E.-H. B. (2021). One-pot fabrication of Ag @Ag₂O core-shell nanostructures for biosafe antimicrobial and antibiofilm applications. *Scientific Reports*, *11*(1), 22543. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01687-4>
- Eraky Mohammed, M. S. (2016). *A Study on Synthesis and Characterization of Some (I -IV -VI) Groups Compounds for Solar Cells Energy Application For Partial Fulfillment of the Requirements for The Master Degree of science in Chemistry (Physical Chemistry) The Former CMRDI President [Menoufiya University]*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21918.79685>
- Fernandez Delgado, J. N. (2019). *Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante del extracto metanólico y acuoso de las hojas de ambrosia peruviana all (altamisa)* [Universidad Católica Los Ángeles Chimbote]. <https://hdl.handle.net/20.500.13032/26426>
- Gajbhiye, S., & Sakharwade, S. (2016). Silver Nanoparticles in Cosmetics. *Journal of Cosmetics*,

Dermatological Sciences and Applications, 06(01), 48–53.

<https://doi.org/10.4236/jcdsa.2016.61007>

García, D. A., Mendoza, L., Vizúete, K., Debut, A., Arias, M. T., Gavilanes, A., Terencio, T., Ávila, E., Jeffryes, C., & Dahoumane, S. A. (2020). Sugar-Mediated Green Synthesis of Silver Selenide Semiconductor Nanocrystals under Ultrasound Irradiation. *Molecules*, 25(21), 5193. <https://doi.org/10.3390/molecules25215193>

Garibo, D., Borbón-Nuñez, H. A., de León, J. N. D., García Mendoza, E., Estrada, I., Toledano-Magaña, Y., Tiznado, H., Ovalle-Marroquin, M., Soto-Ramos, A. G., Blanco, A., Rodríguez, J. A., Romo, O. A., Chávez-Almazán, L. A., & Susarrey-Arce, A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 10(1), 12805. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69606-7>

Geraldes, A. N., da Silva, A. A., Leal, J., Estrada-Villegas, G. M., Lincopan, N., Katti, K. V., & Lugatildeo, A. B. (2016). Green Nanotechnology from Plant Extracts: Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles. *Advances in Nanoparticles*, 05(03), 176–185. <https://doi.org/10.4236/anp.2016.53019>

Gomathi, M., Prakasam, A., Rajkumar, P. V., Rajeshkumar, S., Chandrasekaran, R., & Anbarasan, P. M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Gymnema sylvestre* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. *South African Journal of Chemical Engineering*, 32, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2019.11.005>

Goodge, J. (2017). *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS)*. Geochemical Instrumentation and Analysis. https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/eds.html

Guauque, M. del P., Castaño, J. C., & Gómez, M. (2010). Detección de metabolitos secundarios en *Ambrosia peruviana* Willd y determinación de la actividad antibacteriana y antihelmíntica. *Infectio*, 14(3), 186–194. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70110-7](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70110-7)

- Guzmán, K., Kumar, B., Vallejo, M. J., Grijalva, M., Debut, A., & Cumbal, L. (2019). Ultrasound-assisted synthesis and antibacterial activity of gallic acid-chitosan modified silver nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*, *129*, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.01.009>
- Guzmán, L., Malla, J. L., Ramírez, J., Gilardoni, G., Calva, J., Hidalgo, D., Valarezo, E., & Rey-Valeirón, C. (2022). Acaricidal Efficacy of Plants from Ecuador, *Ambrosia peruviana* (Asteraceae) and *Lepechinia mutica* (Lamiaceae) against Larvae and Engorged Adult Females of the Common Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Sciences*, *9*(1), 23. <https://doi.org/10.3390/vetsci9010023>
- Hamelian, M., Zangeneh, M. M., Amisama, A., Varmira, K., & Veisi, H. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymus kotschyanus* extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. *Applied Organometallic Chemistry*, *32*(9), e4458. <https://doi.org/10.1002/aoc.4458>
- Holder, C. F., & Schaak, R. E. (2019). Tutorial on Powder X-ray Diffraction for Characterizing Nanoscale Materials. *ACS Nano*, *13*(7), 7359–7365. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05157>
- Holzwarth, U., & Gibson, N. (2011). The Scherrer equation versus the “Debye-Scherrer equation.” *Nature Nanotechnology*, *6*(9), 534–534. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.145>
- Hussain, M., Raja, N. I., Iqbal, M., & Aslam, S. (2017). Applications of Plant Flavonoids in the Green Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles and Impacts on Human Health. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, *43*(3), 1381–1392. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0431-6>
- Ijaz, M., Zafar, M., & Iqbal, T. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles by using various extracts: a review. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, *51*(5), 744–755.

<https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1808680>

- Jabbar, A. H., Al-Janabi, H. S. O., Hamzah, M. Q., Mezan, S. O., Tumah, A. N., Ameruddin, A. S. B., & Agam, M. A. (2020). Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticle (AgNPs) using Pandanus Atrocarpus Extract. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 29(3), 4913–4922. <https://sersc.org/journals/index.php/IJAST/article/view/5709>
- Jebril, S., Khanfir Ben Jenana, R., & Dridi, C. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using Melia azedarach leaf extract and their antifungal activities: In vitro and in vivo. *Materials Chemistry and Physics*, 248, 122898. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122898>
- JoVE Science Education Database. (2021). *Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy*. <https://www.jove.com/es/v/10204/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy>
- Justin, T. (2021). *Espectroscopía UV-Vis: principio, fortalezas y limitaciones y aplicaciones*. <http://www.news-courier.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>
- Kailasa, S. K., Park, T.-J., Rohit, J. V., & Koduru, J. R. (2019). Antimicrobial activity of silver nanoparticles. In *Nanoparticles in Pharmacotherapy* (pp. 461–484). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816504-1.00009-0>
- Karimi-Maleh, H., Karimi, F., Orooji, Y., Mansouri, G., Razmjou, A., Aygun, A., & Sen, F. (2020). A new nickel-based co-crystal complex electrocatalyst amplified by NiO dope Pt nanostructure hybrid; a highly sensitive approach for determination of cysteamine in the presence of serotonin. *Scientific Reports*, 10(1), 11699. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68663-2>
- Keshari, A. K., Srivastava, R., Singh, P., Yadav, V. B., & Nath, G. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 11(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.11.003>

- Khan, N., Kumar, D., & Kumar, P. (2020). Silver nanoparticles embedded guar gum/ gelatin nanocomposite: Green synthesis, characterization and antibacterial activity. *Colloid and Interface Science Communications*, 35, 100242. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100242>
- Kleemann, J., Koo, H., Hensen, I., Mendieta-Leiva, G., Kahnt, B., Kurze, C., Inclan, D. J., Cuenca, P., Noh, J. K., Hoffmann, M. H., Factos, A., Lehnert, M., Lozano, P., & Fürst, C. (2022). Priorities of action and research for the protection of biodiversity and ecosystem services in continental Ecuador. *Biological Conservation*, 265, 109404. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109404>
- Kourmouli, A., Valenti, M., van Rijn, E., Beaumont, H. J. E., Kalantzi, O.-I., Schmidt-Ott, A., & Biskos, G. (2018). Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? *Journal of Nanoparticle Research*, 20(3), 62. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4152-3>
- Kumar, B., Kumari, S., Cumbal, L., & Debut, A. (2015). Lantana camara berry for the synthesis of silver nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3), 192–195. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30005-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30005-8)
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2014a). Green Approach for Fabrication and Applications of Zinc Oxide Nanoparticles. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/523869>
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2014b). Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(6), 605–609. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.07.004>
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 45–50.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.006>

- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., & Angulo, Y. (2017). Biofabrication of copper oxide nanoparticles using Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) fruit and leaf. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, S475–S480. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.01.009>
- Kumar, B., Smita, K., Debut, A., & Cumbal, L. (2016). Extracellular green synthesis of silver nanoparticles using Amazonian fruit Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 26(9), 2363–2371. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(16\)64359-5](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(16)64359-5)
- Kurtjak, M., Aničić, N., & Vukomanović, M. (2017). Inorganic Nanoparticles: Innovative Tools for Antimicrobial Agents. In *Antibacterial Agents*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67904>
- Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>
- Lira Gómez, C. F. (2018). *Bacterias: características, morfología, tipos, reproducción*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/bacterias/>
- Luebert, F., & García, N. (2020). Notas sobre el Género *Ambrosia* (Asteraceae: Ambrosiinae) en Chile. *Chloris Chilensis*, 23(1), 77–83. <https://chlorischile.cl/23-1-web/Luebert-Ambrosia.pdf>
- Mat Yusuf, S. N. A., Che Mood, C. N. A., Ahmad, N. H., Sandai, D., Lee, C. K., & Lim, V. (2020). Optimization of biogenic synthesis of silver nanoparticles from flavonoid-rich *Clinacanthus nutans* leaf and stem aqueous extracts. *Royal Society Open Science*, 7(7), 200065. <https://doi.org/10.1098/rsos.200065>
- Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M., & Zoroddu, M. A. (2019). Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(13), 5923–5943. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>

- Mesa Vanegas, M. A., Naranjo, J. P., Diez, A. F., Ocampo, O., & Monsalve, Z. L. (2017). Actividad antibacterial y larvicida sobre *Aedes aegypti* L. de extractos de *Ambrosia peruviana* Willd (Altamisa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1–11. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla111117.pdf>
- Mikhailova, E. O. (2020). Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *Journal of Functional Biomaterials*, 11(4), 84. <https://doi.org/10.3390/jfb11040084>
- Mokobi, F. (2021). *Transmission Electron Microscope (TEM)*. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/transmission-electron-microscope-tem/#limitations-of-transmission-electron-microscope-tem>
- Mondéjar-López, M., López-Jiménez, A. J., Abad-Jordá, M., Rubio-Moraga, A., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., & Niza, E. (2021). Biogenic Silver Nanoparticles from *Iris tuberosa* as Potential Preservative in Cosmetic Products. *Molecules*, 26(15), 4696. <https://doi.org/10.3390/molecules26154696>
- Morejón, B., Pilaquinga, F., Domenech, F., Ganchala, D., Debut, A., & Neira, M. (2018). Larvicidal Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Using Extracts of *Ambrosia arborescens* (Asteraceae) to Control *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Nanotechnology*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/6917938>
- Moya Castillo, E. V. (2017). *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de los extractos vegetales de Marco (Ambrosia arborescens) y Quishuar (Buddleja incana), obtenidos mediante secado por aspersion* [Universidad Técnica de Ambato]. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26010>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica* (7 ma). Elsevier España.
- Novillo Logroño, F. A., & Chamorro Rodríguez, J. G. (2020). *Actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos preparados con diferentes solventes de las hojas de*

Ambrosia arborescens (Marco). Universidad Central del Ecuador.

- Ong, W. T. J., & Nyam, K. L. (2022). Evaluation of silver nanoparticles in cosmeceutical and potential biosafety complications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2085–2094. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.035>
- Panda, B. S. (2021). A Review on Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications. *Letters in Applied NanoBioScience*, 11(1), 3218–3231. <https://doi.org/10.33263/LIANBS111.32183231>
- Proaño, C. (2021). *Elaboracion de productos para la higiene y cuidado de mascotas*.
- Pulit-Prociak, J., & Banach, M. (2016). Silver nanoparticles – a material of the future...? *Open Chemistry*, 14(1), 76–91. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005>
- Raj, S., Chand Mali, S., & Trivedi, R. (2018). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(4), 2814–2819. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.045>
- Rama Krishna, A. G., Espenti, C. S., Rami Reddy, Y. V., Obbu, A., & Satyanarayana, M. V. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Using *Sansevieria Roxburghiana*, Their Characterization and Antibacterial Activity. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30(10), 4155–4159. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01567-w>
- Rautela, A., Rani, J., & Debnath (Das), M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *Journal of Analytical Science and Technology*, 10(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0163-z>
- Reynolds, J. (2021). *Kirby-Bauer (Antibiotic Sensitivity)*. Biology LibreTexts. [https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/09%3A_Kirby-Bauer_\(Antibiotic_Sensitivity\)](https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/09%3A_Kirby-Bauer_(Antibiotic_Sensitivity))

- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., & Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*, 9(5), 2673–2702. <https://doi.org/10.1039/C8RA08982E>
- Safavipour, M., Kharaziha, M., Amjadi, E., Karimzadeh, F., & Allafchian, A. (2020). TiO₂ nanotubes/reduced GO nanoparticles for sensitive detection of breast cancer cells and photothermal performance. *Talanta*, 208, 120369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120369>
- Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A., & Vuong, Q. (2019). Effects of different drying methods on extractable phenolic compounds and antioxidant properties from lemon myrtle dried leaves. *Heliyon*, 5(12), e03044. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03044>
- Salayová, A., Bedlovičová, Z., Daneu, N., Baláž, M., Lukáčová Bujňáková, Z., Balážová, Ľ., & Tkáčiková, Ľ. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity Using Various Medicinal Plant Extracts: Morphology and Antibacterial Efficacy. *Nanomaterials*, 11(4), 1005. <https://doi.org/10.3390/nano11041005>
- Stabryla, L. M., Johnston, K. A., Diemler, N. A., Cooper, V. S., Millstone, J. E., Haig, S.-J., & Gilbertson, L. M. (2021). Role of bacterial motility in differential resistance mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Nature Nanotechnology*, 16(9), 996–1003. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00929-w>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Student Health Center. (2019). *Kirby Bauer Antibiotic Sensitivity*. Student Health Center Manuals. <http://shs-manual.ucsc.edu/policy/kirby-bauer-antibiotic-sensitivity#:~:text=The Kirby-Bauer test%2C known,growth measured under standard conditions.>

- Supraja, N., Prasad, T. N. V. K. V., Gandhi, A. D., Anbumani, D., Kavitha, P., & Babujanathanam, R. (2018). Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial efficacy and brine shrimp lethality assay of *Alstonia scholaris* stem bark extract mediated ZnONPs. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *14*, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.04.004>
- Understanding Science. (2010). *Atoms and X-rays: Seeing inside a crystal*. https://undsci.berkeley.edu/article/0_0_0/dna_04
- University of Texas Herbarium. (1990). *Ambrosia peruviana*. <http://w3.biosci.utexas.edu/prc/MEXCOMP/pages/Ambrosia-peruviana.html>
- Valenzuela Mena, J. C. (2020). *Estudio Farmacognóstico de las Especies Kalanchoe gastonis-bonnierii y Kalanchoe daigremontiana* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/23076/1/UCE-FCQ-VALENZUELA JAZMIN.pdf>
- Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B., & Rokhum, S. L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. *RSC Advances*, *11*(5), 2804–2837. <https://doi.org/10.1039/D0RA09941D>
- Vázquez-González, Y., Ragazzo-Sánchez, J. A., & Calderón-Santoyo, M. (2020). Characterization and antifungal activity of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) leaf extract obtained using conventional and emerging technologies. *Food Chemistry*, *330*, 127211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127211>
- Vu, H. T., Scarlett, C. J., & Vuong, Q. V. (2019). Maximising recovery of phenolic compounds and antioxidant properties from banana peel using microwave assisted extraction and water. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(3), 1360–1370. <https://doi.org/10.1007/s13197->

019-03610-2

- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology* (7 ma). McGraw-Hill.
- Wu, M., Liu, P., Wang, S., Zhong, C., & Zhao, X. (2021). Ultrasonic Microwave-Assisted Micelle Combined with Fungal Pretreatment of *Eucommia ulmoides* Leaves Significantly Improved the Extraction Efficiency of Total Flavonoids and Gutta-Percha. *Foods*, *10*(10), 2399. <https://doi.org/10.3390/foods10102399>
- Yáñez C., C. A., Rios, N., Mora, F., Rojas, L., Diaz, T., Velasco, J., Rios, N., & Melendez, P. (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Revista Peruana de Biología*, *18*(2), 149–151. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332011000200003
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>

Apéndices