



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN
METALURGIA Y MATERIALES

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

TÍTULO:

**“Síntesis verde y caracterización de nanoestructuras de Ag para su
evaluación en levaduras como modelo celular eucariota”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN METALURGIA
Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES QUE PRESENTA:

M.C. Mario Alejandro Villalpando Nieves

ASESOR:

Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo

CO-ASESOR:

Dr. Francisco Alfredo Saavedra Molina

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO 2023



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales

Of. Num. IIMM-ST-002-2023
Morelia, Mich., a 07 de Febrero de 2023

M.C. MARIO ALEJANDRO VILLALPANDO NIEVES
Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales con la tesis titulada: "SINTESIS VERDE Y CARACTERIZACION DE NANOESTRUCTURAS DE Ag PARA SU EVALUACION EN LEVADURAS COMO MODELO CELULAR EUCARIOLA", le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

91002524	DR. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO	(PRESIDENTE)
91002630	FRANCISCO ALFREDO SAAVEDRA MOLINA	(Co-Presidente)
19000251	DRA. TZARARA LOPEZ LUKE	(Vocal)
17010279	DR. RODRIGO ALONSO ESPARZA MUÑOZ	(Vocal)
97003581	DR. JUAN ZARATE MEDINA.	(Vocal)
01000489	DR. JORGE ALEJANDRO VERDUZCO MARTINEZ	(Suplente)

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

U. M. S. N. H.



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales

Dr. Víctor Hugo López Morelos
Director

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la colaboración de muchas personas, debido a que en los momentos más precisos me han brindado apoyo, conocimiento, recuerdos y herramientas necesarios para desenvolverme profesionalmente de la mejor manera. Por ello, a través de estas líneas, me gustaría expresar mi más profundo y sincero sentimiento hacia las personas que con su tiempo, dedicación y aporte científico me brindaron los instrumentos adecuados para lograr que el trabajo resultara de calidad para la comunidad científica.

Primeramente, agradezco a todas las instituciones que han hecho posible la culminación de este trabajo. Por su patrocinio y apoyo económico para lograr que este proyecto terminara en tiempo y forma agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). En el mismo orden, agradezco al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales e Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por el tiempo invertido en mi en conocimiento, herramientas, equipos de trabajo y formación altamente profesional para el desarrollo del proyecto de investigación.

Quedo especialmente agradecido con mis asesores del proyecto, el Dr. Alfredo Saavedra Molina que me apoyó en el área biológica de manera prioritaria, permitiendo que algunos resultados de este trabajo culminaran en publicaciones en revistas internacionales. De igual manera, agradezco al Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo que me integró en su grupo de trabajo desde hace unos años, lo que me ha permitido crecer de manera profesional como investigador. Es importante mencionar, que con sus sugerencias, correcciones y material de apoyo por parte de ambos doctores pude dar un salto de calidad en mi vida profesional, por ello estoy profundamente agradecido. No obstante, quiero agradecerlas de manera profunda el apoyo personal que recibí cuando sufrí el sensible fallecimiento de mi padre, creo que altamente que su comprensión, guía y apoyo me ayudaron a superar los obstáculos más complicados en mi camino para lograr este objetivo.

Dedicatorias

Dedico este trabajo con toda la humildad de mi corazón a Dios, el cual me dio la fortaleza cuando estuve a punto de colapsar.

En el mismo orden, dedico esta tesis a mis padres Mario Villalpando Manríquez y María Alejandra Nieves Chapela por ser los cimientos y pilares fundamentales en la construcción de mi vida a lo largo de los años. Definitivamente, sin ellos no sería la persona de alto valor que soy hoy en día. Tampoco me olvido de mis hermanos Fernando Villalpando Nieves y Alondra Villalpando Nieves, que me impulsaron a seguir cuando sufrimos el fallecimiento de mi padre en tiempos de pandemia con su amor y su apoyo. Finalmente, dedico este trabajo a mis familiares, amigos y mi pareja que me han ayudado de diversas formas al cumplimiento de mis objetivos y metas.

Quiero resaltar un cariño especial a mi padre Mario Villalpando Manríquez que me amó y me brindó su apoyo cuando más lo necesité, hasta que su vida lo permitió. Enaltezco en estas líneas el amor a mi madre María Alejandra Nieves Chapela por levantarme en los días que sufrí debilidad. Gracias a ella por contagiarme su fortaleza y cariño para seguir sonriendo en la vida.

Por ello, me toca regresar un poco de todo lo inmenso que me han entregado en diversas formas.

Con todo mi amor y cariño, este trabajo es para ustedes.

Finalmente dejo unas palabras de motivación para todo aquel que lea este trabajo:

La vida es un pequeño instante en el cual el ser humano es capaz de ver, tocar, probar, sentir y amar. Por ello, no pierdas el tiempo sufriendo por situaciones pasadas o peor aún, por cosas futuras. Vive cada instante, abraza tu presente, di lo que piensas, llora, sonríe y realiza lo que siempre has querido hacer, porque solamente de ese modo habrá valido la pena tu existencia en esta pequeña coincidencia llamada vida.

Atentamente: Dr. Mario Alejandro Villalpando Nieves

CONTENIDO

Resumen	xii
Abstract.....	xiii
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	4
1.1.1 Objetivos específicos	4
1.2 Hipótesis	5
CAPITULO II.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Nanociencia y nanotecnología	6
2.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras	7
2.2.1 Teoría de formación de nanoestructuras	10
2.2.1.1 Nucleación.....	11
2.2.1.2 Etapas del crecimiento de los núcleos	14
2.2.1.3 Fenómeno Ostwald ripening.....	16
2.2.1.4 Terminación o estabilización de las nanopartículas	17
2.2.1.5 Crecimiento en nanoestructuras metálicas 1D.....	18
2.3 Aplicaciones de los nanomateriales de plata	20
2.4 Características y constituyentes fitoquímicos de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> ...	21
2.5 Levadura como modelo celular eucariota.....	22
2.5.1 Metabolismo celular de las levaduras	23
2.5.2 Definición y composición de la membrana plasmática	25
2.5.3 Transporte a través de la membrana	29

2.6 Estado actual	34
2.6.1 Síntesis y caracterización de nanoalambres de plata	34
2.6.2 Mecanismo de acción de las AgNPs en células eucariotas	48
CAPITULO III	56
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	56
3.1 Molienda de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	56
3.1.1 Preparación de la infusión	57
3.2 Análisis bromatológico y fitoquímico	57
3.2 Análisis proximal	59
3.3 Síntesis de nanoestructuras de plata.....	63
3.3.1 Variación de la concentración del extracto de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	64
3.3.2 Variación de la concentración de la sal precursora	64
3.3.3 Variación del agente nucleante	64
3.4 Resonancia magnética nuclear.....	65
3.4.1 Identificación de compuestos mayoritarios.....	65
3.5 Extracción de los compuestos principales de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	65
3.5.1 Maceración de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	65
3.5.2 Separación de los compuestos principales de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	65
3.6 Estimación de la concentración de las nanoestructuras de plata por medio de espectroscopia de absorción atómica.....	66
3.5 Caracterización de los nanomateriales.....	66
3.7 Ensayos de toxicidad en levaduras	68
3.7.1 Cultivo de las cepas de levaduras	68
3.7.2 Ensayo de crecimiento celular	68
3.7.3 Ensayo viabilidad celular.....	69

3.7.4	<i>Exclusión mediante azul de Tripano</i>	69
3.8	Evaluación antibacterial de las nanoestructuras de Ag.....	71
CAPITULO IV		72
4.1	Análisis proximal e identificación de metabolitos presentes en el extracto de la planta	72
4.1.1	<i>Identificación de metabolitos</i>	72
4.2	Análisis proximal	75
4.3	Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.....	77
4.4	Síntesis de nanopartículas de Ag a partir del extracto de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	79
4.4.1	<i>Cambio de coloración en sistemas nanométricos</i>	79
4.4.2	<i>Determinación de nanopartículas de Ag mediante espectroscopia UV-Vis</i>	80
4.4.3	<i>Caracterización de las AgNPs mediante MEB</i>	81
4.4.4	<i>Análisis estructural de las AgNPs mediante DRX y MET</i>	81
4.5	Autoensamblado de nanopartículas 0D a sistemas superiores (encadenamiento de nanopartículas).....	84
4.6	Identificación de los compuestos asociados a la síntesis de nanopartículas de Ag mediante FT-IR y RMN.....	87
4.7	Síntesis de nanoestructuras 1D de plata (AgNWs).....	89
4.7.1	<i>Síntesis de nanoestructuras de Ag empleando la sal Cu (CH₃COO)₂H₂O como agente nucleante</i>	89
4.7.2	<i>Variación de la infusión con la sal Cu (CH₃COO)₂H₂O como agente nucleante</i>	99
4.7.3	<i>Síntesis de nanoestructuras de Ag empleando la sal Cu (NO₃)₂ como agente nucleante</i>	108
4.8	Elucidación del compuesto principal de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> en la síntesis de nanoestructuras de Ag.....	113

4.9 Ensayos biológicos.	122
4.9.1 <i>Determinación de la concentración empleando espectroscopia de absorción atómica</i>	122
4.9.2 <i>Determinación del crecimiento celular en levaduras con AgNPs</i>	123
4.9.3 <i>Determinación de la viabilidad celular en levaduras con AgNPs</i>	126
4.9.4 <i>Determinación del crecimiento celular en levaduras con nanoestructuras de Ag</i>	127
4.9.5 <i>Determinación de la viabilidad celular en levaduras con nanoestructuras de Ag mediante el ensayo de exclusión con azul de Tripano.</i>	130
4.10 Evaluación antibacterial de AgNPs y nanocintas de Ag.....	131
CAPITULO V. CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	139
PRODUCTOS OBTENIDOS	157
Artículos indexados	157
Proceedings	157
CURRICULUM VITAE	158
Formación académica	158
Asistencia a congresos nacionales e internacionales:	159
Idiomas:	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 Comparación de objetos a diversas escalas.....	7
Figura 2. 2 Clasificación de las nanoestructuras de acuerdo a sus dimensiones [32].	8
Figura 2. 3 Enfoques de síntesis de nanoestructuras a) proceso bottom-up, b) proceso top-down.	9

Figura 2. 4 Reducción de la energía libre total de Gibbs de una solución sobresaturada formando una fase sólida y manteniendo una concentración de equilibrio en la solución [33].	12
Figura 2. 5 Cambio de energía de volumen en función del radio crítico [33]......	13
Figura 2. 6 a) Procesos de nucleación y posterior crecimiento, b) relación entre las tasas de nucleación y crecimiento y la concentración de especies de crecimiento [33].	14
Figura 2. 7 a) Crecimiento capa por capa, b) crecimiento al azar.	16
Figura 2. 8 Fenómeno de maduración de Ostwald ripening.....	17
Figura 2. 9 Tipos de estabilización de nanopartículas.....	18
Figura 2. 10 Esquema del proceso de formación de AgNWs a través del método del poliol [48].	19
Figura 2. 11 Planta <i>Lavandula angustifolia</i> en la naturaleza.	22
Figura 2. 12 Composición química de la pared celular [61].	24
Figura 2. 13 Imágenes de MEB de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [61].	24
Figura 2. 14 Zonas de una molécula de fosfolípido [66]......	26
Figura 2. 15 Principales fosfolípidos de la membrana plasmática en células de mamíferos [66].	27
Figura 2. 16 Actualización del modelo de la membrana de mosaico fluido [69]......	29
Figura 2. 17 Permeabilidad relativa de una bicapa lipídica a diferentes tipos de moléculas [66].	30
Figura 2. 18 Mecanismos de transporte facilitado a) moléculas transportadoras, b) poros proteicos [66]......	31
Figura 2. 19 Mecanismos mediados por proteínas transportadoras [66]......	32
Figura 2. 20 Comparación entre transporte activo y pasivo de acuerdo al gradiente electroquímico [66]......	33
Figura 2. 21 Transporte de macromoléculas a) endocitosis, b) exocitosis [71].	33
Figura 2. 22 Semillas de AgNWs a) patrón de DRX, b) imagen de TEM y c) espectro de UV-Vis [72].	35
Figura 2. 23 Imágenes de MEB y patrones de DRX de AgNWs preparados por reacción solvotérmica (a-b) ausencia de alcohol isopropílico (c-d) presencia de alcohol isopropílico [72].	36

Figura 2. 24 a) Espectros de absorción UV-Vis a diferentes tiempos (b, c) imágenes de MET e (d, e) imágenes MEB de alícuotas tomadas de la solución de reacción. Las alícuotas fueron removidas 8 (b, c) y 20 (d, e) min después de la adición gota a gota de solución de AgNO ₃ [72].	38
Figura 2. 25 Representación esquemática de la síntesis de AgNWs empleando el aceite de la planta <i>Syzygium Aromaticum</i> [74].	39
Figura 2. 26 Análisis de formación de AgNWs a) espectros de UV-Vis [(a) AgNPs-0.5 mM de AgNO ₃ , (b) AgNWs- 100 mM de AgNO ₃ y (c) AgNWs-150 mM of AgNO ₃ y b) difractograma de rayos X [74].	40
Figura 2. 27 Imágenes de TEM a) forma anisotrópica de nanopartículas de plata (0.5 mM de AgNO ₃ , b) AgNWs (100 mM de AgNO ₃), c) AgNWs (150 mM AgNO ₃) e histograma de tamaños, d) unión de AgNWs, e) AgNW individuales cubierto por aceite de clavo, f) HR-TEM, g) espectro EDS y h) patrón SAED de AgNWs [74].	41
Figura 2. 28 Mecanismo de nanoagujas de plata en dos pasos [75].	42
Figura 2. 29 AgNPs sintetizadas a) espectro de UV-Vis, b) patrón de difracción de rayos X e c) imagen de MET [75].	44
Figura 2. 30 Imágenes de MEB de las nanoagujas de plata (a- b) AgNPs conectadas entre sí formando una estructura en forma de aguja y c) Nanoalambres con diámetros entre 60–80 nm [75].	45
Figura 2. 31 Imágenes de MET en diferentes etapas de reacción: a) t = 0.5 h, b) t = 4 h, c) t = 8 h, d) t = 12 h, e) t = 24 h, f) t = 48 h y h) espectros de UV-Vis [80].	46
Figura 2. 32 Representación esquemática del proceso de decantación y purificación con disolventes [81].	47
Figura 2. 33 Efecto de las AgNPs en la viabilidad celular a) RAW 264.7 Y b) MCF-7 [90].	51
Figura 2. 34 Imágenes morfológicas de MCF-7 después de la exposición a reactivos experimentales (barra de escala 50 μm) [90].	51
Figura 2. 35 Evaluación de citotoxicidad, generación de ERO y apoptosis de AgNPs iones de plata en HUVECs. a) ensayo MTT en AgNPs, b) viabilidad celular de iones de plata, c) determinación de ERO y d) ensayo de apoptosis celular utilizando tinción con anexina V / PI [91].	53

Figura 2. 36 Imágenes de TEM de la localización de las AgNPs en células HepG2 (a-b) células no tratadas sin cambios morfológicos, c) AOT-AgNPs encontrado en endosoma después de 24 h, d) Proceso de internalización de AOT-AgNPs en células HepG2, e) aglomerados de PVP-AgNPs encontrados en la estructura de membrana, f) BSA-AgNPs encontrado en mitocondrias de células HepG2, g) agregados y partículas individuales de PLL-AgNPs en lisosomas y h) CTAB-AgNPs encontrado en lisosomas [92]..... 54

Figura 3. 1 Estrategia general del procedimiento experimental. 56

Figura 4. 1 Ensayos cualitativos de metabolitos secundarios a) enlaces etilénicos, b) saponinas, c) flavonoides, d) taninos, e) alcaloides, f) terpenos, g) azúcares reductores, h) monosacáridos. 74

Figura 4. 2 Espectros de RMN del protón ^1H a) extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, b) remanente de la reacción. 79

Figura 4. 3 Mecanismo de formación de AgNPs a partir de flavonoides..... 79

Figura 4. 4 Cambio de coloración de las nanoestructuras de Ag con respecto al tiempo. ... 80

Figura 4. 5 Espectro de UV-Vis obtenido a diferentes concentraciones molares de la sal precursora AgNO_3 [120]. 81

Figura 4. 6 Imágenes de MEB de las AgNPs a concentración 5 mM y su correspondiente análisis químico puntual (EDS) [120]. 82

Figura 4. 7 Patrón DRX de las AgNPs a concentración 5 mM. Los ángulos y familias de planos a 38° (111), 44° (200), 64° (220), y 77° (311) corresponden a la estructura cúbica centrada en la cara (fcc) del cristal de plata [120]. 83

Figura 4. 8 a) Imagen de campo claro que muestra AgNPs a concentración 5 mM con morfologías esféricas y semiesféricas, b) histograma de tamaños, e c) imagen de alta resolución (HRTEM) de las AgNPs donde los planos de red son visibles e indican su naturaleza cristalina [120]. 83

Figura 4. 9 Espectros UV-Vis de AgNPs sintetizados con diferente agitación magnética [32]. 85

Figura 4. 10 Micrografías MEB de nanoestructuras de plata; a) 0 rpm, b) 200 rpm, c) 600 rpm y d) análisis EDS [32]. 86

Figura 4. 11 AgNPs sintetizadas a 200 rpm, a) imagen de campo claro, b) imagen de alta resolución que indica su naturaleza cristalina y c) patrón DRX [32].	86
Figura 4. 12 Comparación de espectros de ¹ H RMN de a) extracto de <i>Lavandula angustifolia</i> y b) sobrenadante de la reacción de nanopartículas de plata [120].	87
Figura 4. 13 Espectros FTIR obtenidos de las diferentes muestras a) extracto preparado a partir de <i>Lavandula angustifolia</i> b) AgNPs [120].	88
Figura 4. 14 Espectro de UV-Vis de AgNWs empleando acetato de cobre como agente nucleante.	90
Figura 4. 15 Nanoalambres empleando Cu (CH ₃ COO) ₂ H ₂ O como agente nucleante a) AgNWs con baja relación de aspecto, b) zona concentrada del material sintetizado c) agrupamiento formado estambres y d) AgNW individual con diámetro de 110 nm.	91
Figura 4. 16 Mapeo químico de una porción de nanoalambres a) imagen en gris, b) elemento plata, c) oxígeno, d) cobre y e) cloro.	92
Figura 4. 17 Difractograma de los AgNWs empleando Cu (CH ₃ COO) ₂ H ₂ O como agente nucleante.	93
Figura 4. 18 Espectro de UV-vis de AgNWs empleando el acetato de Cu como nucleante a una concentración de 2.5 mM.	94
Figura 4. 19 AgNWs con acetato de Cu a concentración de 2.5 mM a) panorama general, b) alambres con alta relación de aspecto, c) diferentes nanoestructuras de Ag y d) crecimiento de los NWs a partir de NPs.	95
Figura 4. 20 Nanoestructuras de Ag tipo lámina plegada a) panorama general, b) nanolistones y c) crecimiento de nanolistones a partir de NWs con alta relación de aspecto.	96
Figura 4. 21 Nanoestructuras sintetizadas con 2.5 mM de acetato de Cu a) alambres rugosos rodeados de partículas, b) nanocables con alta relación de aspecto, c) nanocintas formadas y d) formación de las nanocintas a partir de la coalescencia de NPs.	97
Figura 4. 22 Análisis químico de las nanocintas a) EDS, b) imagen en gris, c) evaluación en conjunto de los elementos Ag y Cu, d) plata y e) cobre.	98
Figura 4. 23 Patrón DRX de las nanocintas de Ag obtenidas por métodos verdes.	99
Figura 4. 24 Espectros de UV-Vis de nanoestructuras de plata sometidas a agitación constante de 800 rpm (ver tabla 4.3).	101

Figura 4. 25 Micrografías de MEB de la muestra 1 A, a) alambre de dimensiones micrométricas, b) forma rugosa del alambre de Ag, c) láminas que conforman la estructura, d) AgNPs de formas y tamaños irregulares presentes en la estructura.....	102
Figura 4. 26 Análisis químico EDS del ensayo 1 A.	103
Figura 4. 27 Imágenes de MEB de la muestra 2 A, a) diversidad de formas de Ag, b) alineación de la estructura micrométrica de Ag, c) estructura conformada por láminas y AgNPs y d) nanopartículas de tamaños y formas irregulares.....	104
Figura 4. 28 Espectros de UV-Vis de los ensayos 1B y 2B sin proceso de agitación.....	105
Figura 4. 29 Imágenes de MEB de la muestra 1 B, a) AgNW con longitud superior a 20 μm , b) conjunto de AgNPs y AgNW, c) AgNPs en forma de tetraedros truncados adhiriéndose al nanoalambre y d) AgNW con diámetro de 45 nm.....	106
Figura 4. 30 Imágenes de MEB de la muestra 2 B, a) nanoestructuras de plata, b) partículas irregulares adhiriéndose al nanoalambre, c) posible coalescencia y d) nanoestructura final del proceso de coalescencia.....	107
Figura 4. 31 Espectro de UV-Vis de AgNWs empleando nitrato de cobre como agente nucleante.....	108
Figura 4. 32 Nanoestructuras de plata empleando $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ como agente nucleante a) panorama general a 2000 X, b) diversidad de formas a 10 000 X, c) crecimiento de NWs a través de un cristal, d) ancho de un nanoalambre.....	110
Figura 4. 33 Nanoestambres obtenidos a) panorama general, b) nanoestambres unidos y c) nanoestambre hueco.	111
Figura 4. 34 Nanoestructuras obtenidas mediante la sal nitrato de cobre a) NPs, nanodentritas y esferas, b) nanoesfera compuesta de láminas y c) análisis químico EDS.	112
Figura 4. 35 Patrón DRX de las nanoestructuras obtenidas empleando la sal nitrato de cobre.	113
Figura 4. 36 Espectro de RMN de ^1H del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (400 MHz, DMSO-d_6).	114
Figura 4. 37 Espectro de RMN de ^1H de la fracción obtenida con CH_2Cl_2 a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (400 MHz, CDCl_3).	115
Figura 4. 38 Espectro de RMN de ^1H de la fracción obtenida con Acetona a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (400 MHz, DMSO-d_6).	115

Figura 4. 39 Espectro de RMN de ^1H de la fracción obtenida con MeOH a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (400 MHz, DMSO- d_6).....	116
Figura 4. 40 Espectro de RMN de ^1H del Kaemferol-3-O-ramnósido obtenido de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (400 MHz, DMSO- d_6).	117
Figura 4. 41 Espectro COSY del Kaemferol-3-O-ramnósido obtenido de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (400 MHz, DMSO- d_6).	117
Figura 4. 42 Espectro de RMN de ^{13}C del Kaemferol-3-O-ramnósido obtenido de las partes aéreas de <i>Lavandula angustifolia</i> . (100 MHz, DMSO- d_6).	118
Figura 4. 43 Mecanismo químico del proceso de formación de nanoestructuras de Ag empleando la planta <i>Lavandula angustifolia</i> como agente reductor-estabilizador.	120
Figura 4. 44 Mecanismo de crecimiento de las nanoestructuras Ag obtenidas.....	122
Figura 4. 45 Curva estándar de iones de Ag para cálculo de la concentración.	123
Figura 4. 46 Ensayo de crecimiento celular en distintas cepas de levaduras a) <i>S. cerevisiae MC4</i> b) <i>K. marxianus OFF1</i> c) <i>K. marxianus SLP1</i> d) <i>S. cerevisiae W303</i> [120].....	125
Figura 4. 47 Ensayo de viabilidad celular en distintas cepas de levaduras a) <i>S. cerevisiae MC4</i> b) <i>K. marxianus OFF1</i> c) <i>K. marxianus SLP1</i> d) <i>S. cerevisiae W303</i> [120].....	127
Figura 4. 48 Comparativo de la evaluación de nanoestructuras de Ag en el ensayo de crecimiento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae MC4</i>	129
Figura 4. 49 Exclusión por azul de Tripano en <i>Saccharomyces cerevisiae MC4</i> a) sin tratamiento, b) <i>Lavandula angustifolia</i> , c) AgNPs, d) nanocintas de Ag y e) AgNO ₃	131
Figura 4. 50 Evaluación del poder antibacterial del AgNO ₃ a diferentes concentraciones a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. aureus</i>	132
Figura 4. 51 Método Kirby-Bauer en <i>E. coli</i> de a) AgNPs y b) AgNWs a diferentes concentraciones.	133
Figura 4. 52 Método Kirby-Bauer en <i>S. aureus</i> de a) AgNPs y b) AgNWs a diferentes concentraciones.	133
Figura 4. 53 MIC en caldo Mueller-Hinton del control positivo y negativo del ensayo...	134
Figura 4. 54 Prueba MIC en agar Mueller-Hinton de las muestras seleccionadas a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. aureus</i>	135
Figura 4. 55 Kirby- Bauer de AgNPs y AgNWs sin lavar (directo) y sus residuos del primer centrifugado (S1) a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. aureus</i>	136

INDÍCE DE TABLAS

Tabla 4. 1 Identificación de metabolitos	75
Tabla 4. 2 Análisis bromatológico de la planta <i>Lavandula angustifolia</i>	77
Tabla 4. 3 Condiciones finales de los ensayos de la síntesis de nanoestructuras de Ag	100

Resumen

En los últimos años, la síntesis de nanomateriales metálicos, especialmente aquellos hechos de plata, ha atraído el interés de la investigación debido a sus múltiples aplicaciones potenciales en campos tecnológicos y especialmente médicos. Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata (AgNPs) en bacterias han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, el mecanismo de acción en las células eucariotas aún es incierto. Por esta razón, es importante conocer la citotoxicidad en levaduras ya que es poco explorada en ciencia de materiales. Además, su estudio es una alternativa viable en salud humana ya que estos microorganismos tienen la misma estructura celular en organización y procesamiento en comparación con células de mamíferos como los humanos.

Por otro lado, los nanocables de plata (AgNWs) están siendo investigados por su alta conductividad eléctrica, lo que les permite tener un alto potencial en campos como la detección óptica, la catálisis, los sensores químicos y la biomedicina. Sin embargo, la mayoría de los métodos utilizados para sintetizar estos nanomateriales son caros, complejos y generalmente utilizan reactivos nocivos para el medio ambiente.

Por tal motivo, la presente investigación se enfoca en sintetizar nanoestructuras de Ag mediante un método verde simple, empleando la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor de las sales precursoras y estabilizante de los nanosólidos obtenidos. Además, se determinaron los tamaños, formas, dispersión y estructura cristalina mediante diferentes técnicas de caracterización como espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopía infrarroja (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X (XRD), microscopía de barrido (SEM) y microscopía de transmisión (TEM). A partir de la información obtenida se determinó el mecanismo químico y de formación de las nanoestructuras sintetizadas. Se evaluaron iones de plata, nanopartículas y nanocables como complemento en cuatro cepas de levadura, empleando ensayos de viabilidad y crecimiento celular para determinar su toxicidad.

Palabras clave: *Lavandula angustifolia*, nanoalambres, agente nucleante, Kaempferol-3-O-ramnosido, citotoxicidad.

Abstract

In recent years, the synthesis of metallic nanomaterials, especially those made of silver, has attracted research interest due to many potential applications in technological and especially medical fields. The antimicrobial properties of silver nanoparticles (AgNPs) in bacteria have been widely studied. However, the mechanism of action in eukaryotic cells is still uncertain. For this reason, it is important to know the cytotoxicity in yeasts since it is little explored in materials science. In addition, their study is a viable alternative in human health since these microorganisms have the same cellular structure in organization and processing compared to mammalian cells such as humans.

On the other hand, silver nanowires (AgNWs) are being investigated for their high electrical conductivity, allowing them to have high potential in fields such as optical detection, catalysis, chemical sensors, and biomedicine. However, most of the methods used to synthesize these nanomaterials are expensive, complex, and generally use environmentally harmful reagents.

For this reason, the present investigation focuses on synthesizing Ag nanostructures using a simple green method, employing the *Lavandula angustifolia* plant as a reducing agent of the precursor salts and stabilizers of the obtained nano solids. In addition, the sizes, shapes, dispersion, and crystalline structure were determined by different characterization techniques such as ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray diffraction (XRD), scanning microscopy (SEM) and transmission microscopy (TEM). The chemical and formation mechanism of the synthesized nanostructures was determined from the information obtained. Silver ions, nanoparticles, and nanowires were evaluated as a complement in four yeast strains, employing cell growth and viability assays to determine their toxicity.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, la contaminación ambiental ha aumentado en el mundo debido al crecimiento industrial y demográfico, esto causado por la alta demanda de diversos productos consumibles por el hombre [1], que en su elaboración o procesamiento emplean un gran número de reactivos químicos, teniendo como consecuencia la generación de una mayor cantidad de residuos peligrosos que son perjudiciales para la salud humana [2]. Con el desarrollo de la nanotecnología, se ha investigado una diversidad de técnicas de síntesis en distintos campos para la elaboración de diversos nanomateriales, siendo éstos la física del estado sólido, la química y el área de ingeniería [3]. En el caso de los nanomateriales compuestos de plata, la forma más estudiada es la de nanopartículas, en donde el método químico convencional ha sido empleado en mayor medida para la síntesis de éstas mismas debido a su alto rendimiento y control, no obstante, uno de sus mayores problemas es el empleo de reactivos tóxicos utilizados en el proceso de reducción y estabilización de los nanomateriales, los cuales resultan difíciles de eliminar al quedar impregnados de residuos, generando mayor toxicidad. Por el contrario, la síntesis verde ha encontrado una solución a muchos de estos problemas.

De hecho, en la actualidad existe una gran cantidad de información acerca de este método para obtener nanopartículas de plata (AgNPs) con tamaños y formas controladas empleando procesos de ingeniería genética, clonación molecular, extractos de plantas y otras técnicas biológicas, que permiten el avance científico en el campo de la nanobiotecnología [4]. Por lo cual, el empleo de métodos verdes se ha convertido en una alternativa maravillosa, debido a que tiene un enfoque no tóxico, respetuoso con el medio ambiente, limpio, menos costoso, casi nuevo y sencillo, ya que, puede ser realizado a presión y temperatura ambiental [4-6]. Además, se puede considerar como un método biocompatible, ya que, conecta el área de ciencia de materiales y la biotecnología [4]. Los materiales compuestos de plata, en especial las nanopartículas, son empleadas en aplicaciones de la vida diaria como en el uso de productos de limpieza, limpiadores de telas, para mejorar la transferencia de calor en los colectores de energía solar, como recubrimientos antirreflejantes, en productos electrónicos

de alto rendimiento [7]. Sin embargo, debido al efecto bactericida de los iones Ag^+ , la aplicación más importante es en el campo médico como agente antibacterial. No obstante, ésta puede ser trasladada a otras formas (cubos, alambres, triángulos, etc.) y tamaños de las nanoestructuras de Ag, con base en que las propiedades cambian de acuerdo a estas características [8, 9]. Por otro lado, las levaduras han sido empleadas como modelo celular eucariota por mucho tiempo, esto se debe a su similitud a las células de los mamíferos y son económicamente más accesibles. Por esta razón, es importante conocer aquellos mecanismos por los cuales algún agente externo daña a este tipo de microorganismos, ya que con ellos se puede hacer una primera aproximación del posible efecto sobre los seres humanos [10].

Por lo tanto, la idea central de esta investigación es sintetizar nanoalambres de Ag (AgNWs), empleando la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor de las sales precursoras y estabilizantes de los nanosólidos obtenidos. Además, se determinarán los tamaños, formas, dispersión y estructura cristalina por distintas técnicas de caracterización como son espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X (DRX), microscopía de barrido (MEB) y microscopía de transmisión (MET). Por otro lado, se evaluará la toxicidad de la plata en forma de nanopartículas mediante ensayos de crecimiento y viabilidad celular.

Justificación

La síntesis de diversos nanomateriales metálicos ha sido lograda en mayor medida través del método químico convencional debido a su alto rendimiento, no obstante, este proceso emplea reactivos perjudiciales para la salud y el medio ambiente. De hecho, se ha comprobado que el Borohidruro de sodio (NaBH_4) y la anilina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$), que son usados como agentes reductores de diversas sales metálicas, causan irritación, náuseas y vómitos, si se tiene continua exposición [11, 12]. Además, se ha corroborado que las nanopartículas que son sintetizadas por medio de NaBH_4 quedan impregnadas de boro, por esta razón, su empleo en el área biológica se ve limitada. En el caso de la anilina, ésta presenta mayor potencial de toxicidad hacia los humanos, ya que modifica perjudicialmente la hemoglobina y ocasiona daño oxidativo del ADN, causando numerosas condiciones patológicas incluyendo el cáncer [13]. Otro de los puntos en contra de este tipo de procesos es su complejidad, ya que, cuando se requiere sintetizar otras estructuras como alambres, rodillos,

triángulos entre otros, se necesitan modificadores de forma, que además, tienen un elevado costo [9].

Por este motivo, con el fin de minimizar las sustancias que afectan al medio ambiente y la salud humana, la síntesis verde asistida por medio de la planta *Lavandula angustifolia* se convierte en una alternativa viable en la producción de distintas nanoestructuras de Ag, principalmente, porque es una planta de fácil adquisición, costo accesible en México [14]. De hecho, ésta planta se ha empleado por años en la medicina tradicional mexicana para aliviar dolores, infecciones, y como agente de relajación y sedación. Además, se ha empleado para erradicar enfermedades antiinflamatorias, degenerativas, infecciosas y carcinogénesis [15-17]. Sin embargo, la principal razón de emplear el extracto acuoso de esta planta se debe a su potencial reductor causado por una gran proporción del flavonoide kaempferol malonil glucósido [18]. Además, está conformada por otros compuestos antioxidantes presentes en concentraciones más bajas como lo son el ácido ursólico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico-4-O-glucósido, ácido rosmarínico, apigenina ramnosil glucósido e i-vitexina kaempferol-3-cumaroyl glucósido [18], en donde los compuestos orgánicos como azúcares, fenoles, flavonoides, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos y antocianinas que fungen como agentes reductores, estabilizadores y modificadores de forma a través de reacciones redox por parte de los flavonoles del tipo de los kaempferoles hasta compuestos derivados del ácido benzoico, en donde finalmente la nanoestructura se estabilizará mediante aductos entre los compuestos orgánicos formados y el metal [19, 20]. Es conveniente destacar, que el costo de esta vía de síntesis es mucho más económica y sencilla en comparación con el método convencional, ya que, se han logrado controlar tamaños y formas a temperatura ambiente. Además, de ser biocompatibles en distintos procesos biológicos, lo que facilita su empleo en el área de la nanomedicina [4-6].

Por otro lado, ha sido ampliamente estudiada la actividad antibacterial de las AgNPs en una gran cantidad de bacterias y su toxicidad en algunas líneas celulares, pero aunque existen algunas hipótesis centradas en el daño celular, pocos estudios han sido enfocados en determinar y mostrar el mecanismo de acción de las nanopartículas en levaduras [7]. Es necesario mencionar que las cepas empleadas en el presente trabajo son del género de *Saccharomyces cerevisiae* MC4 y W303, y *Kluyveromyces marxianus* OFF1 y SLP1, en

donde la diferencia radica en la capacidad de tolerar altas temperaturas. En ambas cepas, esta tolerancia está relacionada con su resistencia hacia el estrés oxidativo y capacidad antioxidante, ya que el incrementar la temperatura aumenta el estrés oxidativo y la sobreexpresión de genes de enzimas antioxidantes en *Saccharomyces cerevisiae* [21]. Aquí radica la principal diferencia entre las cepas de levaduras, debido a que tienen una composición de ácidos grasos saturados menores del 50%. El porcentaje de la suma de ácidos grasos saturados es de 45, 48 y 47% para el *W303-1A*, cepas *MC4* y *OFF1*. Los ácidos grasos saturados encontrados en las cepas de levadura son mirístico, palmítico, esteárico y araquídico. La cepa con más viabilidad es la (*SLP1*) ya que contiene la mayor concentración de ácido graso araquídico. El ácido palmitoleico es el ácido graso insaturado ácido con mayor concentración en la cepa *W303-1A* y *OFF1*, mientras que en las levaduras *MC4* y *SLP1*, el ácido oleico está presente en mayor concentración. En resumen, la levadura *SLP1* contiene la mayor concentración de ácidos grasos saturados, es decir, existe una mayor resistencia a factores externos cuando la composición de ácidos grasos saturados es mayor a la de insaturados [22]. Por esta razón, es de suma importancia sintetizar nanoestructuras de Ag, para así evaluar el crecimiento y viabilidad en las cepas de levaduras, con el objetivo de conocer su comportamiento ante diferentes factores externos.

1.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanoestructuras de Ag por medio de un método verde empleando la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor-estabilizador, y evaluar su toxicidad en levaduras.

1.1.1 Objetivos específicos

- Realizar el análisis bromatológico y fitoquímico de la planta *Lavandula angustifolia*, así como ensayos de determinación de azúcares reductores, saponinas, flavonoides, entre otros.
- Sintetizar mediante un método verde nanoestructuras de Ag a partir del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*.
- Caracterizar morfológica y estructuralmente los nanomateriales de Ag.
- Estimar la concentración química elemental de los nanomateriales.

- Proponer un mecanismo químico de formación de acuerdo a la información obtenida mediante técnicas espectroscópicas.
- Identificar el efecto antibacteriano de las nanoestructuras en *E. coli* y *S. aureus*.
- Evaluar la toxicidad de las nanoestructuras en levaduras.

1.2 Hipótesis

Será posible la obtención de nanopartículas de plata con tamaño inferior a los 50 nm y nanoalambres con alta relación de aspecto y longitudes superiores a los 100 μm a partir de las flavonas glicosiladas presentes en el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. La síntesis se logrará mediante reacciones redox debido a la naturaleza química y alta capacidad antioxidante de los metabolitos involucrados, en donde el Kaempferol-3-O-ramnosido favorecerá la reducción de una molécula de AgNO_3 para generar Ag^0 . Además, la toxicidad de los nanomateriales de Ag disminuirá a medida que el tamaño de las nanoestructuras incremente. Por lo tanto, se identificará mayor daño celular en las levaduras expuestas a las nanopartículas en comparación con los nanoalambres de Ag.

CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A través de este capítulo hablaremos de los fundamentos básicos que gobiernan el estado nanométrico, así como la importancia de estos materiales en la actualidad. También, se hará énfasis en porqué emplear las células de levaduras como un modelo de estudio. Además, conoceremos la estructura, composición función y transporte de la membrana plasmática con el objetivo de tener conocimientos generales para así estudiar el proceso o mecanismo de acción de las nanoestructuras de plata.

2.1 Nanociencia y nanotecnología

En el año de 1935 Richard P. Feynman en una de sus célebres conferencias llamó la atención de los científicos sobre las grandes ventajas tecnológicas que se derivarían de la posibilidad de controlar la estructura de la materia átomo por átomo, por esa razón es un error pensar que la nanotecnología es un invento humano reciente, de hecho existen muchos organismos y microorganismos a lo largo de millones de años, que mediante procesos tan comunes como la fotosíntesis logran manipular la materia en la escala atómica, ya sea para separar cargas eléctricas, transportar protones y convertir la energía solar en energía químicamente útil con la finalidad de construir subestructuras especializadas, como almacenar información, reproducirse o moverse [23].

Para entender el concepto de nanociencia y nanotecnología es importante definir el prefijo nano, el cual proviene del griego *νάνος* que significa enano y corresponde a la milmillonésima parte de un metro (10^{-9} m) [24]. Por ello, la nanociencia se define como el área de estudio que se encarga de la síntesis, creación, manipulación y principalmente del entendimiento y explicación de los fenómenos que ocurren en los materiales a escalas nanoscópicas (1-100 nm) [24-26]. En el caso de la nanotecnología, la definición es similar, ya que se explica como el área que se encarga de controlar la materia átomo por átomo con la finalidad de diseñar y fabricar materiales con alguna aplicación práctica, aunque hoy en día la nanociencia también se enfoca en este aspecto [26]. Pero, sea cual sea la definición adoptada, lo más importante es que la frontera entre lo micro y lo nanométrico no solo es cuestión de tamaño, sino que implica un cambio drástico en las propiedades físicas y

químicas que experimenta el material en bulk, cuando su tamaño característico disminuye por debajo de cierto valor (100 nm). También, es importante señalar que los nanomateriales muestran comportamientos intermedios entre los sólidos microscópicos y un nanosistema agregado con unos cuantos átomos o moléculas, por esta razón y debido a que se encuentran cerca de las dimensiones atómicas, las leyes que los gobiernan son las de la física cuántica [23, 26, 27].

Debido a que en este nivel de tamaño se observan propiedades y fenómenos totalmente nuevos, la nanotecnología arroja el descubrimiento de nuevos materiales, procesos, desenvolvimiento de nuevas técnicas experimentales y teóricas para el desarrollo de nanosistemas innovadores y materiales nanoestructurados [28]. Lo anterior ha ayudado a avanzar en distintas áreas de la tecnología como es la electrónica, la construcción, agricultura, biotecnología, energía y principalmente en áreas de la salud como la medicina y farmacéutica [29]. La figura 2.1 presenta un comparativo de tamaños de distintas moléculas, microorganismos, células y objetos en la cual es totalmente apreciable las diferencias de tamaños entre micromateriales y nanomateriales.

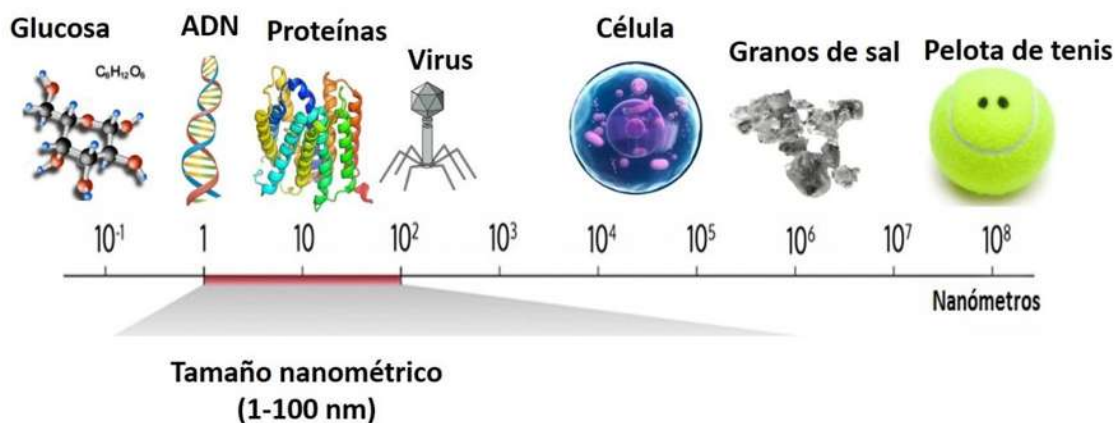


Figura 2. 1 Comparación de objetos a diversas escalas.

2.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras

Primeramente, es necesario conocer la diferencia entre un nanomaterial y un material nanoestructurado. El primero es definido como un material compuesto de cristales o nanoestructuras en las cuales al menos una de sus dimensiones se encuentra dentro del rango nanométrico o debajo de los 100 nm, además, éstos se encuentran separados por una interfase.

Por el contrario, se entiende como material nanoestructurado aquel material compuesto por cristales nanométricos, los cuales se encuentran separados por una frontera de grano [30].

Las nanoestructuras metálicas con diferentes morfologías se pueden identificar de acuerdo a sus dimensiones dentro o fuera del rango nanométrico. Por lo tanto, éstas pueden ser clasificadas en dimensión cero (0D), una dimensión (1D), dos dimensiones (2D), y tres dimensiones (3D). En las nanoestructuras 0D, los nanomateriales incluyen pequeños agregados atómicos (cluster) compuestos por una pequeña cantidad de átomos, en donde comúnmente son nanopartículas esféricas. En el caso de los nanomateriales 1D son nanoestructuras con grandes aspectos de radio como nanorodillos, nanoalambres, nanocintas y nanotubos. Por su parte los nanomateriales 2D están compuestos de pequeñas láminas delgadas como nanohojas, nanoplatos y nanoprismas. Finalmente, los 3D incluyen estructuras más complejas como varios poliedros o bien ensambles de estructuras 0D, 1D y 2D [31]. En la figura 2.2 se muestran las 4 diferentes nanoestructuras mencionadas. En el apartado a) se ilustran nanopartículas, b) Nanoalambres, nanocintas y nanorodillos, c) nanoplatos y nanoláminas, d) nanoensambles.

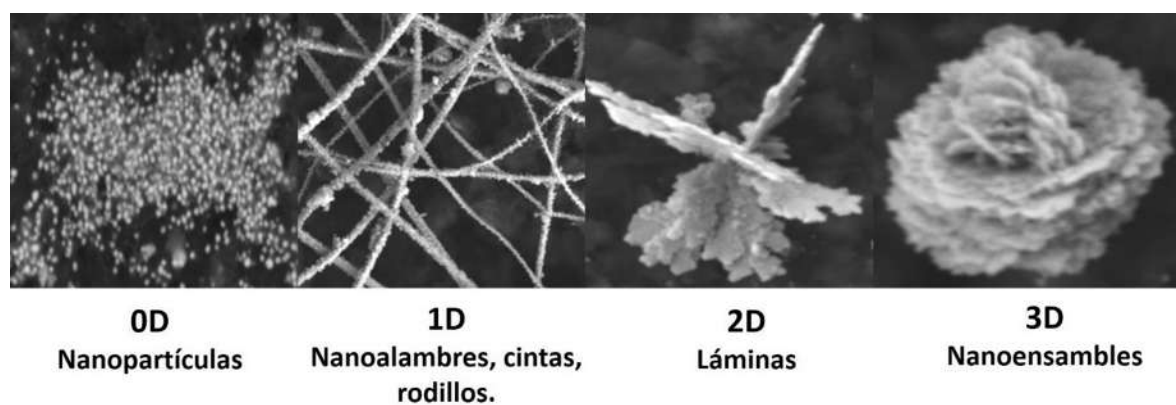


Figura 2. 2 Clasificación de las nanoestructuras de acuerdo a sus dimensiones [32].

En la actualidad existen dos enfoques en la síntesis y fabricación de nanomateriales y materiales nanoestructurados como son: métodos de arriba abajo (Top-Down) y de abajo a arriba (Bottom-Up). En el primero, se parte de un material a granel (parcialmente desmantelado, procesado o depositado) y mediante un proceso físico se da paso a la formación de entidades nanométricas, siendo la más común la molienda mecánica [33], aunque en algunos casos las nanoestructuras pueden ser sintetizadas por medio de métodos

químicos y la volatilización de un sólido seguido de la condensación del componente evaporado [34, 35]. Para el caso de los procesos Bottom-Up, los nanomateriales se ensamblan a partir de bloques de construcción básicos como son átomos, moléculas o clústeres que crecen a partir de precursores elementales [35], en donde el ejemplo más claro es la dispersión coloidal que forma parte del método de reducción química convencional. También, en esta categoría se engloban los métodos sol-gel, hidrotermales, solvotermales, pirólisis química, sonoquímicos, electroquímicos, deposición de vapor, micelas, entre otros [34, 36]. Además, existe la posibilidad de sintetizar nanoestructuras con la ayuda de métodos híbridos, siendo el proceso más común la litografía, que consiste en el crecimiento de láminas delgadas (Bottom-Up) y posteriormente se realiza un grabado (Top-Down). Los dos enfoques anteriores son muy importantes en nanotecnología, pero el mayor problema de trabajar con técnicas Top-Down, en especial la litografía, es la imperfección de la estructura superficial, que conlleva a la formación de defectos e impurezas [33].

La figura 2.3 ilustra de manera general la formación de nanopartículas (NPs) a través de los dos enfoques distintos de síntesis. En la parte superior se ejemplifica el avance en la formación de NPs a partir de pequeños agregados moleculares, en el caso de la parte inferior se exhibe un material a granel esférico el cual por medio de atrición es fragmentado hasta tamaños nanométricos.

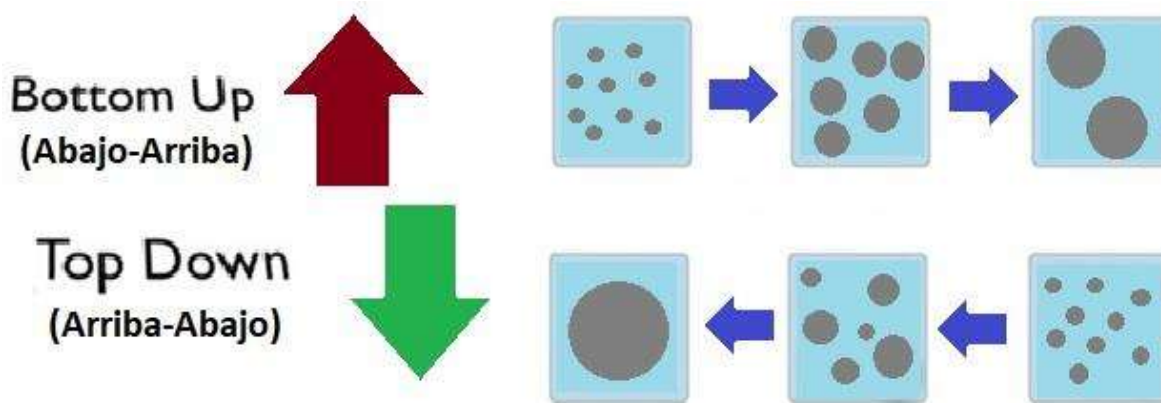


Figura 2. 3 Enfoques de síntesis de nanoestructuras a) proceso bottom-up, b) proceso top-down.

2.2.1 Teoría de formación de nanoestructuras

Los métodos químicos a través de la reducción de sales precursoras son las técnicas más empleadas en la actualidad, esto se debe a que pueden ser escalados, permitiendo controlar tamaños, formas y distribuciones de los nanomateriales [7]. Por otro lado, la síntesis verde asistida por extracto de plantas sigue los principios fundamentales de nucleación y crecimiento de la síntesis química convencional, por esta razón es fundamental conocer algunos de ellos.

Primeramente, se hablará del proceso más común de crecimiento, siendo éste el de las nanoestructuras 0D (nanopartículas). Por esta razón, es importante conocer su concepto, el cual se define como aquel material con propiedades morfológicas en al menos una dimensión, restringiéndose su tamaño de 1-100 nm [37]. Es importante el manejo de estos nanomateriales porque sus propiedades cambian de acuerdo a cómo se comportan los electrones, ya que su movimiento es más limitado por las dimensiones del mismo material. Además, la proporción de átomos en la superficie es mayor respecto a su interior en comparación con aquellos materiales de tamaño micrométrico [25]. Los metales a escala nano poseen propiedades ópticas, electrónicas, catalíticas y magnéticas que difieren de aquellas presentes a mayor escala, por ello están fuertemente relacionadas con el tamaño, forma, composición y estructura cristalina de la partícula [38].

Las diversas técnicas de síntesis se pueden agrupar en dos categorías: enfoque de equilibrio termodinámico y cinético. Desde el punto de vista termodinámico el proceso de síntesis consiste en 3 pasos: 1) sobresaturación, 2) nucleación y 3) crecimiento. En el caso del equilibrio cinético, éste se logra limitando la cantidad de precursores [39]. Por lo cual, de manera general el proceso de formación se resume en los pasos siguientes:

1. Nucleación: Formación veloz de pequeños núcleos por medio de especies poco solubles o alta sobresaturación.
2. Crecimiento: Adición de partículas pequeñas para lograr partículas más grandes
3. Terminación: Estabilización o repulsión de las nanopartículas mediante surfactantes.

2.2.1.1 Nucleación

La nucleación se define como el proceso mediante el cual los átomos sirven como plantillas o semillas para el crecimiento de los cristales [40]. Este proceso puede clasificarse en tres categorías como son: nucleación homogénea, heterogénea y secundaria. La primera consiste en dar paso a la formación de cristales desde el seno del líquido, la segunda es lograda a través de la formación de una segunda fase sobre la superficie de otro material y la última es por medio de la agregación de partículas [3].

El primer paso de formación es dar inicio a la nucleación homogénea, que ocurre por una combinación de moléculas del soluto para producir un núcleo en ausencia de una interface sólida, y sucede debido a la fuerza impulsora generada por una solución supersaturada que no es estable energéticamente. Esta condición es lograda por medio de la disminución de la temperatura de una mezcla en equilibrio o mediante reacciones químicas *in situ* a través de la conversión de productos químicos altamente solubles a menos solubles. Cuando la concentración de un soluto en un disolvente excede su equilibrio, la solubilidad o la temperatura disminuye por debajo del punto de transformación de fase, apareciendo una nueva fase [33, 39]. Para describir lo mencionado con anterioridad, se puede considerar un caso de nucleación homogénea a partir de una solución supersaturada, donde el soluto excede la solubilidad poseyendo una alta energía libre de Gibbs y por lo tanto la energía total del sistema se reducirá segregando la solución, esto se observa mejor en la figura 2.4, la cual muestra la reducción de la energía global de Gibbs de una solución sobresaturada formando una fase sólida y manteniendo la concentración de equilibrio en la solución, en donde la reducción de la energía libre de Gibbs es la fuerza impulsora de la nucleación.

El cambio de energía libre es la suma de la energía generada por la formación de un nuevo volumen y la energía debida a la superficie creada; es por ello que la minimización de la energía consta de estos dos términos: 1) volumen de la transición líquido-sólido y 2) la superficie de formación.

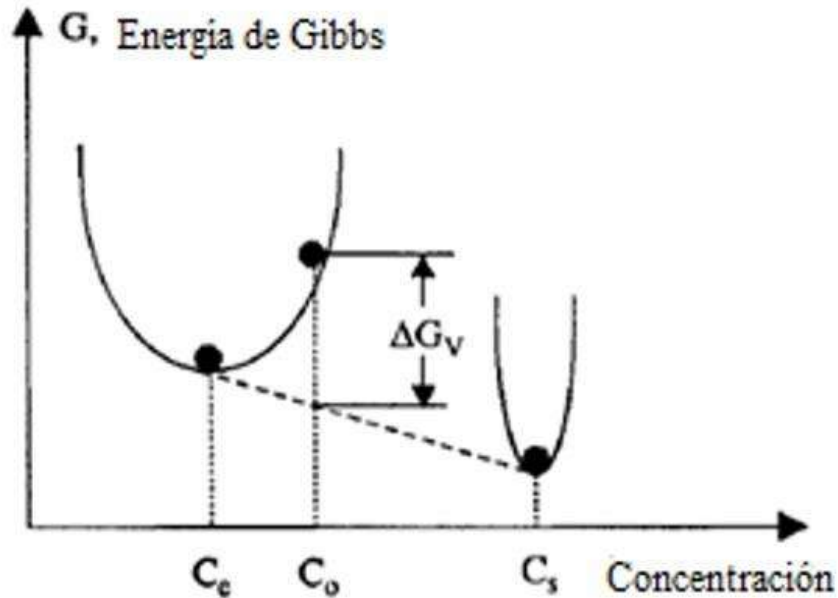


Figura 2. 4 Reducción de la energía libre total de Gibbs de una solución sobresaturada formando una fase sólida y manteniendo una concentración de equilibrio en la solución [33].

Adicionalmente, la figura 2.5 ilustra esquemáticamente el cambio de energía libre de volumen ($\Delta\mu_v$), la energía libre superficial ($\Delta\mu_s$), y la energía total (ΔG) en función del radio del núcleo. Se observa que un núcleo recién formado sólo es estable cuando su radio alcance un tamaño crítico r^* , en otras palabras, un núcleo que no ha alcanzado el radio crítico (embrión) se redisolverá en la solución para reducir la energía libre global, mientras que aquel que supere el r^* , será estable y continuará creciendo (núcleo). Por ello, la formación de un gran número de núcleos se ve favorecida por una alta concentración inicial, baja viscosidad y baja energía crítica. Por consiguiente, para una concentración elevada de soluto, habrá una mayor cantidad de núcleos que se relaciona con tamaños más pequeños en los sólidos. Además, es importante mencionar que la temperatura también influye en la energía superficial, así como el uso de diferentes solventes, aditivos en la solución y la incorporación de impurezas en fase sólida.

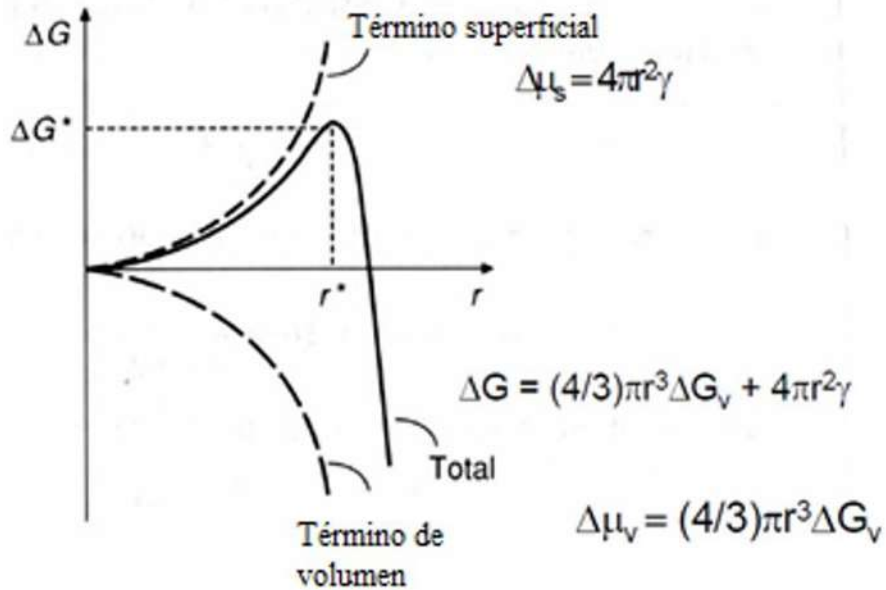


Figura 2. 5 Cambio de energía de volumen en función del radio crítico [33].

La figura 2.6a ilustra el proceso de nucleación y su crecimiento posterior a lo largo del tiempo en tres etapas, en la cual se aprecia que la nucleación se produce sólo cuando la sobresaturación alcanza cierto valor, superior a la solubilidad que corresponde a la barrera de energía para la formación de núcleos. Por lo cual, una vez que se tiene la nucleación inicial, la concentración o la sobresaturación de la especie en crecimiento disminuye y el cambio en la energía libre de Gibbs de volumen se reduce. Cuando la concentración de soluto decrece por debajo de cierto valor de la energía crítica, no se forman más núcleos, mientras que el crecimiento procede hasta que la concentración de especies en crecimiento alcanza el equilibrio o límite de solubilidad. Por otro lado, la figura 2.6b muestra desde otra perspectiva las relaciones entre la nucleación, velocidad de crecimiento y concentración de las especies. En donde, el proceso de crecimiento no procede cuando no hay núcleo, aunque, la concentración supere la solubilidad de equilibrio y la velocidad esté por encima de cero. Por el contrario, cuando los agregados atómicos (clúster) se forman, el crecimiento se produce de forma simultánea. No obstante, por encima de la concentración mínima, la nucleación y el crecimiento son procesos inseparables que continúan a diferentes velocidades. Por otro lado, la distribución de tamaños es dependiente del crecimiento posterior de los núcleos, el cual puede ser de dos tipos: 1) crecimiento en la superficie y 2) Coagulación (nucleación secundaria). El primero consiste en la deposición o adición de las moléculas de soluto en la

superficie de una partícula. Mientras, que en el segundo las partículas chocan y se adhieren entre sí para formar agregados, las cuales se convierten en partículas individuales por medio de la maduración de Ostwald (coagulación coalescente) [39].

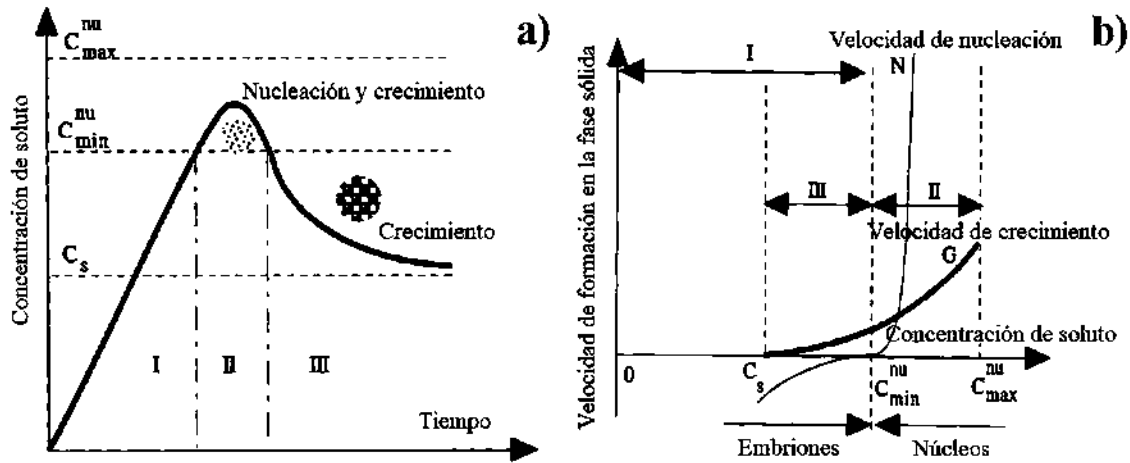


Figura 2. 6 a) Procesos de nucleación y posterior crecimiento, b) relación entre las tasas de nucleación y crecimiento y la concentración de especies de crecimiento [33].

2.2.1.2 Etapas del crecimiento de los núcleos

El proceso de crecimiento está envuelto por múltiples etapas que son descritos a continuación:

1. Generación de las especies de crecimiento
2. Difusión de las especies provenientes de todo el volumen hasta la superficie.
3. La adsorción de las especies sobre la superficie
4. Crecimiento superficial a través de la incorporación irreversible de las especies sobre la superficie sólida.

Los pasos anteriores pueden ser agrupados en dos procesos principales. El suministro de las especies de crecimiento se denomina difusión e incluye la generación, propagación y adsorción de especies sobre la superficie de crecimiento (pasos 1, 2 y 3). Mientras que la incorporación de especies adsorbidas sobre la superficie de la estructura sólida se denomina crecimiento en la superficie (paso 4).

El crecimiento controlado por difusión ocurre cuando la concentración de especies de crecimiento se reduce por debajo de la concentración mínima de nucleación, ésta se detiene

y el crecimiento continúa. En este caso, la difusión promueve la formación de nanopartículas de tamaño uniforme, debido a que la diferencia de tamaños en los radios de los núcleos disminuye al paso del tiempo.

Por otro lado, se denomina crecimiento controlado por un proceso de superficie cuando la difusión de las especies se da desde el volumen hasta la superficie de crecimiento, es decir donde la concentración de la masa es la misma que el volumen, para lo cual existen dos mecanismos: mononuclear y polinuclear.

El crecimiento mononuclear procede capa por capa, en donde las especies de crecimiento se incorporan en una capa y solo se procede a otra capa cuando la anterior ha sido completada. Aquí existe tiempo suficiente para que las especies de crecimiento se difundan hacia la superficie. Además, la velocidad de crecimiento es proporcional al área superficial, esto causa que la diferencia de radios se prolongue a través del tiempo; por lo tanto, este mecanismo no favorece al crecimiento de partículas con tamaño uniforme [41] (ver figura 2.7a).

En contraparte, el crecimiento polinuclear ocurre cuando la concentración superficial es muy alta, aquí el proceso de superficie es tan rápido que la segunda capa de crecimiento procede antes de que la primera sea completada. Por consiguiente, la velocidad de crecimiento es independiente del tamaño de la partícula o el tiempo, es decir la velocidad es constante. Por esta razón, cuando las partículas se hacen más grandes, la diferencia de radios se hace más pequeña, favoreciendo la formación de partículas monodispersas [41] (ver figura 2.7b).

Por este motivo, cuando los núcleos son pequeños el mecanismo de crecimiento monocapa debe dominar, mientras que el crecimiento polinuclear llega a ser predominante a medida que los núcleos se hacen más grandes.

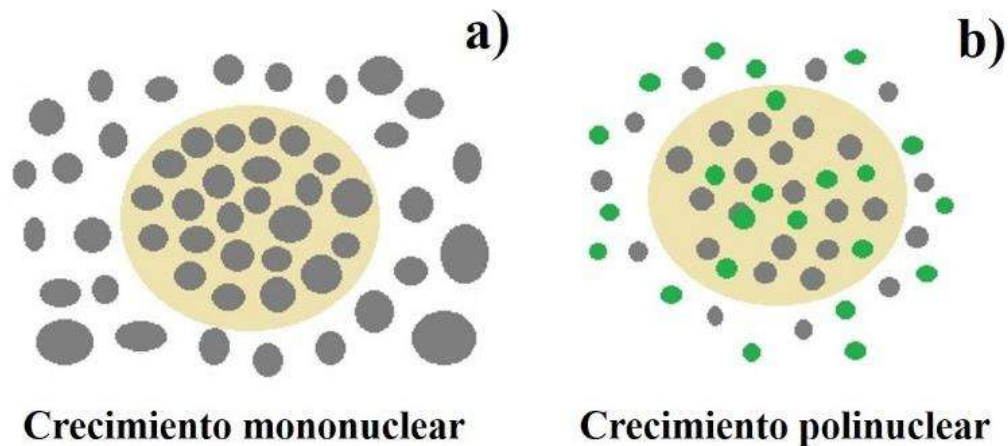


Figura 2. 7 a) Crecimiento capa por capa, b) crecimiento al azar.

2.2.1.3 Fenómeno Ostwald ripening

Cuando los reactivos son agotados debido al crecimiento de las partículas, ocurre un fenómeno llamado Ostwald ripening, que consiste en el crecimiento de las partículas grandes a expensas de las pequeñas, hasta que éstas últimas disminuyen su tamaño, para finalmente disolverse en el líquido [42]. En esta etapa la relación de saturación decrece y el tamaño crítico del núcleo se incrementa, ocasionando que cualquier partícula con menor radio crítico se redisuelva. Cuando se presenta el fenómeno de Ostwald en la etapa de crecimiento, se complica la obtención de partículas monodispersas. Una vez que en la etapa de crecimiento se presenta el fenómeno de Ostwald, es complicado la obtención de partículas monodispersas, a menos que la reacción se extienda hasta que todos los reactivos se agoten o la supersaturación termine, eliminando los núcleos más pequeños, lo cual conllevará a que las partículas tengan un régimen micrométrico.

Las partículas pueden crecer por vía adición molecular, donde las especies solubles se depositan sobre la superficie sólida o por agregación con otras partículas (crecimiento secundario), donde la velocidad de crecimiento de esta segunda es mayor en comparación a la vía de adición molecular. Después de que las partículas crecen hasta un tamaño estable, éstas continuarán creciendo por combinación de núcleos inestables y no por colisiones con otras partículas estables. En contra parte, una manera de controlar la maduración de Ostwald es mediante la adición de pequeñas concentraciones de sal precursora, con el objetivo de

mantener la condición de sobresaturación y así evitar la formación de partículas grandes [43, 44]. La figura 2.8 ejemplifica lo descrito con anterioridad, en la cual se aprecia que las partículas más grandes crecen a expensas de las pequeñas, mientras que éstas últimas se redisuelven en el líquido.

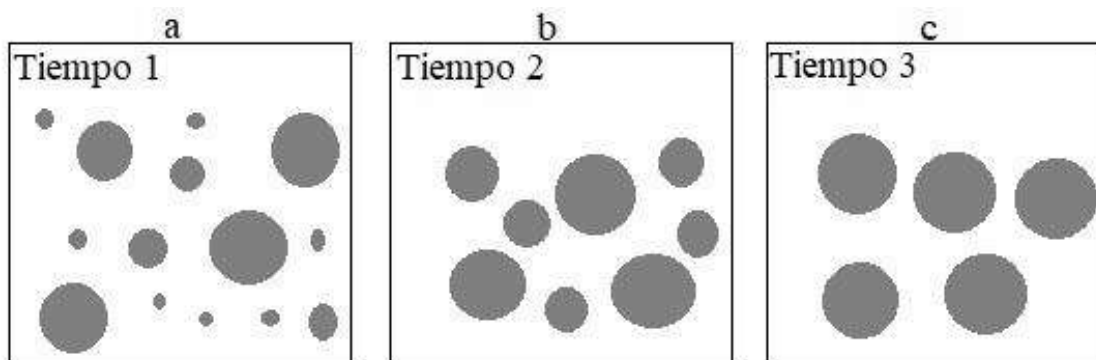


Figura 2. 8 Fenómeno de maduración de Ostwald ripening.

2.2.1.4 Terminación o estabilización de las nanopartículas

Las nanopartículas son pequeñas y no son termodinámicamente estables al crecimiento cinético del cristal. Por ello, para producir nanopartículas estables, éstas deben ser arrestadas durante la reacción mediante adición de reactivos que protejan su superficie como ligantes orgánicos o un material inorgánico que las rodee. Las dispersiones de las nanopartículas son estables si la interacción entre los grupos que las rodean y el solvente es favorable, colocando una barrera energética para contrarrestar las atracciones de Van Der Waals. Para ayudar al arresto de estas nanopartículas, se emplean diferentes solventes que cambian la solubilidad o la velocidad de la reacción [45].

Un método muy común de dispersión es mediante la repulsión electrostática resultante de las interacciones entre las dobles capas eléctricas que rodean a las partículas, se logra ajustando el pH de la solución o con la adsorción de moléculas tensoactivas cargadas en las superficies. Esta estabilización es generalmente eficaz en sistemas diluidos de los medios orgánicos acuosos o polares, siendo muy sensibles al pH y los efectos de otros electrolitos en la solución.

Por otro lado, la estabilización estérica consiste en cubrir las partículas con polímeros impidiéndoles acercarse al rango de las fuerzas de atracción [46, 47]. La figura 2.9 muestra

un comparativo de los dos tipos de estabilización, en la cual el papel de los estabilizadores es prevenir el crecimiento incontrolable de las partículas, evitar la agregación, controlar su tamaño y permitir la solubilidad de las mismas en varios disolventes.

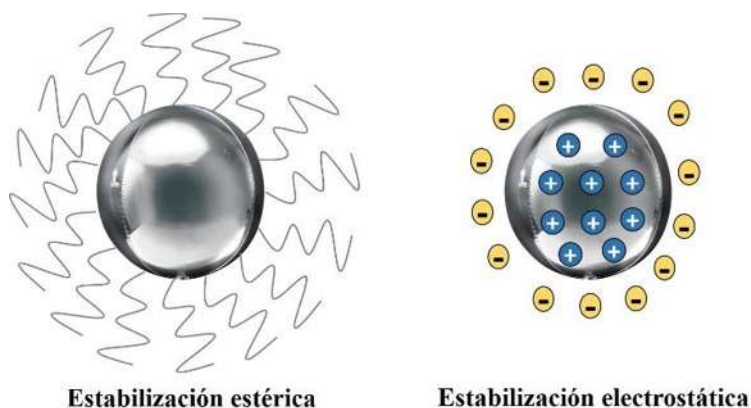


Figura 2. 9 Tipos de estabilización de nanopartículas.

2.2.1.5 Crecimiento en nanoestructuras metálicas 1D

Las nanoestructuras unidimensionales tienen una diversidad de formas, las cuales incluyen: nanowhiskers, nanofibras, nanohilos, nanovarillas, nanotubos, nanocintas y nanoalambres. Generalmente, se considera que los whiskers y nanorodillos tienen una relación de aspecto menor en comparación a las nanofibras y nanoalambres [33]. Por lo tanto, definiremos a un nanoalambre como aquel material unidimensional, en el cual la relación de aspecto del largo es por lo menos 10 veces mayor en comparación al ancho [48], donde su ancho debe ser inferior a los 100 nm. La definición anterior se ha extendido a alambres atómicos y moleculares, ya que, aunque no poseen las características geométricas, si poseen propiedades físicas diferentes a las del material a granel [49]. Se han desarrollado muchas técnicas en la síntesis de las nanoestructuras 1D por medio de métodos convencionales, éstos comprenden el crecimiento espontáneo, síntesis basada en templates, electrospinning y litografía [33]. El primero consiste en la reducción de energía libre causada por una transformación de fase o reacción química.

Hablaremos del proceso de formación de AgNWs a través de diversos fenómenos físicos y químicos. El método del poliol ha sido la ruta más exitosa para producir estas estructuras con

calidad y a gran escala, además de que el proceso de formación es similar al que sucede en la síntesis verde asistida por plantas, en la cual se emplea un agente reductor y estabilizante.

El método del poliol puede resumirse en los siguientes pasos que consisten primeramente en la obtención de átomos de plata a partir de la reducción de la sal precursora AgNO_3 , en el cual por medio de la sobresaturación de la solución comienzan a experimentar nucleación y crecimiento en forma de nanopartículas monocristalinas y macladas, siendo la última forma la más dominante debido a su baja energía. A través de este mecanismo, las AgNPs son incapaces de coalescer en partículas de mayor tamaño, gracias a la tasa de reacción de las semillas de Ag y a que el agente estabilizante (PVP) actúa como agente de cobertura entre partículas. La mayoría de las AgNPs más grandes pueden ser dirigidas por el agente de recubrimiento a crecer en nanorodillos y éstos a su vez continúan creciendo en AgNWs con la presencia de PVP u otros agentes de recubrimiento (ver figura 2.10) [48]. Por ello, se requiere un crecimiento anisotrópico, es decir el cristal crece a lo largo de cierta orientación más rápido en comparación a otras direcciones, en el cual, los defectos e impurezas en las superficies de crecimiento desempeñan un papel importante en la morfología de los productos finales [33]. Existen otros factores en el crecimiento que determinan forma, longitud, tipo de espesor de los AgNWs como son: múltiple maclado en las partículas, adición de agentes nucleantes, la temperatura, influencia de oxígeno, concentración de la sal precursora, efecto del agente estabilizante, la influencia de los iones bromuro y cloruro [48]. Estos factores se tocarán más a fondo en el apartado del estado actual de los métodos de síntesis para la obtención de los AgNWs.

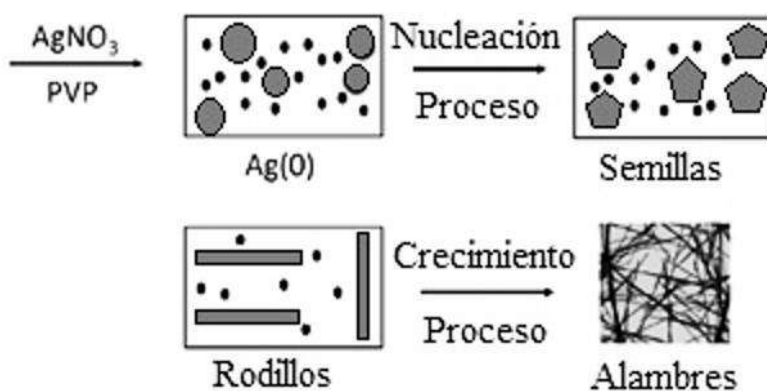


Figura 2. 10 Esquema del proceso de formación de AgNWs a través del método del poliol [48].

2.3 Aplicaciones de los nanomateriales de plata

Como se ha visto a lo largo del documento, la manipulación de la materia en la escala nano es muy importante porque a este nivel de tamaños se observan propiedades y fenómenos totalmente nuevos, por este motivo promete un enorme potencial en una amplia variedad de aplicaciones en distintas áreas que incluyen la industria textil, alimentaria, eléctrica, química, medicina, tecnologías de la información y energía. De hecho, se ha demostrado que la principal aplicación de las AgNPs es en el sector salud como agente antibacterial, en el cual se han realizado diversos estudios del efecto tóxico en diversas bacterias, así como su efecto antifúngico. También, algunos estudios han indicado que estas nanopartículas tienen naturaleza antiinflamatoria, que puede ayudar a la aceleración de la cicatrización de heridas. Otra aplicación importante en el sector salud es como sustituto de articulaciones artificiales en los cementos óseos con la finalidad de inducir la actividad antimicrobiana [7]. La nanoplata también tiene la capacidad de ser utilizado en biosensores que pueden biosensar una gran cantidad de proteínas que los comunes encuentran difíciles de detectar. La ventaja que tiene la nanoplata es que puede utilizarse para detectar anomalías y enfermedades en el cuerpo humano incluido el cáncer. También, las propiedades plasmónicas lo convierten en un candidato para bioimágenes, ya que, a diferencia de los colorantes fluorescentes, éste no presenta fotodecoloración y pueden usarse para monitorear eventos dinámicos a lo largo de un tiempo prolongado [50, 51]. Por otra parte, en el área comercial se ha comprobado que las NPs son empleadas en el tratamiento de aguas residuales, así como en pinturas, ropa, cosméticos, alimentaria, donde la principal función de éstas en su mayoría es como agente bactericida [52].

Por otro lado, los nanoalambres metálicos han sido modelo interesante de estudio, causado por la potencialización de sus propiedades físicas como conductividad eléctrica, conductividad térmica, propiedades ópticas y magnéticas; por lo cual presentan una amplia gama de aplicaciones en componentes electrónicos, optoelectrónicos y magnéticos [53]. De igual forma que las AgNPs, estos nanomateriales exhiben comportamiento antibacteriano. Por las razones anteriores, los AgNWs proporcionan reemplazos ideales para los materiales conductores tradicionales debido a su tamaño y alta relación de aspecto. En el caso de las propiedades ópticas, proporcionan un gran potencial para fabricar películas conductoras

transparentes. Otra opción es formar un material híbrido mediante la combinación del nanoalambre metálico con nanotubos de carbono (CNT) para formar películas con el objetivo de aumentar la conductividad de los AgNWs. Debido a su similitud con los CNT, el grafeno también ha sido utilizado como material conductor a base de carbono para la fabricación de películas conductoras. En este caso, la función del grafeno es similar a los CNT, como relleno conductor para las redes de los AgNWs. La ventaja que presenta este nanomaterial híbrido es que el costo del grafeno es menor en comparación con los CNT. Adicionalmente, tiene mejor estabilidad térmica y química, pero su conductividad es menor. Aquí se limita el uso del grafeno en dispositivos que requieren alta conductividad. Los ejemplos anteriores son algunos de los más conocidos, no obstante, la combinación de AgNWs con otros materiales para la obtención de películas conductoras es amplia, siendo algunos ejemplos adicionales los híbridos con óxidos metálicos (ZnO y TiO₂), adhesivos conductivos isotrópicos con una resina de matriz, híbridos y compuestos de polímeros conductores [48].

2.4 Características y constituyentes fitoquímicos de la planta *Lavandula angustifolia*

La planta *Lavandula angustifolia* es comúnmente conocida como lavanda y su nombre proviene del latín “lavare” debido a que los romanos utilizaban esta planta para tomar baños [54]. Es un arbusto perenne, de tamaño medio e intenso perfume, pertenece a la familia de las Labiadas y alcanza una altura generalmente de 50 a 80 cm [55]. En relación a su aspecto, su follaje es gris con flores púrpuras ubicadas en las espigas terminales, en grupos de 6 a 10 flores que son las encargadas de concentrar la mayor cantidad del aroma. Este tipo de planta prefiere la plena exposición solar y tolera los terrenos secos y puede encontrarse en lugares de alto tránsito debido a que su color, su forma esférica, fragancia, duración de sus hojas y su follaje verde grisáceo permanecen durante todo el invierno [54]. Su hábitat natural es en terrenos secos, soleados, llenos de piedras junto a otros arbustos y plantas como el romero, abrótano y tomillo; preferentemente en suelos pobres de naturaleza calcárea [56]. Los componentes químicos de las plantas se concentran generalmente en las semillas, flores y hojas de cada planta [57]. La figura 2.11 muestra la forma y color de la planta de lavanda en su hábitat natural.

Sus constituyentes principales son los compuestos fenólicos, siendo aproximadamente 19 flavonas y 8 antocianinas [19]. Se han caracterizado pigmentos en la planta como la

delfinidina y la malvidina, así mismo, está compuesta de dos ácidos hidroxicinámicos como el ácido rosmarínico y el ácido clorogénico. Adicionalmente, la planta de lavanda posee fracciones de aceites volátiles como son la cumarina y 7-metoxicumarina. Estos constituyentes son los compuestos principales a los que se le es atribuida la reducción y estabilización de diversas nanoestructuras metálicas.



Figura 2. 11 Planta *Lavandula angustifolia* en la naturaleza.

2.5 Levadura como modelo celular eucariota

La levadura se ha utilizado por mucho tiempo como modelo celular eucariota, esto se debe a que este microorganismo funciona de manera similar a las células humanas. Esto quiere decir, que se aproximan en términos de organización y metabolismo, que se traduce en reacciones químicas necesarias para la vida y multiplicación de las células. La principal diferencia consiste en que el ser humano está formado por millones de células, mientras que la levadura es unicelular, haciéndola fácil de estudiar y manipular. Otras de las ventajas del empleo de levaduras es su fácil escalabilidad para análisis bioquímicos y su corto tiempo de generación. Por ello, es muy importante emplear inicialmente este microorganismo como modelo biológico [58, 59].

2.5.1 *Metabolismo celular de las levaduras*

Antes de conocer el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en la célula, es necesario definir el concepto de levadura, así como identificar su forma, estructura y composición. Por esta razón, este microorganismo se define como un hongo unicelular que presenta la misma estructura subcelular fundamental de células animales y plantas [60]. Generalmente, las células entre levaduras muestran una gran diversidad con respecto al tamaño, forma y su color, incluso, las células de una misma cepa en ocasiones muestran heterogeneidad morfológica. Respecto a su tamaño, este varía ampliamente entre ellas, donde algunas células pueden tener una longitud comprendida entre 2-3 μm , mientras que otras especies alcanzan longitudes de hasta 50 μm . En el caso del ancho, éste es menos variable, estando su rango de tamaño comprendido entre 2-3 μm . Las formas de las levaduras son variadas, aunque muchas especies son elipsoidales u ovoides como es el caso de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, existen otros géneros con distintas formas como el *Schizosaccharomyces*, que son cilíndricas con extremos hemisféricos, *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica*, que son en su mayoría filamentosas o levaduras esféricas como las especies *Debaryomyces* con formas alargadas [61].

El género *Saccharomyces cerevisiae* es muy importante por sus diversas aplicaciones en la fabricación de bebidas y alimentos como es la cerveza y el pan [62]. Además, el empleo de este microorganismo como modelo celular eucariota se debe a que refleja componentes macromoleculares similares a las células de los mamíferos. De hecho, la pared celular es la única estructura en la cual difieren células animales y levaduras. Es importante tener en cuenta este aspecto para una posible evaluación de toxicidad como un modelo de comparación, ya que esta estructura situada en la parte exterior de la célula desempeña un papel fundamental en el transporte de materiales dentro y fuera de ella, fungiendo como la primera línea de defensa contra agentes externos [61, 63]. La cubierta tiene un espesor comprendido entre 100-200 nm y constituye el 25 % de la masa seca total. Su composición química está sujeta a variaciones de acuerdo a condiciones de crecimiento, pero entre sus componentes principales se encuentran 4 clases de macromoléculas como son: glucoproteínas altamente glicosiladas (manoproteínas), dos tipos de β -glucanos y quitina (ver

figura 2.12). En el caso de la *Saccharomyces cerevisiae* la envoltura celular abarca aproximadamente el 15 % del volumen celular total y tiene la función principal de controlar las propiedades osmóticas y permeabilidad de la célula.

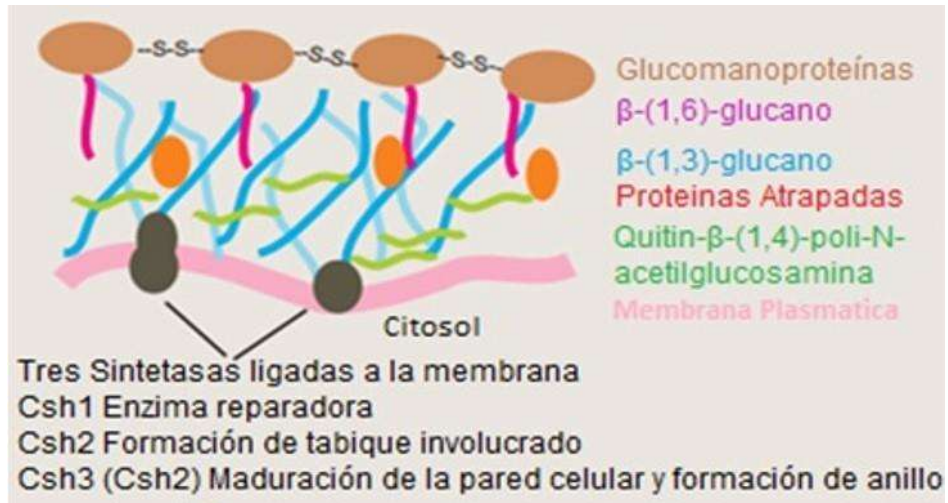


Figura 2. 12 Composición química de la pared celular [61].

Por lo tanto, la jerarquía de manera general vista de adentro hacia afuera de la célula consiste en el citosol de la levadura rodeada por la membrana plasmática, el espacio periplásmico y la pared celular. La figura 2.13a ilustra una imagen de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* vista a través de un microscopio. Por otro lado, la figura 2.13b ejemplifica la división de las células de ésta misma, así como sus componentes mayoritarios y orgánulos principales [61].

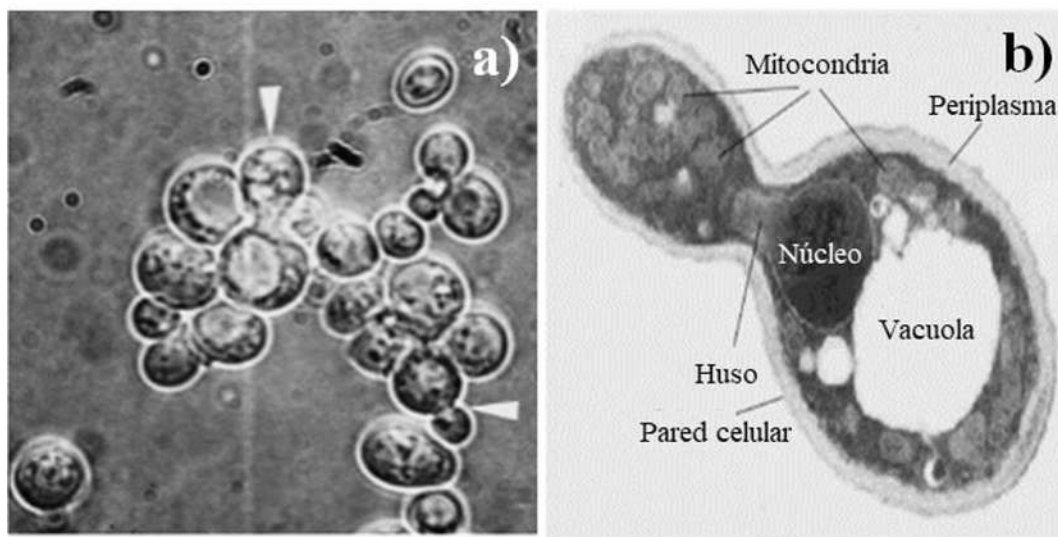


Figura 2. 13 Imágenes de MEB de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* [61].

2.5.2 Definición y composición de la membrana plasmática

Como se mencionó con anterioridad, la diferencia entre células de levaduras y mamíferos es la pared celular, esto quiere decir que, en el caso de éstas últimas, la primera estructura que rodea a la célula es la membrana plasmática. Por consiguiente, nos centraremos un poco más en esta estructura, debido a que tienen funciones enzimáticas, de comunicación entre células y de control en el paso de sustancias desde el exterior hasta el interior de la célula y viceversa [64, 65].

A través de los años han existido diversos modelos de la membrana plasmática, pero, aunque el modelo de mosaico fluido ha evolucionado con el tiempo todavía proporciona una buena descripción de la estructura y comportamiento de las membranas de diversas células. De acuerdo a este modelo, la membrana es un mosaico de componentes que se pueden mover fluida y libremente en el plano de la misma. El término de fluidez se puede ejemplificar por medio de la inserción de una aguja fina a través de la membrana, en donde ésta se separará y rodeará la aguja y cuando ésta es retirada, la membrana se une sin problemas. A pesar de que la membrana tiene la capacidad de fluir, el transporte de componentes es específico, aunque las únicas moléculas que pueden difundir sin necesidad de energía son las pequeñas como O₂, CO₂ y N₂ [66].

La membrana plasmática está compuesta principalmente por lípidos y proteínas que representan la mayor proporción de la masa de la membrana y por carbohidratos como parte de glicoproteínas y glicolípidos. Es importante mencionar que todas las membranas biológicas tienen una proporción de lípidos y proteínas diferente y como consecuencia presentan una función distinta, pero a su vez están conformadas por una estructura básica, por esta razón hablaremos de ella [67].

La bicapa lipídica ha sido establecida como la base universal de la estructura de la membrana celular, en donde éstas constituyen aproximadamente el 50 % de la mayoría de las membranas plasmáticas de células animales, siendo el resto proteínas. Todas estas moléculas son anfipáticas, es decir tienen un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico. La más abundante de estas moléculas son los fosfolípidos que tienen una cabeza polar (afín al agua) formada por un glicerol, un fosfato y una base nitrogenada (inositol, colina, etanolamina y serina). A la parte no polar (no afín al agua) se le denominan colas y están compuestas de ácidos grasos

que van desde 14 hasta 24 átomos de carbono, en donde una de ellas es saturada (sin dobles enlaces) y la otra insaturada (con uno o más enlaces *cis*). Lo anterior es muy importante, ya que los ácidos grasos insaturados se orientan en un mismo plano y por consiguiente permiten que el transporte sea fluido. En contraparte, los ácidos grasos saturados son los que les dan rigidez a las membranas. Para ejemplificar lo mencionado con anterioridad, en la figura 2.14 (a-d) se muestra esquemáticamente la fosfatidilcolina, su fórmula química y modelo espacial compacto. Se puede apreciar la composición de éste y su curvatura debido a doble enlace *cis* [66, 68].

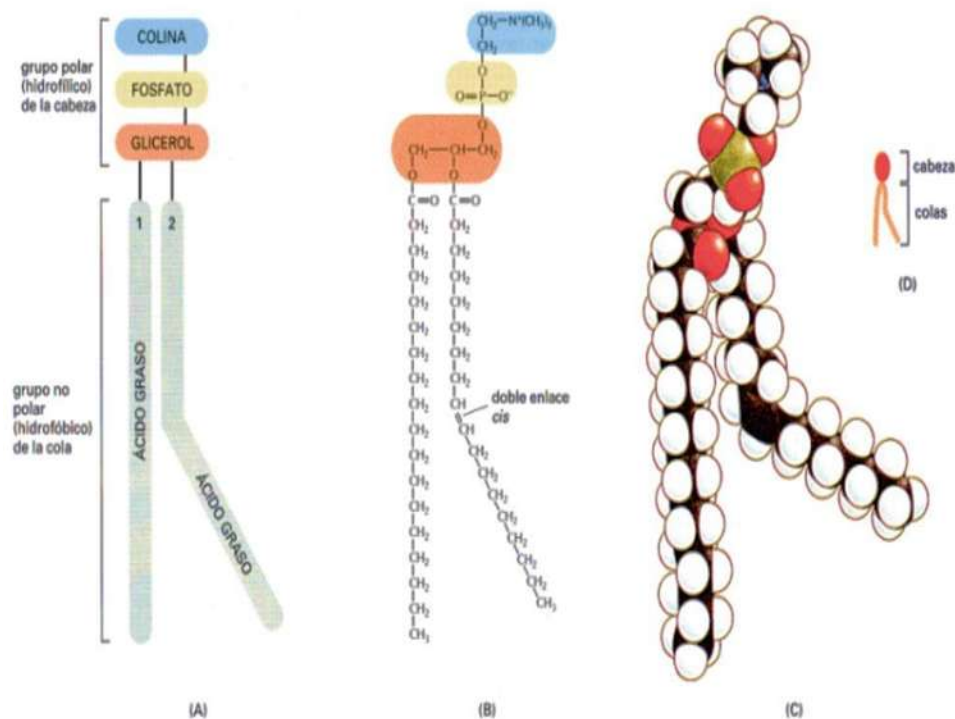


Figura 2. 14 Zonas de una molécula de fosfolípido [66].

La fluidez de las membranas es biológicamente importante, ya que procesos de transporte y actividades enzimáticas se detienen cuando la viscosidad aumenta. Esta fluidez depende de la temperatura y su composición, es decir, si las cadenas hidrocarbonadas son más pequeñas o hay mayor cantidad de enlaces *cis*, el empaquetamiento de las cadenas se dificulta, causando que la bicapa sea más difícil de congelar. En el caso de las levaduras, éstas controlan la composición de los ácidos grasos de sus lípidos para mantener la fluidez constante. En el caso de una disminución de temperatura, se sintetizan más ácidos grasos con

dobles enlaces *cis*, con el objetivo de evitar una pérdida de fluidez. Sin embargo, la bicapa de las membranas celulares no está compuesta exclusivamente de fosfolípidos, también contienen colesterol y glicolípidos. En el caso de células eucariotas, éstas contienen cantidades elevadas de colesterol que refuerzan el carácter de barrera permeable. De manera general, se puede decir que existen 4 fosfolípidos que componen la membrana plasmática de las células de los mamíferos, siendo éstos *fosfatidilcolina*, *esfingomielina*, *fosfatidilserina* y *fosfatidiletanolamina* (ver figura 2.15). Por otro lado, los glicolípidos se encuentran en la mitad no citoplasmática de la bicapa y se autoasocian formando microagregados mediante la formación de enlaces hidrógenos entre ellos. Sus funciones principales son las de permitir interacciones de la célula con su entorno o en procesos de reconocimiento celular [66].

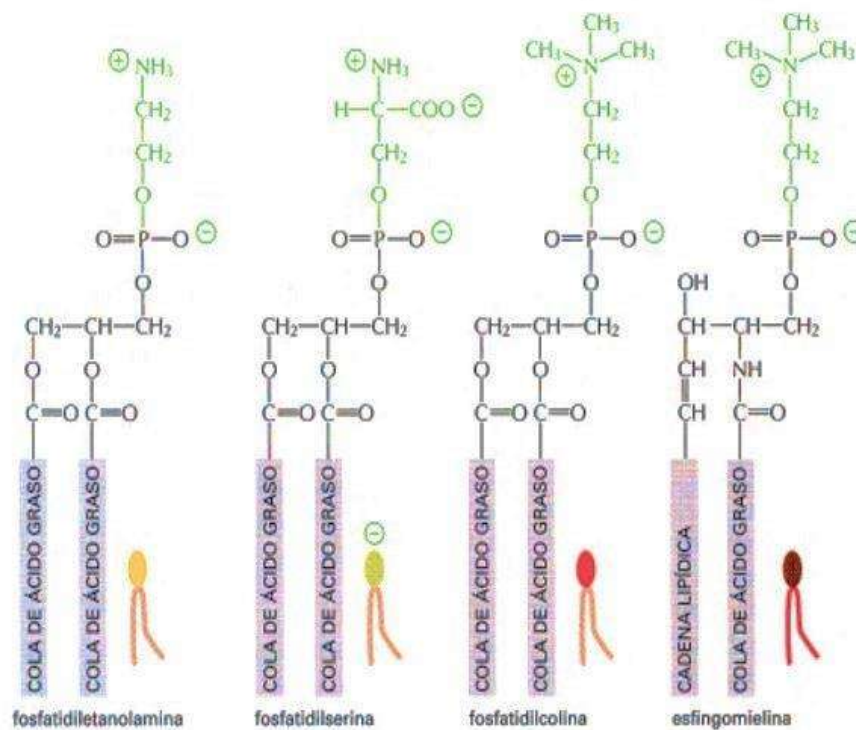


Figura 2. 15 Principales fosfolípidos de la membrana plasmática en células de mamíferos

[66].

Otra de las estructuras importantes en la composición de la membrana son las proteínas y esto se debe a que la mayoría de las funciones específicas son realizadas por éstas. Al igual que los fosfolípidos, la cantidad y tipo de proteínas son variables entre células. Existen dos tipos de proteínas en la membrana plasmática siendo extrínsecas (periféricas) e intrínsecas

(transmembranales o integrales). Las primeras están expuestas en una u otra cara de la membrana y están sujetas a ella mediante su interacción con las cabezas lipídicas o con las proteínas integrales de la membrana, mientras que las segundas están enterradas dentro de la membrana (en forma de α -hélice y β -laminar), expuestas en ambas caras de las mismas. Su función principal es intervenir en la transmisión de sustancias específicas o señales químicas a través de las membranas. Las proteínas de la membrana poseen características especiales que las diferencian de otras proteínas globulares, siendo éstas la proporción elevada de aminoácidos hidrófobos, en especial en las zonas de las moléculas proteicas que están embebidas en la membrana. También, hay estructuras llamadas glicoproteínas (oligosacáridos unidos covalentemente al lado polipeptídico de la proteína) que son principalmente intrínsecas y tienen funciones estructurales y de reconocimiento entre células [65, 66, 68].

En manera de resumen, la figura 2.16 muestra un modelo actualizado de la membrana de mosaico fluido que contiene información compleja sobre las estructuras de dominios de membrana, estructuras extracelulares y citoesqueléticas asociadas a la membrana. Además, se observan en diferentes colores estructuras como proteínas integrales, glicoproteínas, lípidos y oligosacáridos, siendo evidente que el cercado del citoesqueleto restringe la difusión lateral de algunas glicoproteínas transmembranales. También, se representan otros mecanismos de restricción de la difusión lateral, como los dominios lipídicos, la formación del complejo integral de glicoproteínas de la membrana (observada en el corte de la membrana), las asociaciones de polisacárido-glicoproteína (en la parte superior izquierda) y la unión directa o indirecta de los dominios de la membrana de la superficie interna a los elementos del citoesqueleto (en la parte inferior izquierda). Aunque, esta figura sugiere algunos posibles mecanismos de restricción de movilidad de lípidos y proteínas de membrana integrales, no presenta con precisión los tamaños o estructuras del citoesqueleto, polisacáridos, lípidos, proteínas de membrana integrales, dominios de tamaño submicro, nano o estructuras de citoesqueleto asociadas a la membrana [69].

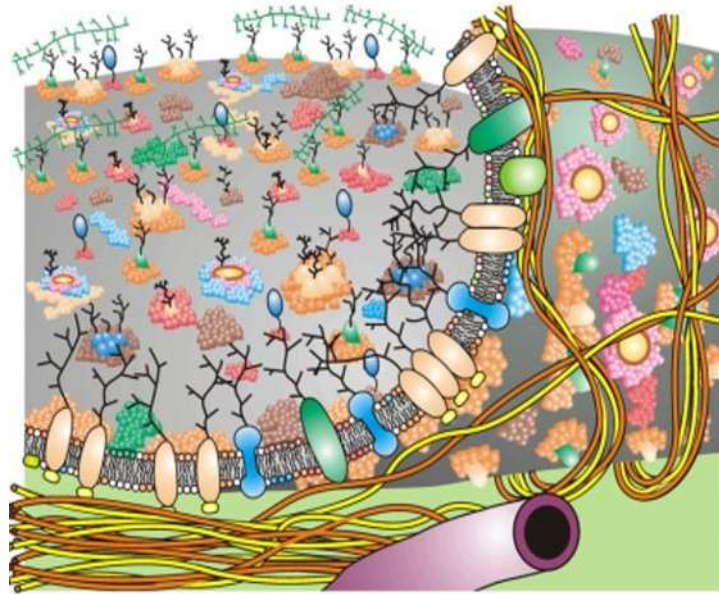


Figura 2. 16 Actualización del modelo de la membrana de mosaico fluido [69].

2.5.3 Transporte a través de la membrana

El transporte celular es el proceso mediante el cual la célula intercambia sustancias del exterior al interior y viceversa. Las diversas formas en que las moléculas se transportan son englobadas en tres categorías las cuales son: pasivo, facilitado y activo. Estos tipos de transporte muy diferentes entre sí y como consecuencia son empleados para distintos propósitos en la célula [66, 68].

El transporte pasivo o también llamado de difusión pasiva se realiza mediante el movimiento aleatorio de las moléculas a través de las membranas. Este proceso, es el mismo que ocurre con el movimiento browniano de las moléculas en cualquier líquido. Lo que conlleva este proceso es la difusión, donde la concentración libre de la sustancia debe ser igual en ambos lados de la membrana, es decir a favor del gradiente de concentración [66].

Con el tiempo suficiente, cualquier molécula acabará difundiendo en una bicapa lipídica libre de proteína a favor de su gradiente de su concentración. Sin embargo, la velocidad a la que se produce la difusión es variable y depende del tamaño de la molécula y de su solubilidad relativa en aceite. Esto quiere decir, que cuanto más hidrofóbica o no polar, más rápido difunde a través de una bicapa. Ejemplo de estas moléculas pequeñas y no polares son el O_2 y CO_2 . También, las moléculas polares no cargadas difunden rápidamente si su tamaño es

suficientemente reducido. Por el contrario, las moléculas cargadas como los iones son prácticamente impermeables por muy pequeñas que sean, la carga y el elevado grado de hidratación impiden que éstos la atraviesen [66, 68]. La figura 2.17 ilustra aquellos compuestos donde es más rápida la difusión a través de la membrana, es decir aquellos donde el número de enlaces hidrógeno que se establecen con el agua es menor [66].

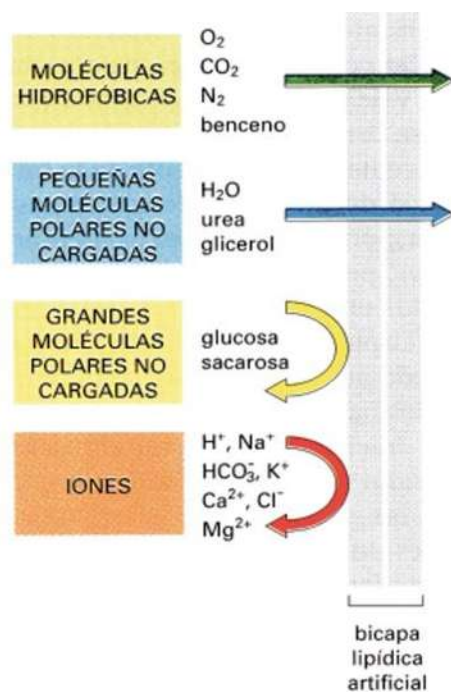


Figura 2. 17 Permeabilidad relativa de una bicapa lipídica a diferentes tipos de moléculas [66].

El segundo tipo de transporte se denomina facilitado o de difusión acelerada, debido a que existen proteínas que realizan la misma función de dos formas distintas. Este mecanismo tiene la función de que elementos como iones, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y metabolitos celulares atraviesen la membrana. Las dos clases mayoritarias de proteínas de transporte de membrana son: proteínas transportadoras y las de canal. Las primeras de ellas se unen a un soluto específico sufriendo cambios conformacionales que permiten la transferencia del soluto a través de la membrana. Mientras, que las segundas forman un tipo de poro hidrofílico que atraviesa la bicapa. Cuando los poros están abiertos, permiten que solutos tales como iones inorgánicos de tamaño y carga apropiados puedan pasar a través de ella y por lo tanto de la membrana. En resumen, se debe destacar que la velocidad de

transporte en el caso de la difusión pasiva es mayor porque los sistemas de transporte facilitado son saturables, ya que cualquier membrana tiene un número limitado de transportadores y poros, además de ser específicos. En el caso de este último, los poros transportan más rápido porque proporcionan puertas abiertas y los transportadores aumentan de manera eficaz la solubilidad de sustancias de la membrana (ver figura 2.18) [66, 68].

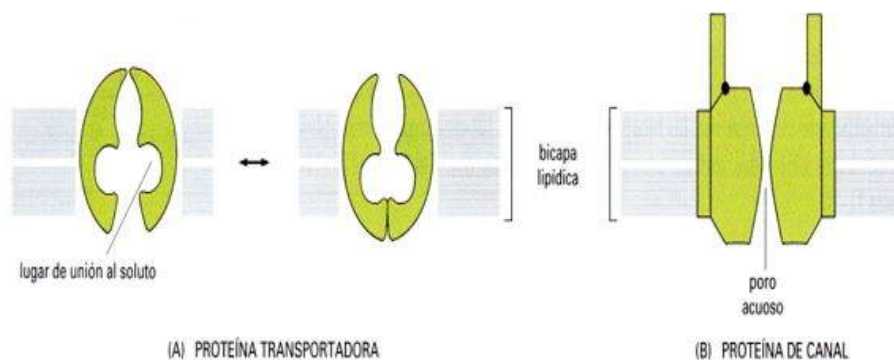


Figura 2. 18 Mecanismos de transporte facilitado a) moléculas transportadoras, b) poros proteicos [66].

Las células también necesitan proteínas de transporte que bombeen activamente ciertos solutos cuesta arriba. Este proceso es denominado transporte activo y aquí las sustancias atraviesan la membrana en contra de un gradiente de concentración, el cual siempre es mediado por proteínas transportadoras, en donde el acoplamiento de la hidrólisis del ATP proporciona la energía necesaria. El mecanismo del transporte activo es semejante a una reacción enzima-sustrato, en la cual los transportadores se comportan como enzimas especializadas ligadas a la membrana, es decir cada una de ellas tiene uno o más lugares específicos para la unión del soluto o sustrato. Cuando estos sitios son ocupados, la velocidad de transporte es máxima. Existen tres formas de transporte mediados por transportadores específicos que son uniporte, simporte y antiporte. Para entender mejor lo mencionado con la anterioridad, la figura 2.19 ilustra las tres formas actuando, en la cual, la primera transporta una molécula en un solo sentido de la membrana y actúa a favor del gradiente de concentración, la segunda ocurre cuando dos moléculas de diferente carga se complementan y se mueven a favor del gradiente al interior de la célula (frecuentemente un protón H^+) y finalmente la tercera que consiste en el movimiento en conjunto de dos moléculas, pero en dirección contraria. Por esta razón, muchos procesos de transporte activo son explicados por

las tres formas anteriores. Dos ejemplos de ellos es el transporte activo primario como el caso de la bomba sodio-potasio y el intercambiador calcio-sodio que se le denomina transporte activo secundario o de cotransporte [66].

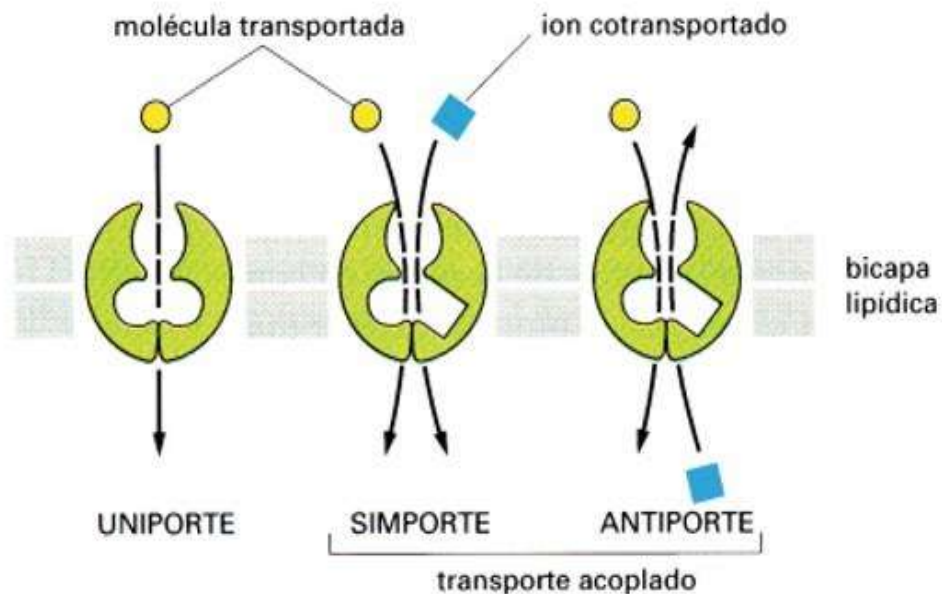


Figura 2. 19 Mecanismos mediados por proteínas transportadoras [66].

A manera de resumen, se puede entender que las principales diferencias entre los dos tipos de proteínas es que el mecanismo a través de proteínas de transporte puede ser activo o pasivo, mientras que el mediado por proteínas de canal es siempre pasivo. La figura 2.20 muestra la comparación entre los dos tipos de transporte a favor y en contra del gradiente electroquímico. Se puede apreciar que la difusión simple y el transporte pasivo son mediados por proteínas de transporte y ocurren de manera espontánea, en contraparte el transporte activo requiere de una entrada de energía [66, 68].

Finalmente, existe otro mecanismo que involucra el transporte de macromoléculas o partículas grandes que se denomina transporte en masa. Este mecanismo es por medio de la invaginación de los solutos al interior celular (endocitosis) o la secreción de sustancias del interior al exterior de la célula (exocitosis). La endocitosis consiste en tres procesos principales como es la pinocitosis (la célula bebe) que consiste en la ingestión y solutos mediante vesículas pequeñas, la fagocitosis (la célula come) a través de la ingestión de

partículas grandes en vesículas llamadas fagosomas y la endocitosis mediada por un receptor o ligando que tiene la función de capturar macromoléculas específicas del ambiente a través de proteínas ubicadas en la membrana plasmática (ver figura 2.21) [70].

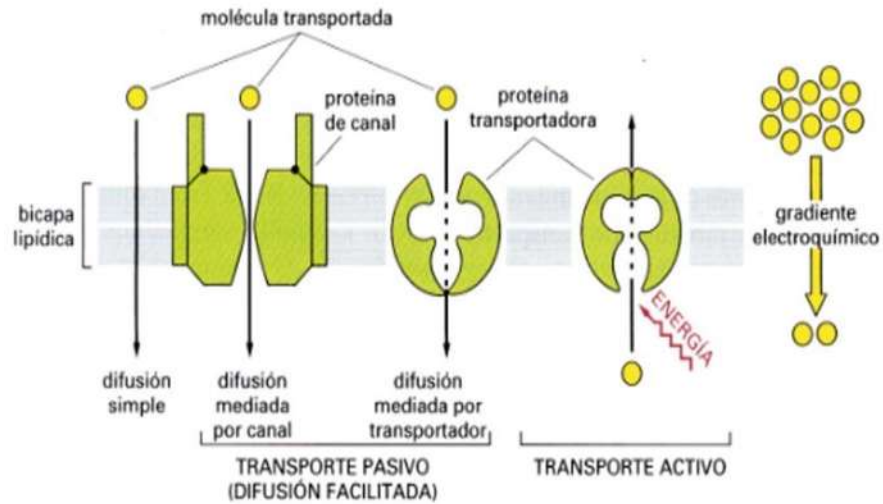


Figura 2. 20 Comparación entre transporte activo y pasivo de acuerdo al gradiente electroquímico [66].

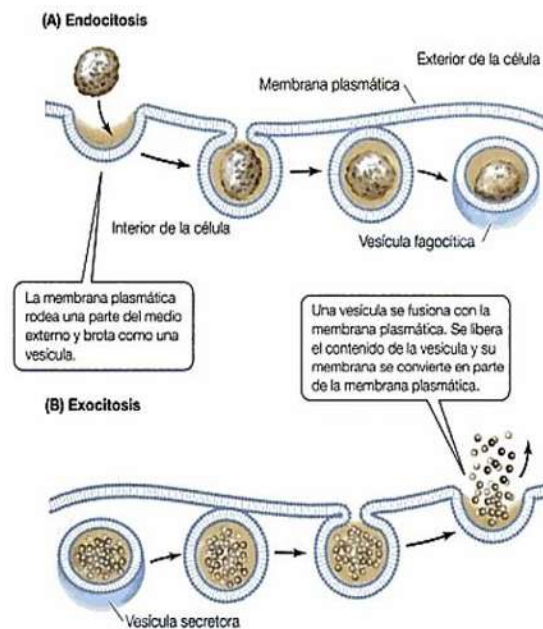


Figura 2. 21 Transporte de macromoléculas a) endocitosis, b) exocitosis [71].

2.6 Estado actual

Ahora en esta sección hablaremos del trabajo que se ha realizado en la actualidad de acuerdo a los objetivos trazados en el proyecto. Al igual que la información general presentada con anterioridad iremos paso a paso describiendo lo realizado por otros investigadores. Primero, nos centraremos en el proceso de síntesis, así como la caracterización de nanoestructuras de plata, en especial nanoalambres. Posteriormente, analizaremos la toxicidad de los nanomateriales, detallando el posible mecanismo de acción en diversos tipos de células eucariotas.

2.6.1 Síntesis y caracterización de nanoalambres de plata

Se ha logrado sintetizar AgNWs a través de diferentes métodos, en donde el método del poliol ha sido empleado mayormente. No obstante, pocos estudios han sido enfocados en procesos que emplean plantas. Las principales variaciones en los diversos estudios son a través de la concentración de la sal precursora, modificadores de forma y templetes usando micelas, polímeros y surfactantes. También, se han utilizado compuestos que pueden aportar la presencia de iones cloro y bromo. Sin embargo, algunos investigadores han centrado sus estudios en la síntesis de AgNWs empleando semillas o agentes nucleantes de sales de cobre que son más económicas en comparación con las de plata. En contraparte, algunas investigaciones muestran la síntesis de AgNWs con agentes nucleantes exóticos con un costo muy elevado como el caso del platino [48].

Primeramente, hablaremos del trabajo de Banica y col. [72] en el cual se sintetizan AgNWs por medio de un método del poliol híbrido en 2 pasos. El primer paso de este método consiste en formar AgNWs con una relación de aspecto baja a través de la reducción química de la sal AgNO_3 asistido de polivinilpirrolidona (PVP) como agente tensoactivo. Posteriormente, estas nanopartículas sirven como semillas que crecen bajo la influencia de un proceso solvotérmico. De los aspectos a destacar en el proceso de síntesis es que las semillas de los AgNWs son elaboradas a partir de la mezcla de AgNO_3 y NaCl para formar una solución etanólica de AgCl . Además, la reacción es asistida por temperatura a $160\text{ }^\circ\text{C}$, donde la mezcla resultante se separa empleando centrifugación por 10 min a 4000 rpm. Finalmente, el sobrenadante es desechado y el precipitado resuspendido en etanol. En el caso del proceso solvotérmico, éste se realizó con una autoclave sin agitación, con y sin la presencia de alcohol

isopropílico (IPA, por sus siglas en inglés) a una temperatura de 120 °C por 20 h. Por último, los AgNWs son separados de la misma manera que las semillas. La figura 2.22 (a-c) ilustra las semillas obtenidas por el método modificado, así como su caracterización estructural por DRX y espectroscopia UV-Vis. En el apartado a) es apreciable la indexación del cristal cúbico de plata, en el cual se puede notar que los nanoalambres crecen preferentemente en los planos (1 1 1), no obstante, en el difractograma se observan algunos picos que corresponden a trazas de AgCl, que indican este compuesto es difícil de retirar por un proceso de centrifugación. En cuanto a la morfología mostrada en el apartado b) se alcanzan a observar AgNWs con una forma semicilíndrica, ancho de 80 nm y longitud de 3 μm. Por otro lado, en el apartado c) correspondiente al espectrograma de UV-Vis se muestra la banda de absorción de las semillas a 377 nm y 352 nm, lo anterior es de suma importancia, ya que algunos autores mencionan que de acuerdo a las propiedades ópticas vistas por la espectroscopia UV-Vis se puede determinar la forma de los nanoalambres. Esto es debido a que la resonancia del plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) es atribuida a nanoalambres largos con tamaño similar a la plata micrométrica, modo transversal y longitudinal de éstos, así como una combinación de diferentes estructuras de plata en especial nanopartículas [48].

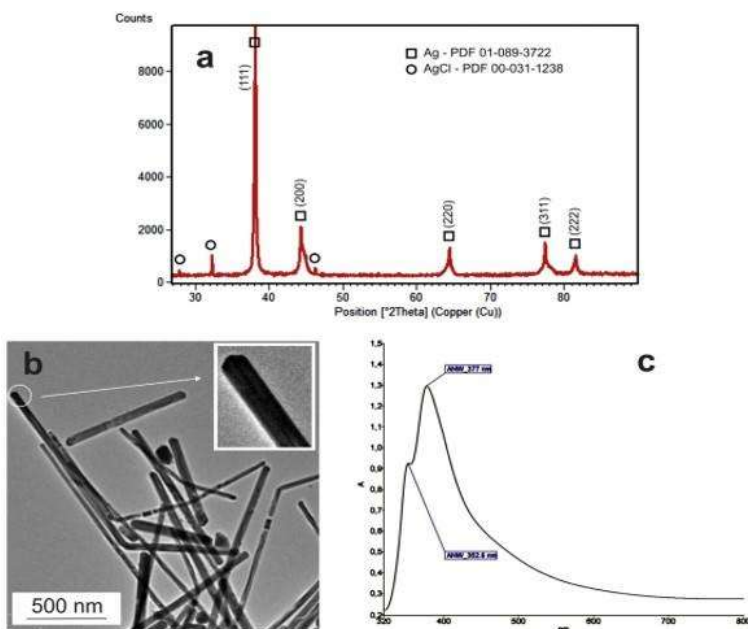


Figura 2. 22 Semillas de AgNWs a) patrón de DRX, b) imagen de TEM y c) espectro de UV-Vis [72].

Como objeto de comparación, la figura 2.23 (a-d) presenta los AgNWs obtenidos con el método solvotérmico. En los apartados (a-b) se muestran los nanoalambres sin alcohol isopropílico, en donde se observa una mezcla de ellos con diferentes estructuras de plata. Además, el patrón de rayos X revela la presencia de una gran cantidad de AgCl. En contraparte, los apartados (c-d) ejemplifican los nanoalambres obtenidos con la presencia del alcohol isopropílico, apreciándose una gran cantidad de éstos, además, el difractograma revela que las trazas de AgCl disminuyeron con la presencia del alcohol. Por lo tanto, se confirma que el alcohol isopropílico actúa como agente de control, ya que disminuye la velocidad de los iones de plata y aumenta la velocidad de difusión en la zona transversal del alambre que conllevó a un aumento en el ancho original siendo este de 80 nm hasta un máximo de 250 nm, además de ser importante en la disminución de otras estructuras de Ag. Se debe destacar en el presente trabajo, que, a pesar de hacer uso de técnicas fundamentales de caracterización, es necesario un estudio composicional más amplio por medio de espectroscopia de energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés) o mapeo químico de las distintas nanoestructuras de plata. Además, es fundamental presentar los distintos espectros de UV-Vis para identificar la relación de los plasmones de superficie con la sección transversal y longitudinal de las semillas, y nanoalambres con o sin la presencia de alcohol isopropílico, ya que la relación cambio.

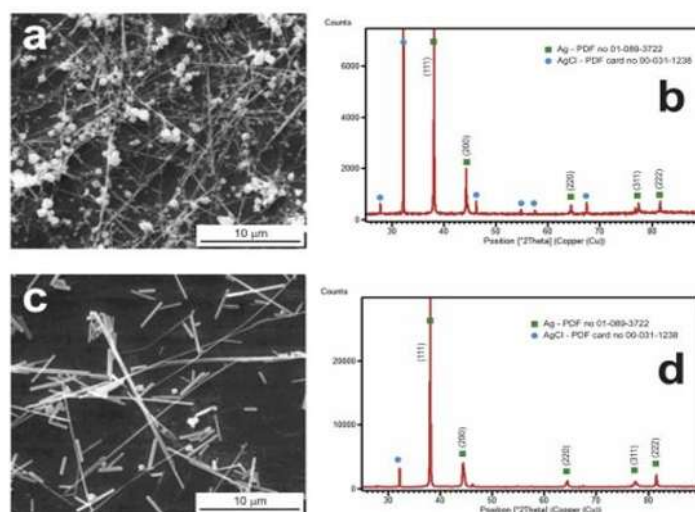


Figura 2. 23 Imágenes de MEB y patrones de DRX de AgNWs preparados por reacción solvotérmica (a-b) ausencia de alcohol isopropílico (c-d) presencia de alcohol isopropílico

[72].

Otro trabajo que emplea partículas de AgCl como semillas es el realizado por Wang y col. [73], los cuales sintetizan AgNWs a partir del método del poliol modificado. Para este trabajo, las semillas provienen de la reacción de NaCl y AgNO₃ como en el caso anterior, la diferencia es que la solución estabilizante (PVP) se mezcla con CuCl₂ a temperatura de 150 °C antes de reaccionar con la solución de AgCl. Una vez enfriada la mezcla se separa por diferentes disolventes como agua desionizada, acetona, amoníaco y etanol. El objetivo del amoníaco es eliminar los residuos de AgCl, mientras que el etanol es para mantenerlos en suspensión. En este estudio se demuestra también el efecto de diversos parámetros como son la concentración de la sal precursora AgNO₃, NaCl, el efecto de la temperatura, tiempo de reacción y el posible mecanismo de crecimiento.

La figura 2.24 muestra la evolución de la reacción a diferentes tiempos, en la cual se puede apreciar como la morfología de las nanoestructuras de plata cambia. El panel a) ilustra que la SPR de los espectros de UV-Vis es diferente para cada una de las estructuras. Las partículas de AgCl de todas las mezclas analizadas se eliminaron a través de amoníaco para rastrear solamente el cambio de la Ag. Los picos en 423, 350 y 380 nm podrían atribuirse a la SPR de nanopartículas, el modo longitudinal y el modo transversal de AgNWs, respectivamente. El cambio hacia el rojo de 380 a 387 nm se atribuye al aumento del diámetro del nanoalambre. Los paneles (b-e) identifican el crecimiento paso a paso, en el cual los nódulos pequeños unidos a los grandes se deben al AgCl. También, se reconoce una partícula con un maclado pentagonal unida a la estructura de AgCl, de la cual crecen los nanoalambres por un proceso de múltiple maclado sobre una dirección específica de crecimiento a partir de la elongación de los nódulos de Ag inmersos. Por esta razón, es un proceso de nucleación y crecimiento heterogéneo, en el cual la adición simultánea de AgNO₃ y NaCl genera la inmediata formación de cubos de AgCl y algunos pequeños grupos de AgNPs con facetamiento pentagonal que se forman en la superficie. En este caso el papel principal del Cu es evitar la formación de una mayor cantidad de AgNPs, es decir, ayuda a la pureza de la solución final de los AgNWs.

Otro de los aspectos a destacar en el trabajo, es que el tamaño de las partículas de AgCl influye en la forma de los nanoalambres, esto es porque a tamaño mayor de las partículas, más gruesos y cortos son los AgNWs. Por otro lado, la temperatura es un parámetro

importante, ya que cuando ésta se incrementa, se genera mayor cantidad de nanopartículas con múltiple maclado (MTP, por sus siglas en inglés), lo que conlleva a partículas de tamaño más grandes, una velocidad de reacción más rápida, que finaliza en la formación de nanorodillos de plata y AgNWs con una menor relación de aspecto, debido a cantidades limitadas de átomos de Ag.

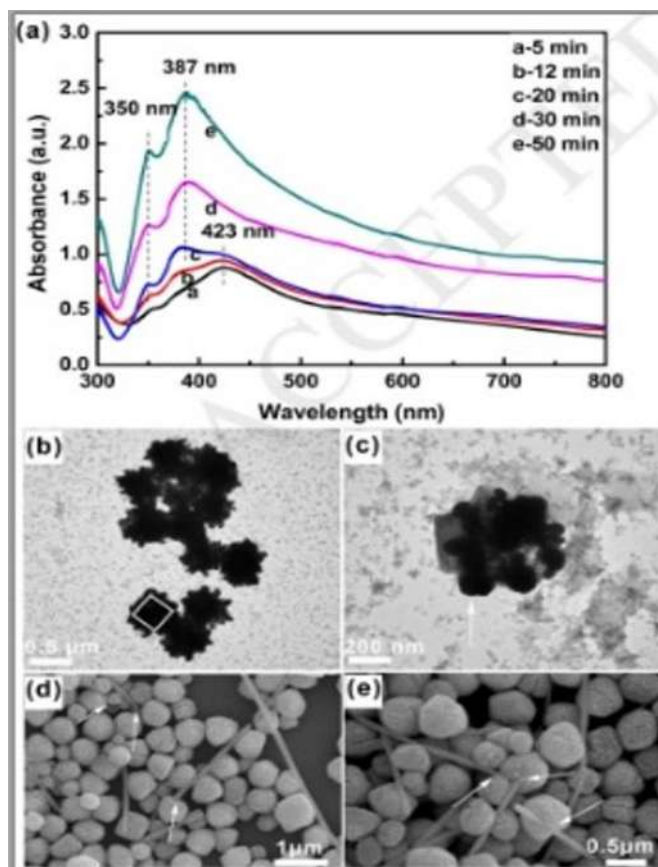


Figura 2. 24 a) Espectros de absorción UV-Vis a diferentes tiempos (b, c) imágenes de MET e (d, e) imágenes MEB de alícuotas tomadas de la solución de reacción. Las alícuotas fueron removidas 8 (b, c) y 20 (d, e) min después de la adición gota a gota de solución de AgNO_3 [72].

Otra investigación enfocada a la síntesis de AgNWs es la realizada por Jeevika y col. [74], la diferencia con los trabajos descritos con anterioridad, es que éste tiene un enfoque mayor en la síntesis verde, esto se debe a que se emplea el aceite de la plata *Syzygium Aromaticum*, conocido comúnmente como clavo. La función de la planta es la de fungir como agente reductor de las nanoestructuras de plata. La reacción se realizó a temperatura ambiente a

partir de la mezcla de AgNO_3 con aceite de clavo. Se corroboró la formación de síntesis por medio de un cambio de color en la solución que va desde un amarillo pálido hasta un tono grisáceo. En este caso, el mecanismo de purificación es por medio de un lavado con diferentes solventes, siendo éter de petróleo para eliminar la naturaleza aceitosa del clavo, acetona y finalmente agua. Posteriormente, se centrifuga la solución a 3000 rpm por 15 min, se filtra, se seca al vacío y los AgNWs son resuspendidos en metanol. El procedimiento de estabilización fue con la ayuda de un método de recubrimiento por caída, que consiste en la preparación de una mezcla de AgNWs y alcohol isopropílico. Finalmente, en un portaobjetos de vidrio se adicionó una gota de tinta y sobre estos dos la solución purificada de nanoalambres. El sustrato recubierto se recoció a 100 °C durante 1 h (ver figura 2.25).

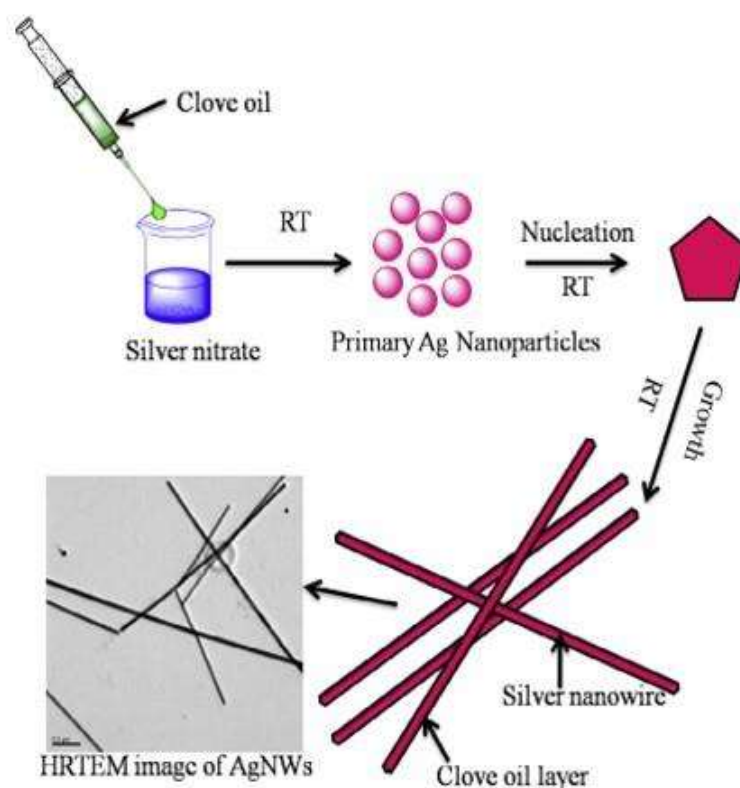


Figura 2. 25 Representación esquemática de la síntesis de AgNWs empleando el aceite de la planta *Syzygium Aromaticum* [74].

La formación de los AgNWs se estudió con la espectroscopia UV-Vis, la morfología por medio de MET con imágenes de alta resolución. Para el análisis estructural y composicional

emplearon DRX y las técnicas de MET de patrón de área selecta (SAED) y EDS, de forma respectiva.

La figura 2.26a presenta los espectros de UV-Vis de distintas nanoestructuras de plata tales como AgNPs y AgNWs con diferente relación de aspecto, siendo sus máximos en la banda de plasmón de superficie ubicados en 415, 395 y 387 nm, respectivamente. El SPR en 415 nm se debe al modo longitudinal de la plata con forma esférica (nanopartículas). En el caso de las bandas de color rojo y morado que pertenecen a los nanoalambres, es notorio que la banda se hace más angosta y aparecen múltiples picos que indica la formación de Ag micrométrica y nanoestructuras. En el caso de la figura 2.26b, se presenta el patrón de DRX de los AgNWs con una serie de picos ubicados en 38.14, 44.32, 64.48, 77.41 y 81.60 ° que corresponden a los planos (111), (200), (220), (311) y (222) de las reflexiones de Bragg de la Ag con estructura cúbica centrada en la cara (FCC, por sus siglas en inglés).

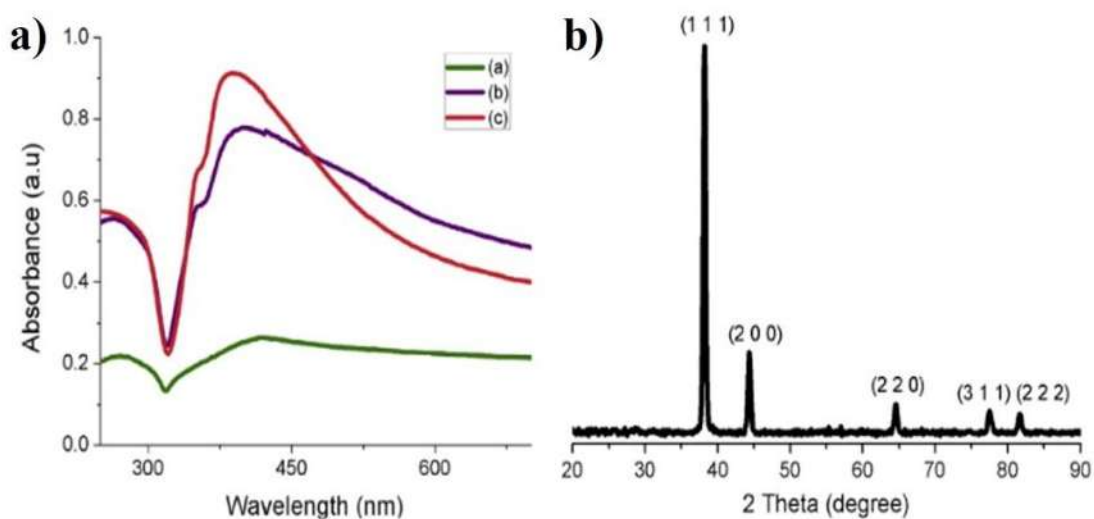


Figura 2. 26 Análisis de formación de AgNWs a) espectros de UV-Vis [(a) AgNPs-0.5 mM de AgNO₃, (b) AgNWs- 100 mM de AgNO₃ y (c) AgNWs-150 mM of AgNO₃ y b) difractograma de rayos X [74].

El análisis de MET se ejemplifica en la figura 2.27 con imágenes a diferentes aumentos en las cuales se identifica la forma anisotrópica de las AgNPs con facetamiento pentagonal, que es atribuido al mecanismo de crecimiento de los nanoalambres (a-c). Para el estudio por medio de MET, los autores mencionan que obtuvieron una mayor cantidad de nanoalambres a medida que aumenta la sal precursora, lo que coincide con otros estudios [48], aunque no

presentan imágenes en el artículo o material complementario que lo corrobore. La distribución de tamaños se presenta insertada en el panel c) a través de un histograma que arroja como resultado aproximadamente 39 nm de ancho y 3 μm de longitud. El apartado d) muestra la forma de los nanowires crecidos bajo la influencia del maclado pentagonal, mientras que el panel e) indica que el aceite de clavo fungió como agente estabilizante. La imagen de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés) mostrada en f) indica la naturaleza cristalina de los alambres, perteneciendo al cristal de Ag y coincidiendo con lo analizado con anterioridad por UV-Vis. También, el panel g) ilustra el análisis composicional EDS arrojando como resultado la Ag elemental y Cu que proviene de las rejillas empleadas en el portamuestras. Finalmente, el patrón de área selecta ilustrada en el panel h) revela el espaciamiento d de la red, siendo 2.30 Å y 2.14 Å que corresponden a los planos (1 1 1) y (2 0 0) de la estructura FCC del cristal de plata.

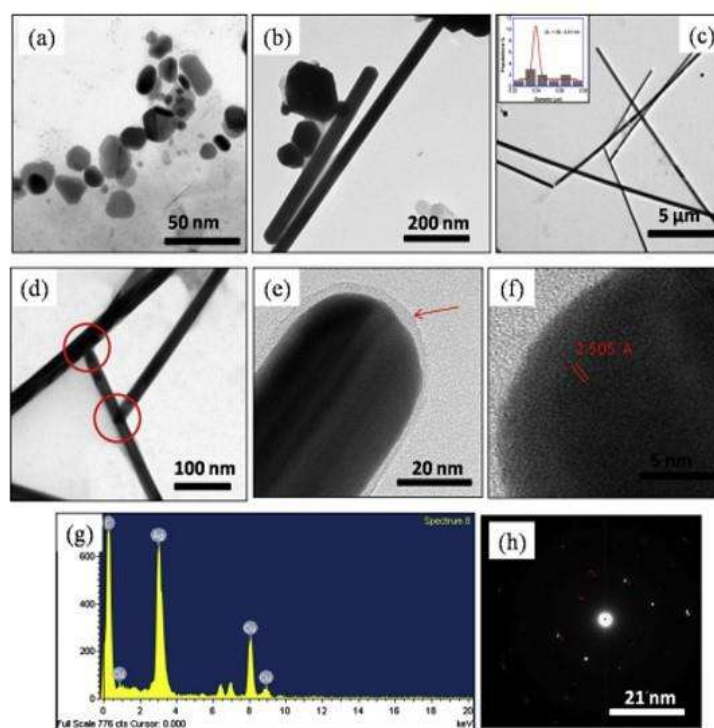


Figura 2. 27 Imágenes de TEM a) forma anisotrópica de nanopartículas de plata (0.5 mM de AgNO_3 , b) AgNWs (100 mM de AgNO_3), c) AgNWs (150 mM AgNO_3) e histograma de tamaños, d) unión de AgNWs, e) AgNW individuales cubierto por aceite de clavo, f) HR-TEM, g) espectro EDS y h) patrón SAED de AgNWs [74].

Pocos trabajos han sido enfocados en la obtención de nanoestructuras 1D empleando plantas, tal es el caso de Taheri y col. [75], donde se sintetizan nanoagujas de plata, asistiéndose de dos plantas como son chalota (*Allium ascalonicum*) y goma de albaricoque como agente reductor y estabilizante respectivamente. El empleo de chalota como reductor se debe a los flavonoides presentes, siendo el más importante la quercetina, isoharmentina y monosacáridos como la glucosa.

Para ejemplificar el proceso de elaboración, la figura 2.28 muestra los pasos de síntesis, en la cual, primeramente, se lavó y molió la chalota en agua destilada, para que con ayuda de un proceso de centrifugación se lograra la separación del sólido y el extracto, con la finalidad de emplear este último en el proceso de síntesis. El cálculo de la concentración se realizó por medio de la evaporación del extracto en un horno al vacío a través de las partículas sólidas restantes. La reacción de síntesis se realizó como cualquier método verde por medio de la mezcla de la sal precursora AgNO_3 con el extracto de la planta de chalota con ayuda de agitación por 15 min. Se monitoreó la solución, hasta un cambio de color que indica la formación de sólidos, siendo comúnmente AgNPs. Posteriormente, para evitar aglomeración y coalescencia de las partículas se centrifugó por 20 min a 4000 rpm y se adicionó la goma de albaricoque (ATG) para hacer crecer las nanoagujas con ayuda de un dispositivo de ultrasonido.

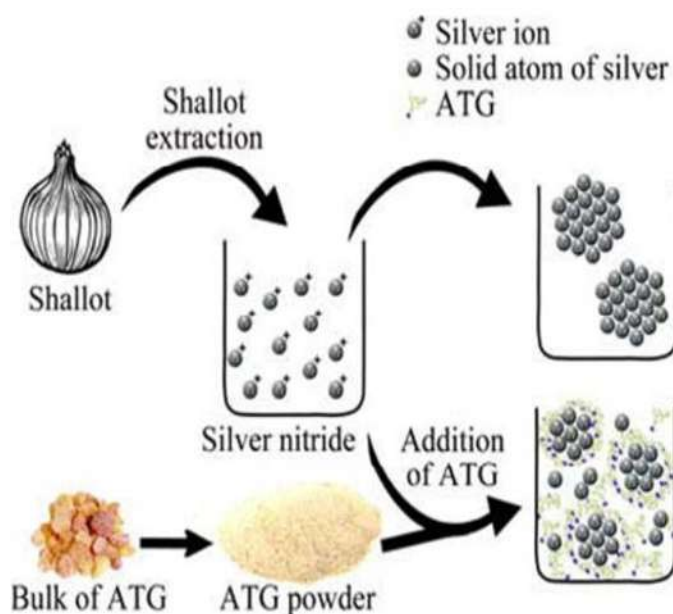


Figura 2. 28 Mecanismo de nanoagujas de plata en dos pasos [75].

La figura 2.29a presenta el espectro de UV-Vis de las AgNPs formadas en una etapa primaria, donde se aprecia un máximo en la banda SPR a una longitud de onda de 320 nm. Este resultado no coincide con la mayoría de los trabajos enfocados en la síntesis verde exclusiva de AgNPs, donde generalmente el máximo en la banda SPR se presenta en un rango comprendido entre 400-550 nm. Además, se informó que el cambio de color de la solución fue de transparente a un tono amarillo, cuando la mayoría de los trabajos mencionan tonalidades marrón, gris o negro [76]. Algo que puede causar el efecto anterior es un tamaño de partícula muy pequeño, ya que cuando el máximo de la banda es recorrido hacia el violeta indica que los tamaños decrecen. Además, el cambio en la tonalidad de la solución puede ser ocasionado por el cambio de diversas propiedades dentro del mismo rango nanométrico, como es el caso del Au [77]. Adicionalmente, la figura 2.29b ilustra el patrón de difracción de rayos X donde se demuestra la cristalinidad de las AgNPs a través de la indexación de los picos a 38° , 44° , 64° y 77° correspondientes a los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1), respectivamente de la estructura FCC de plata. En el trabajo es mencionado que los picos agudos en el patrón de difracción revelan que las AgNPs están altamente cristalizadas, con diámetros de 5 a 15 nm de acuerdo a la ecuación de tamaño de cristal de Debye-Scherrer. Lo anterior puede ser erróneo, ya que la ecuación de Debye-Scherrer no es válida para tamaños de cristal inferiores a los 10 nm, por lo tanto, su porcentaje de error es mayor. No obstante, aunque es una buena aproximación, se debió considerar emplear la ecuación de Williamson-Hall para un resultado más exacto, ya que considera variaciones en el ancho del pico por efectos instrumentales y tensiones tal como es el caso del maclado en las AgNPs [78, 79]. En contraparte, la figura 2.29c manifiesta la presencia de nanopartículas (8-20 nm) en conjunto de una mayor cantidad de estructuras fuera del rango nanométrico en forma de rodillos y esferas. Estos resultados ya no coinciden con el espectrograma de UV-Vis, puesto que esas estructuras deberían ser reflejadas en el ancho del SPR o en la aparición de otro máximo cercano a los 350 nm correspondientes a la Ag micrométrica. Una explicación de lo mencionado con anterioridad, es que el pico de SPR presentado a 320 nm corresponde a la plata micrométrica y no a las AgNPs (ver figura 2.29a).

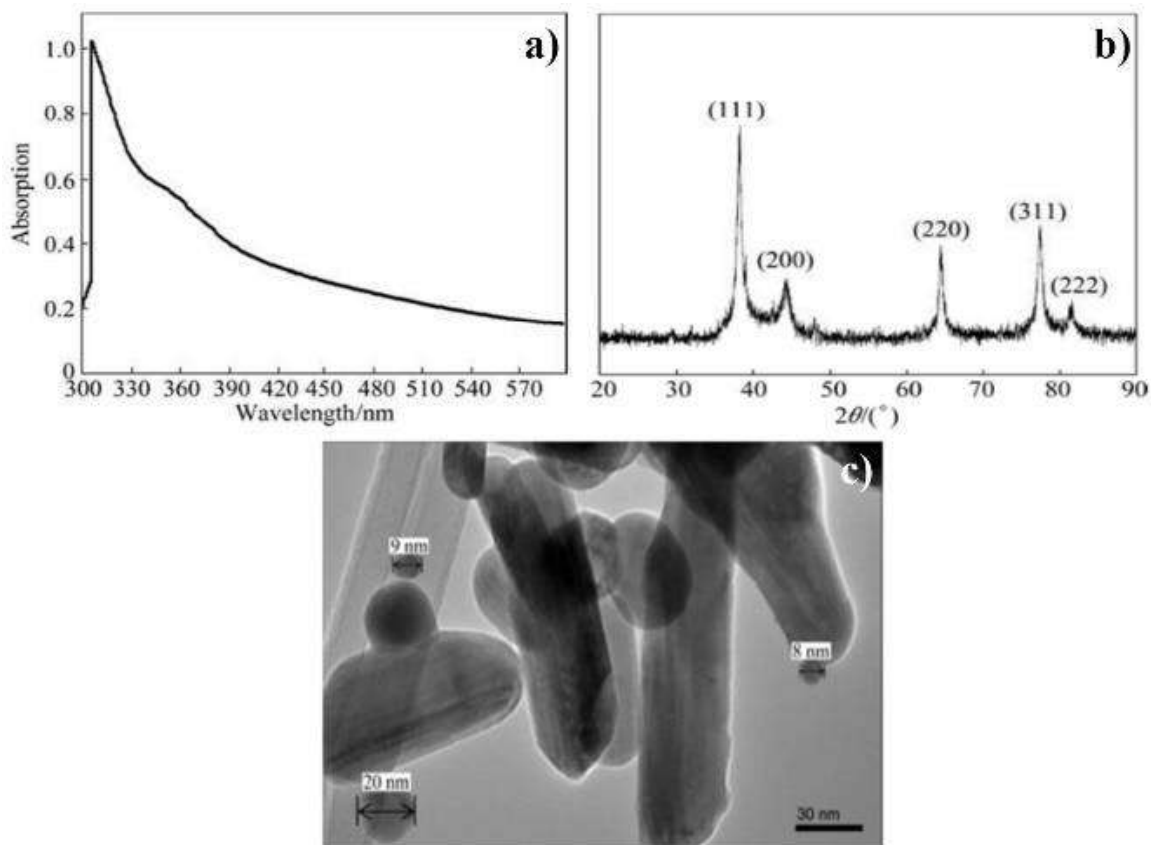


Figura 2. 29 AgNPs sintetizadas a) espectro de UV-Vis, b) patrón de difracción de rayos X e c) imagen de MET [75].

Finalmente, la figura 2.30 (a-c) exhibe la formación de nanoagujas a partir de la agregación de AgNPs con ayuda del agente estabilizante goma de albaricoque. Se distingue una gran cantidad de nanopartículas y pocas nanoagujas con diámetros comprendidos entre 50-60 nm y longitudes entre 5-10 μm . Esto puede indicar que el proceso planteado no es eficaz o simplemente que es necesario modificar otros parámetros como el tiempo de formación, el tiempo de adición del agente estabilizante, concentración de la sal precursora, agente reductor o la presencia de una semilla como en otros trabajos. Cabe destacar, que hay una enorme cantidad de variaciones como es la de temperatura, modificadores de pH, de forma, pero no se hace referencia a ellos porque ya cambiaría la simplicidad del método y la esencia o novedad del trabajo, ya que pasaría de ser un método verde a uno híbrido.

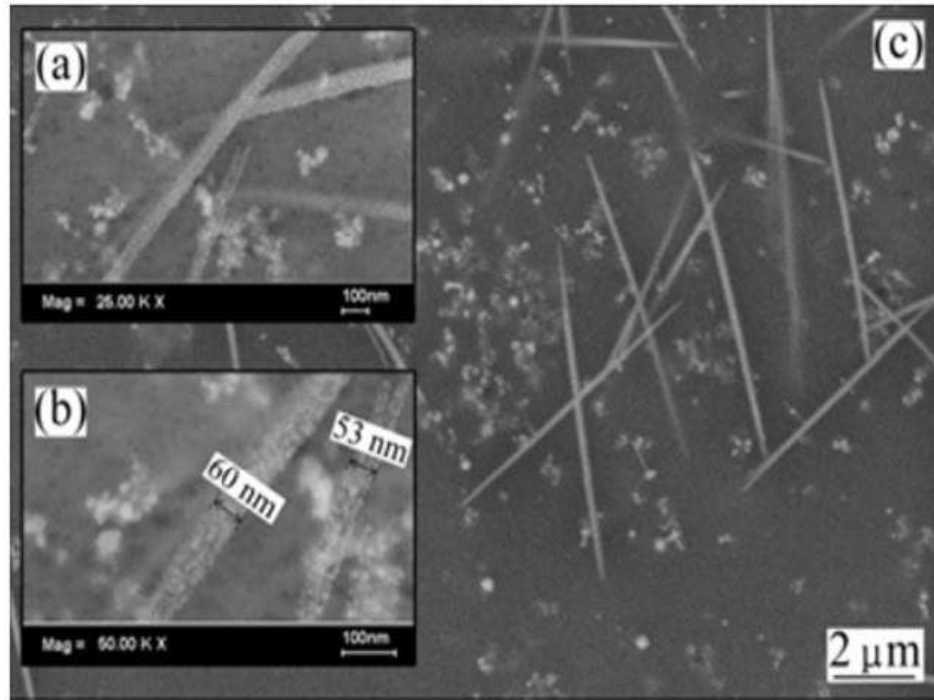


Figura 2. 30 Imágenes de MEB de las nanoagujas de plata (a- b) AgNPs conectadas entre sí formando una estructura en forma de aguja y c) Nanoalambres con diámetros entre 60–80 nm [75].

La última investigación que abordaremos en esta parte es la realizada por Lin y col. [80], los cuales sintetizan AgNWs de plata a partir de un método verde usando la hoja de la planta *Cassia fistula* mejor conocida como caña fistula o lluvia de oro. A diferencia del trabajo anterior, aquí solo es empleada una sola planta que tiene la doble función de agente reductor y estabilizador. El proceso de síntesis es muy sencillo, ya que solo consiste en la preparación de una infusión de la planta, que posteriormente es mezclada con la sal precursora AgNO_3 empleando una temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, agitación a 150 rpm, en la oscuridad por un tiempo de 48 h. En la figura 2.31g se exhibe el monitoreo de la reacción mediante un espectrograma de UV-Vis, donde es notoria la aparición de una banda de SPR débil en aproximadamente 430 nm al inicio de la reacción. A medida que pasa el tiempo, ésta incrementa y adicionalmente aparece un segundo pico cercano al violeta, que se puede atribuir al plasmón transversal de los AgNWs. También, es evidente la presencia de la banda de plasmón original que es concedida a las AgNPs, por lo tanto, en la solución habría una mezcla de ambas nanoestructuras.

La figura 2.31 (a-f) muestra imágenes de MET de diferentes etapas del proceso para comprender lo visualizado en los espectros de UV-Vis. Se puede apreciar que el mecanismo principal de formación es por medio de la maduración de Ostwald, donde las partículas más grandes crecen a expensas de las pequeñas (a-b), una vez que predominan las partículas de tamaño mayor comienzan a aparecer estructuras 1D como es el caso de los rodillos (c-d). Posteriormente, éstos se alinean unos con otros y forman estructuras de mayor tamaño como son los nanoalambres (e-f).

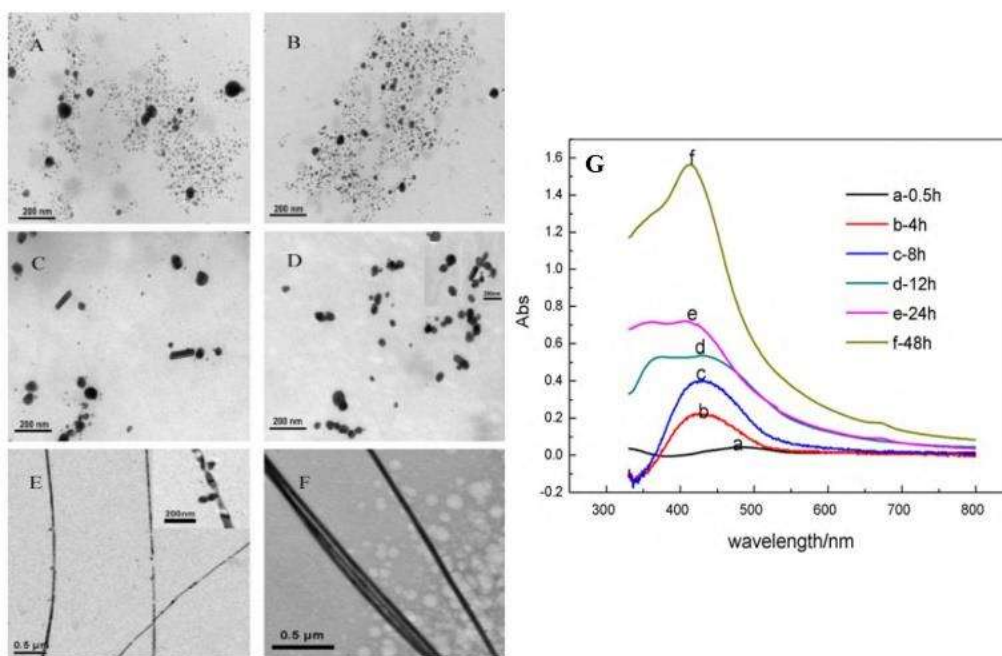


Figura 2. 31 Imágenes de MET en diferentes etapas de reacción: a) $t = 0.5$ h, b) $t = 4$ h, c) $t = 8$ h, d) $t = 12$ h, e) $t = 24$ h, f) $t = 48$ h y h) espectros de UV-Vis [80].

En forma de resumen de este apartado, referente a la síntesis de AgNWs, hemos explorado diversos métodos de síntesis basados en la reducción y estabilización de las nanoestructuras. Se ha demostrado que es posible sintetizarlos empleando estrategias tales como la adición de agentes nucleantes, empleando templates de crecimiento, dosificando los reactivos, cambio de temperatura, agitación, variando número y concentración de agentes reductores, estabilizantes y sales precursoras, entre otros. Se debe tener en cuenta que sea cual sea el método empleado, cada uno de ellos tendrá un mecanismo distinto de crecimiento, ya sea por medio de maclado, sobre un sustrato o asistido de un estabilizante con la función de actuar como modificador de forma [48]. Por otro lado, se ha observado que uno de los mayores

problemas es la purificación de los AgNWs, esto se debe a que en la mayoría de los trabajos siempre hay una mezcla nanoestructuras-nanopartículas. Entre los métodos más comunes, analizamos el de la centrifugación sin o con el uso de distintos solventes (agua, amoníaco, alcoholes) en dos o más pasos. La técnica de purificación empleada en los métodos del poliol consiste en mezclar el producto de reacción con acetona y centrifugar a 4000 rpm por 20 min. Después, se elimina el sobrenadante y se añade alcohol isopropílico (IPA) al sistema de precipitación y se centrifuga a 3000 rpm durante 20 min. El paso anterior se repite de 3 a 4 veces y el precipitado se dispersa en IPA y se guarda para almacenamiento. Otro método similar fue realizado por Prabukumar y col. [81], que consiste en una decantación con ayuda de una precipitación con solventes para eliminar AgNPs. Para explicar la técnica, en la figura 2.32 se esquematiza el proceso paso a paso, que consiste en mantener en decantación por 12 horas la mezcla de reacción. El producto que permanece como sobrenadante se retira del matraz y se añade acetona. La mezcla se somete a ultrasonido durante 2 min y se asienta en el fondo para eliminar posteriormente el sobrenadante resultante. Posteriormente, se añade el solvente IPA y se disuelven los precipitados para convertirlos en una solución. A continuación, se deja precipitar los productos dispersados en un tiempo de 15 min y finalmente se elimina la mitad superior de la solución y se conserva la mitad del producto sedimentado en el tubo.

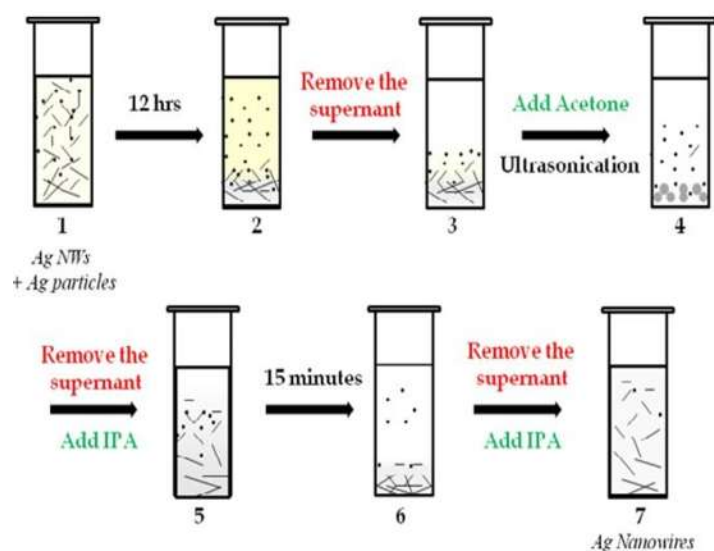


Figura 2. 32 Representación esquemática del proceso de decantación y purificación con disolventes [81].

2.6.2 Mecanismo de acción de las AgNPs en células eucariotas

Es conocido que las nanopartículas de plata han tenido un amplio estudio en los últimos años, debido a la cantidad de aplicaciones que presentan. El área más explotada ha sido la de la medicina como agente antibacteriano, debido a su alta capacidad. Actualmente, el estudio en el área biológica ha incrementado, debido a que se han estudiado efectos de las AgNPs en hongos, bacterias, células tumorales, entre otros. No obstante, pocos estudios han sido enfocados en el mecanismo de daño en células sanas. Por esta razón, a lo largo de este apartado analizaremos algunos estudios enfocados a daños celulares a través de diversas técnicas. El primer artículo del cual hablaremos es una recopilación realizada por Du y col. [10], engloba de manera general la toxicidad de las AgNPs en distintas especies tales como bacterias, células, plantas, animales acuáticos y mamíferos. En el caso de las células de mamíferos se ha demostrado que el mayor efecto de daño es dependiente del tamaño de la nanopartícula y la línea celular que se evalúe. Un ejemplo de lo anterior, es lo realizado por Park y col. [82], en el cual el efecto de una partícula de 20 nm tiene mayor citotoxicidad en comparación de una de 80 nm. En contraparte Suazo y col. [83], indicaron que la citotoxicidad y la genotoxicidad inducidas por AgNPs de 100 nm fueron mayores que las inducidas por los de 10 nm para líneas celulares CHO-K1 y CHOXR5. Además, en el caso de este último estudio se ha demostrado que el tamaño de nanopartículas no ha afectado a células tumorales como la Hela y U937, sino al contrario en éstas causaron un efecto antitumoral denominado caballo de Troya. Otro de los factores que compete es la forma, un ejemplo es el realizado por Stoehr y col. [84], donde encontraron que los nanoalambres de Ag reducen la viabilidad celular y aumentan la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en células epiteliales, mientras que AgNPs esféricas no presentan efecto. Algunas investigaciones mencionan que las nanopartículas pueden suprimir los efectos antiinflamatorios e inducen a estrés oxidativo. Además, otro estudio relacionado a la evaluación de AgNPs demostró que éstas afectan la proliferación, dañan la membrana e inducen a apoptosis celular [85].

Es importante conocer los diversos mecanismos posibles por los cuales las nanopartículas dañan a las células. Entre ellos, se encuentran el estrés oxidativo, daño al DNA, lipoperoxidación, daño a la membrana y daño mitocondrial. Un posible mecanismo que

puede ocurrir en las células es una reacción en cadena, que consiste en una elevada producción de ERO causada por el estrés oxidativo que generan las AgNPs, que a su vez causan la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados dañando la permeabilidad de la membrana. Finalmente, la célula con el objetivo de equilibrar el nivel de ERO activa sistemas enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes causando daños en el ADN, apoptosis, inflamación y fibrosis celular. Cuando las partículas son muy pequeñas éstas pueden penetrar la membrana e interactuar directamente con la cadena respiratoria o ADN. Por último, otro mecanismo sugiere la liberación de Ag^+ por parte de las AgNPs. En este caso, los iones metálicos pueden ingresar al sistema circulatorio o a las células del organismo por deglución intracelular. La obstrucción del intercambio iónico y la interrupción del proceso de exocitosis son los que inducen a la citotoxicidad ante un exceso de nanopartículas en la superficie de las células [10, 86, 87].

Ahora nos centraremos en las técnicas y metodologías *in vitro* para estudiar el mecanismo de acción y toxicidad de AgNPs. Una de las pruebas empleadas comúnmente en microorganismos como bacterias es el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) como el caso de Das y col. [88], los cuales emplearon este método para el estudio bactericida de las AgNPs en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados arrojaron que la proliferación disminuye con el incremento en la concentración de las AgNPs, teniendo mayor actividad para los microorganismos gramnegativos (*E. coli*). Esto puede explicarse por las diferencias en la pared de peptidoglicano de cada cepa, siendo más ancha las de la grampositiva en comparación con las gramnegativas. Sin embargo, las bacterias gramnegativas poseen una membrana externa fuera de la capa de peptidoglicano [89]. La membrana externa en el caso de *E. coli* es asimétrica y contiene en su mayoría cadenas de fosfolípidos compactas, mientras que la lámina externa está compuesta de lipopolisacáridos (LPS). Por esta razón, es de suma importancia un análisis centrado en la interacción de las AgNPs con la membrana plasmática de distintas células o microorganismos, ya que como vimos en el área de revisión bibliográfica su composición es variable entre organismos y desempeña un papel esencial en la permeabilidad de compuestos ajenos a ella. Entre los otros ensayos para determinar la inhibición del crecimiento celular se encuentra el método de Kirby- Bauer o método de difusión de disco o el de crecimiento celular en líquido por medio de turbidimetría.

Uno de los ensayos característicos para identificar la citotoxicidad es mediante métodos colorimétricos de viabilidad celular, que consiste en la interacción de distintas células con el material que conduce a la toxicidad. Tal es el caso de Jang y Col. [90], los cuales centran su investigación en el efecto de las AgNPs sintetizadas por un método verde asistido de la planta *Lonicera hypoglauca* sobre líneas células de cáncer de mama MCF-7. En este trabajo, se evalúa la viabilidad celular empleando el reactivo 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2-h-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). La figura 2.33 (a-b) exhibe el comparativo de la viabilidad celular entre células MCF-7 y normales (RAW 264.7). Primeramente, el panel a) ejemplifica el estudio en las células sanas, en donde se observan los diferentes efectos de exposición en las células con o sin un agente externo (control). Es notorio, que para este tipo de células la disminución de la viabilidad no es muy alta para la solución expuesta a las AgNPs (500 µg/ml). Para el caso del extracto de la planta hay un incremento en la viabilidad celular que puede ser causado por la cantidad de azúcares que favorecen a los procesos metabólicos de la célula. En contraparte, el panel b) expone las células cancerosas MCF-7, en las cuales la viabilidad disminuye por debajo del 20 % para las AgNPs, lo anterior resulta algo benéfico, debido a que el daño se exhibe más para células enfermas en comparación a las sanas, que es lo que se busca en las terapias contra este padecimiento. El comportamiento del extracto de la planta en esta ocasión fue el mismo, aunque para la doxorrubicina (DOX), la disminución en la viabilidad fue parecido al de las AgNPs. En consecuencia, se habla de un efecto similar entre el fármaco y las AgNPs al menos para este tipo de células. Aunque, es conocido que el DOX daña a todo tipo de células, hubiera sido interesante que se mostrará el comparativo en la evaluación de células RAW 264.7. Por otro lado, la figura 2.34 (a-d) presenta 4 imágenes que corresponden a la exposición de las células MCF-7 con los reactivos experimentales. Es apreciable, que las células expuestas al fármaco y a las AgNPs están disgregadas, con morfología circular causadas por el daño y con poca confluencia. Por el contrario, las células del control y las expuestas a la planta crecen juntas unas con otras en forma triangular (alta confluencia).

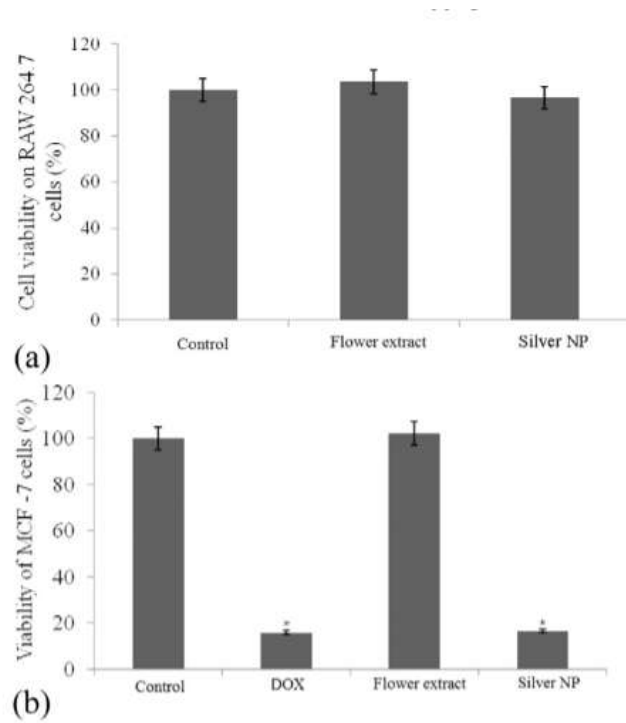


Figura 2.33 Efecto de las AgNPs en la viabilidad celular a) RAW 264.7 Y b) MCF-7 [90].

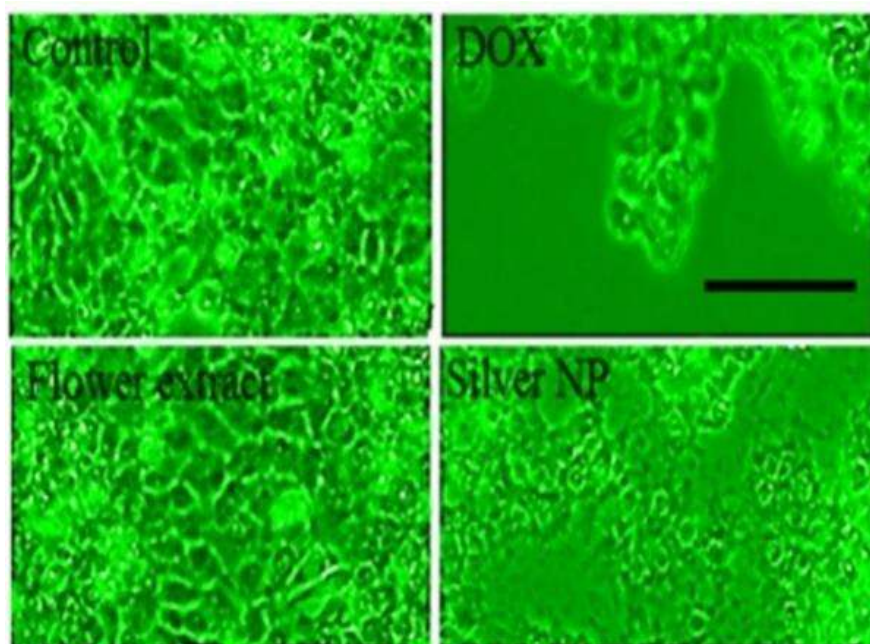


Figura 2.34 Imágenes morfológicas de MCF-7 después de la exposición a reactivos experimentales (barra de escala 50 μm) [90].

Por otro lado, Sun y col. [91] enfocan su trabajo en el efecto de dosis bajas de AgNPs con tamaño aproximado de 20 nm en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). En el presente estudio se evalúa la viabilidad y determinación de las especies reactivas de oxígeno. El método de medición de ERO fue a partir del empleo de una sonda fluorescente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Para el ensayo, las células se colocaron en placas y se expusieron a AgNPs y AgNO₃ (para evaluar la actividad de Ag⁺) durante 1 h. Se lavaron con un buffer fosfato salino (PBS) y se incubaron con DCFH-DA durante 30 min. Después de la incubación, las células se lavaron y resuspendieron en PBS frío. Para el análisis se empleó microscopía confocal. En otro orden de ideas, la apoptosis fue detectada con un kit de tinción anexina V-FLUOS. Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con AgNPs o AgNO₃ durante 1 h. Luego, las células se recogieron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS previamente enfriado y se resuspendieron en una solución de unión de anexina-V-FLUOS que contenía conjugado anexina-V-FITC y yoduro de propidio (para diferenciar apoptosis de necrosis). Después de 15 min de incubación, las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo.

La figura 2.35 (a-d) engloba los resultados de las pruebas descritas con anterioridad. En el panel a) muestra la citotoxicidad de las AgNPs a diferentes concentraciones, en donde el efecto de éstas es mínimo, de hecho, el mayor efecto fue para la concentración más alta (10 mg/ml) con una viabilidad del 95.4 %, siendo nula debajo de ésta. Como referencia el panel b) exhibe el efecto de los iones Ag después de 1 h de exposición, la cual demuestra que para concentraciones inferiores de 1 mg/ml, no hay efecto de toxicidad. Para confirmar que las partículas no causan daño en la célula, el panel c) muestra los niveles de ERO después de la exposición a AgNPs (2 y 4 mg/ml) o Ag⁺ (0.4 mg/ml) durante 1 h, empleando el H₂O₂ como control positivo. En comparación con este no hubo un aumento significativo de la fluorescencia en las HUVEC con las concentraciones seleccionadas de AgNPs o iones Ag, lo que indica que no hay exceso en la generación de ERO. Como consecuencia, las AgNPs y Ag⁺ no pueden inducir la apoptosis celular (panel d).

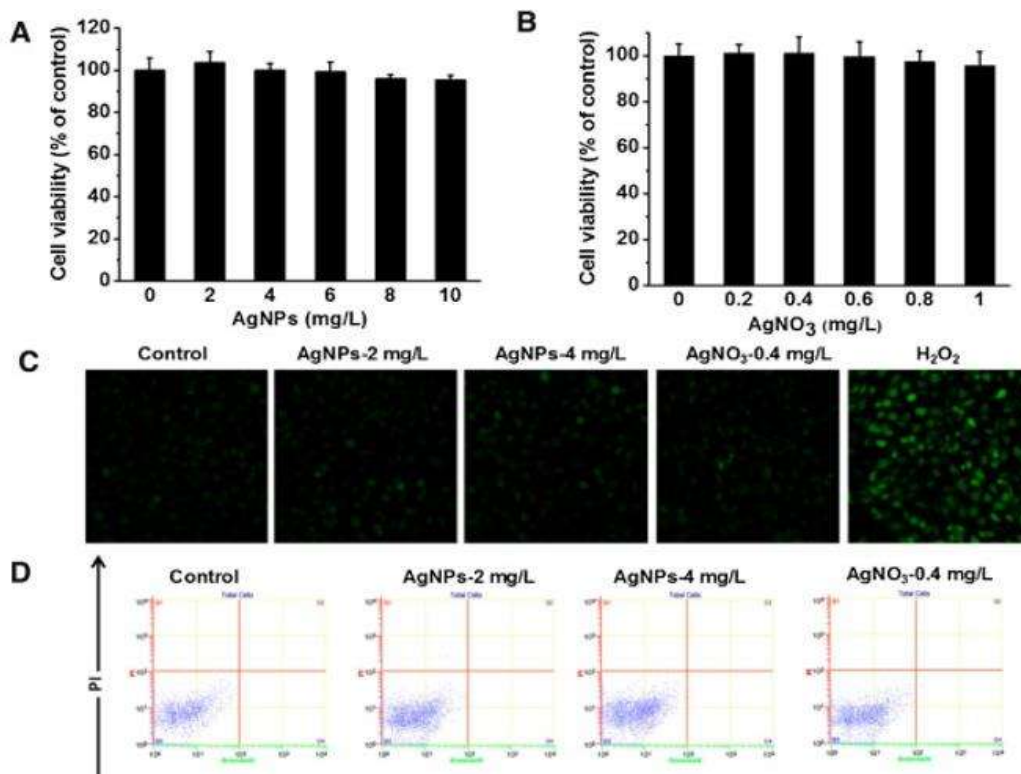


Figura 2. 35 Evaluación de citotoxicidad, generación de ERO y apoptosis de AgNPs iones de plata en HUVECs. a) ensayo MTT en AgNPs, b) viabilidad celular de iones de plata, c) determinación de ERO y d) ensayo de apoptosis celular utilizando tinción con anexina V / PI [91].

La última herramienta de estudio la que hablaremos en esta sección es la microscopía electrónica. Para hacer referencia a ello explicaremos brevemente el trabajo realizado por Ahmed y col. [92], el cual tiene como objetivo el explicar el cómo afectan las diferentes funcionalidades de superficie de las AgNPs a las células hepáticas de los mamíferos (HepG2). La funcionalización fue a través de diferentes agentes tensoactivos como bis (2-etilhexil) -sulfosuccinato de sodio (AOT, por sus siglas en inglés), PVP, albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), poli-L-lisina (PLL, por sus siglas en inglés) y bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés). La figura 2.36 (a-h) ilustra de manera clara la captación de AgNPs por parte de las células HepG2. Es evidente, que todas la AgNPs funcionalizadas con los agentes tensoactivos mencionados con anterioridad se encontraron principalmente dentro de la célula unida a la membrana. En el caso de los compartimentos celulares como el núcleo, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi

no contuvieron nanopartículas. Los paneles (a-b) son los controles, es decir células sin tratamiento de AgNPs, por ello no hay presencia de éstas. Por el contrario, en los paneles (c-h) se aprecian AOT, PVP, BSA, PLL y CTAB-AgNPs dentro de las células, respectivamente. Es importante hacer un énfasis en panel f), debido a que se percibe que las BSA-AgNPs fueron capaces escapar de las vesículas limitadas a la membrana y alcanzar las mitocondrias. Otro aspecto a destacar es que las PLL y AOT-AgNPs fueron absorbidas por las células HepG2 como agrupaciones y partículas individuales.

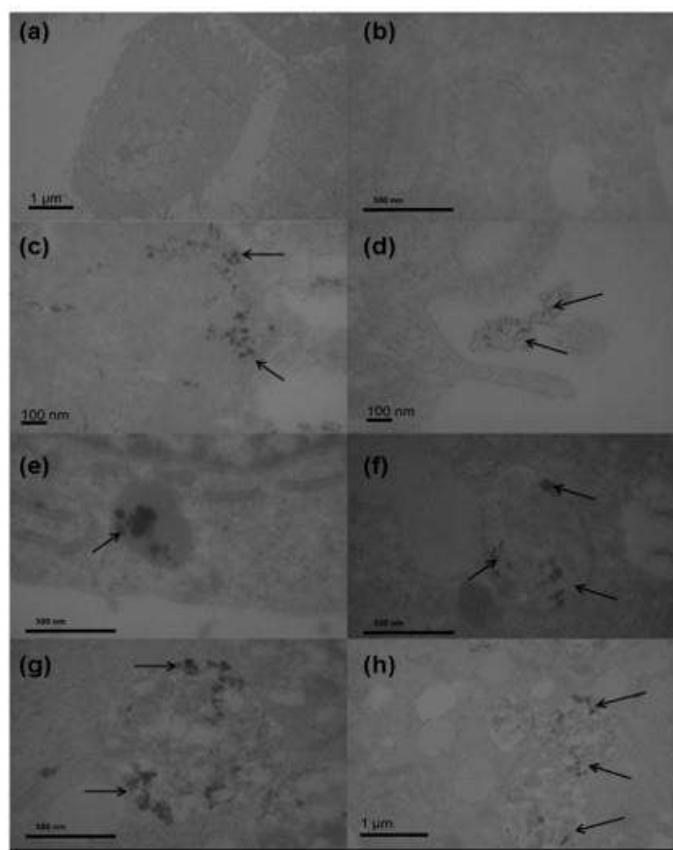


Figura 2. 36 Imágenes de TEM de la localización de las AgNPs en células HepG2 (a-b) células no tratadas sin cambios morfológicos, c) AOT-AgNPs encontrado en endosoma después de 24 h, d) Proceso de internalización de AOT-AgNPs en células HepG2, e) aglomerados de PVP-AgNPs encontrados en la estructura de membrana, f) BSA-AgNPs encontrado en mitocondrias de células HepG2, g) agregados y partículas individuales de PLL-AgNPs en lisosomas y h) CTAB-AgNPs encontrado en lisosomas [92].

A lo largo de esta sección hemos observado diversas técnicas para determinar la citotoxicidad. No obstante, existen metodologías más específicas para poder determinar algún mecanismo en alguna zona de la célula, sin embargo, son muy costosas y en ocasiones es complicada su disponibilidad, aunque, no por ello la investigación se debe de limitar. En manera de resumen, es importante mencionar que los resultados de toxicidad dependen de la forma, estructura y tamaño de nanopartículas, aglomeración, carga eléctrica, así como el método de síntesis por las cuales fueron elaboradas; por lo tanto, cada uno de los resultados anteriores siempre serán distintos a otros, debido a que cada grupo de AgNPs depende de una gran cantidad de aspectos o variaciones, pese a que siempre habrá un comportamiento general que puede ser relacionado. Por esta razón, el estudio de la evaluación de las AgNPs sintetizadas por la planta *Lavandula angustifolia* explora un nuevo conocimiento en el área ciencia básica y posiblemente en la tecnológica.

CAPITULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo veremos paso a paso el procedimiento experimental de la presente investigación. A continuación, la figura 3.1 describe de manera general las principales etapas del proceso que consisten, primeramente, en la adquisición de la planta *Lavandula angustifolia* en un mercado local de la ciudad de Morelia, México, así como la preparación de las sales precursoras y nucleantes. Posteriormente, se realizaron los análisis fitoquímicos y bromatológicos de la planta. Una vez preparadas las materias primas de trabajo, se realizó la síntesis de los nanomateriales con las diferentes estrategias planteadas y éstas se caracterizaron por las diferentes técnicas estructurales y espectroscópicas. Finalmente, se evaluaron los nanomateriales sintetizados en levaduras del género *Saccharomyces Cerevisiae* y *kluveromyces marxianus*.

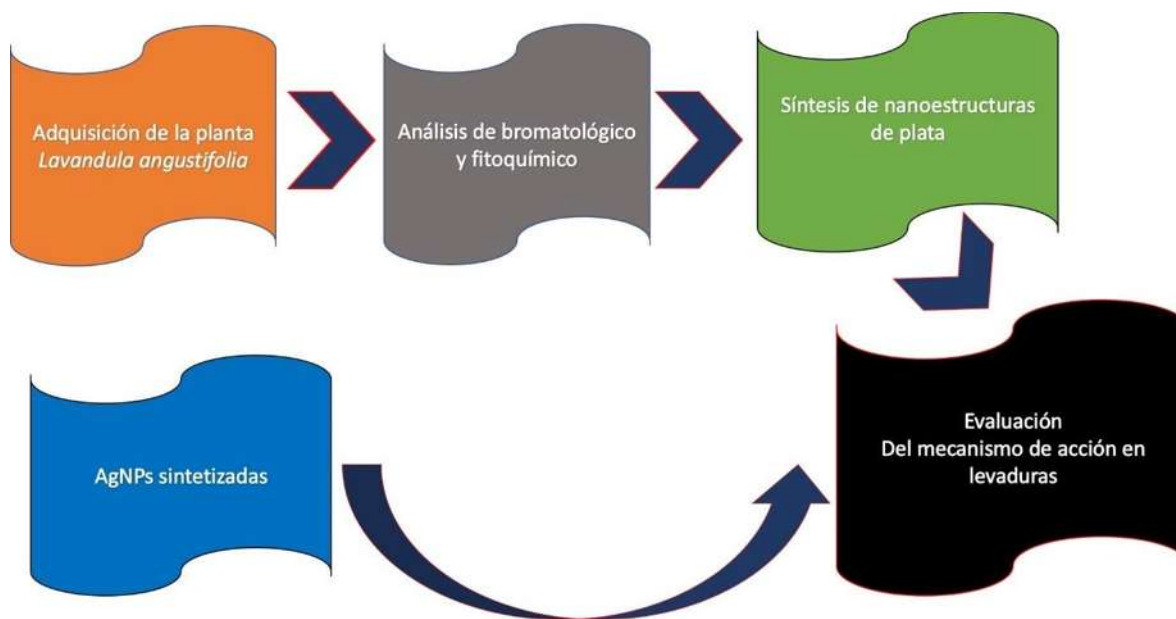


Figura 3. 1 Estrategia general del procedimiento experimental.

3.1 Molienda de la planta *Lavandula angustifolia*

Una vez adquirida la planta de un mercado local de la ciudad de Morelia, México, se sometieron tanto el tallo como la hoja a un proceso de molienda mecánica hasta formar

polvos finos homogéneos, sin un tamaño de partícula específico. El propósito de la molienda es incrementar el área superficial de contacto del polvo con el solvente, para permitir una mejor extracción de las sustancias contenidas en la planta.

3.1.1 Preparación de la infusión

Se pesaron 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 g de la planta molida con anterioridad para ser colocados en vasos de precipitados con 100 ml de agua desionizada. Posteriormente, las soluciones fueron cubiertas con papel aluminio, y se colocaron en un termoagitador (Termo Scientific) para extraer los compuestos provenientes de la planta mediante una infusión a una temperatura de 60 °C, agitación constante por un tiempo de 20 min. Finalmente, el extracto preparado se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 4 con tamaño de poro comprendido entre 20-25 µm. Una alternativa en la preparación del extracto se realizó mediante la variación de la temperatura, la cual cambió desde 60 °C hasta temperatura ambiente, conservando el tiempo y agitación constante. Sin embargo, las mejores condiciones se presentaron para la temperatura de 60 °C, indicada al principio del párrafo.

3.2 Análisis bromatológico y fitoquímico

A continuación, se presentan diferentes ensayos que nos permiten hacer un análisis cualitativo de ciertos compuestos presentes en la planta *Lavandula angustifolia*. La interpretación de los resultados es por medio de dos criterios, siendo estos positivo o negativo. Por lo tanto, estas pruebas fungen solo como indicadores de la presencia de determinados compuestos tales como esteroides, etilénicos, acetilénicos, saponinas, benzopirona (flavonoides), taninos, compuestos aromáticos, monosacáridos, nafto y antraquinonas. Las metodologías planteadas para el desarrollo de este trabajo se describen enseguida:

1. **Prueba de permanganato de potasio:** Se adicionó 0.1 g de la planta en 2 ml de agua desionizada, y se añadió una solución de KMnO_4 al 2% gota a gota con agitación, hasta la desaparición del color púrpura del KMnO_4 . La prueba es positiva con la decoloración del permanganato para compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos.

2. **Prueba de espuma:** Se colocó 1 ml de la planta en un tubo de ensaye para añadirle agua caliente. Se agitó la solución hasta identificar la posible formación de espuma, en donde si ésta es estable, indica la presencia de saponinas (prueba positiva).
3. **Prueba Shinoda:** Esta prueba sirve para indicar núcleos benzopirona (flavonoides). Se empleó 1 mg de la infusión de planta con 0.5 ml de HCl al 10%. Inmediatamente, se añadió limadura de Mg para producir una reacción exotérmica mostrando una tonalidad roja (pálido-oscuro) si la prueba es positiva.
4. **Prueba de cloruro férrico:** Consistió en poner en contacto unas gotas de FeCl_3 al 20% con unos cuantos mg de la muestra del extracto de planta. La prueba es positiva para taninos si aparece un precipitado de un tono azul-verdoso.
5. **Prueba de Mayer para alcaloides:** Se preparó el reactivo disolviendo por separado 1.36 g de HgCl_2 y 5 g de KI en 60 ml y 10 ml, respectivamente. Inmediatamente, se mezclaron ambas soluciones y se aforaron a 100 ml. Se añadieron cuatro gotas del reactivo a la solución que contenía la muestra previamente acidulada con HCl diluido (se obtiene un precipitado). El criterio positivo de la prueba ocurre cuando al adicionarle el reactivo a la solución, el precipitado se disuelve.
6. **Prueba formaldehído-ácido sulfúrico:** Se preparó una solución con 30 mg de la planta en 1 ml de hexano. Se le añadieron 2 gotas del reactivo preparado al momento, el cual consistió en una gota de formalina (formaldehído al 40 %) a 1 ml de H_2SO_4 concentrado (agitando ligeramente la solución). En este caso, se debe observar el color en la capa superficial del reactivo, posterior a la adición de la planta, y el color del reactivo después de que el tubo sea agitado. Los indicativos de que la prueba es positiva para compuestos aromáticos, es la presencia de una coloración rosa, naranja, azul, verde, púrpura, que con un mayor tiempo cambiará a café o negro.
7. **Reactivo de Barfoed:** Para la preparación del reactivo, se disolvió 16.6 g de Cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2$ en 245 ml de agua desionizada y 2.4 ml de ácido acético glacial. Una vez preparado el reactivo, se tomaron 2 ml de este y se le añadieron 15 mg de extracto de la planta en un tubo de ensaye y se calentó en baño María por 3 min. La formación de un precipitado amarillo-naranja indica resultado positivo para monosacáridos.

3.2 Análisis proximal

La metodología de las pruebas descritas a continuación coincide con las realizadas por Silva y col., en conjunto de la propuesta por Susanto y col. [93, 94]. Primeramente, para la determinación de la humedad del polvo fino de la planta, éste se secó en una cápsula de aluminio de aproximadamente 2 g de muestra hasta peso constante a una temperatura comprendida entre 95-100 °C en un horno cuya presión no excediera los 100 mm Hg. La operación requirió un tiempo aproximado de 5 h y se consideró la humedad como la pérdida de peso. Para el caso de la determinación de materia mineral o cenizas, se pesaron 2 g de la muestra en un crisol de porcelana y se calcinaron durante 3 h en una mufla precalentada a 550-600 °C. Se enfrió el crisol en el desecador y se pesó rápidamente calculando el % de ceniza hasta la primera cifra decimal. Es de suma importancia mencionar, que se debe evitar abrir la mufla durante el periodo de calcinación para evitar pérdidas de la misma. Por otro lado, para la determinación de proteína cruda o nitrógeno total en forma de amonio (está prueba no determina el contenido de N en forma de nitratos o nitritos) se empleó el método Kjeldahl. Los reactivos y metodología son descritos enseguida:

- a) Ácido sulfúrico concentrado (93-95).
- b) Catalizador; mezcla de K_2SO_4 con HgO en proporción 20:1 con $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ en la misma proporción.
- c) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente al 33% (500 g NaOH en 1lt H_2O). La densidad de la solución debe ser 1.36.
- d) Zinc en gránulos
- e) Solución de ácido bórico; 40g en 1 L de H_2O .
- f) Solución aproximadamente 0.1 N de HCl, titulada con Na_2CO_3 , anhidro, usando naranja de metilo como indicador.
- g) Solución indicadora de rojo de metilo-verde de bromocresol. Mezclar 1 parte de una solución alcohólica de rojo de metilo al 0.2% con 5 partes de una solución de alcohólica de verde de bromocresol al 0.2%.

Para la digestión los pasos del proceso a seguir se describen a continuación:

- 1) Pesar de 1 a 2 g de muestra sobre una hoja de papel filtro, doblar cuidadosamente el papel e introducirlo en un matraz Kjeldahl de 500 ml.

- 2) Añadir 6 g de catalizador.
- 3) Adicionar 20 ml de H₂SO₄ concentrado.
- 4) Calentar en el digestor, primeramente, a temperatura moderada (80°C) hasta que la formación de espuma cese y después a modo de mantener una ebullición activa hasta que la solución se clarifique. Continuar por 15 min más después de alcanzar este punto.
- 5) Dejar enfriar y añadir aproximadamente 200 ml de agua con agitación constante.

El proceso a seguir es la destilación:

- 1) Colocar 75 ml de solución de ácido bórico en un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 500 ml marcado a 225 ml. Añadir 2 o 3 gotas de indicador. Asegurarse de que la punta del condensador se encuentre bajo la superficie del líquido en el Erlenmeyer.
- 2) Introducir unos 8 o 10 gránulos de Zn al matraz Kjeldahl.
- 3) Sosteniendo el matraz Kjeldahl en posición inclinada, añadir cuidadosamente una mezcla de 100 ml de solución de NaOH al 33%, a modo que resbale por las paredes y se formen dos capas.
- 4) Conectar inmediatamente al destilador, mezcla el contenido del matraz Kjeldahl mediante agitación rotatoria y calentar hasta que todo el NH₃ haya sido destilado (150 ml de destilado son generalmente suficientes).
- 5) Bajar el matraz Erlenmeyer de manera que el extremo del condensador quede fuera de la solución de ácido bórico y apagar el sistema de calentamiento. Enjuagar con agua destilada la punta del condensador.

El último paso del proceso es realizar una titulación:

Titular con una solución 0.1 N de ácido clorhídrico el contenido del matraz Erlenmeyer hasta el cambio de color del indicador (debe titularse inmediatamente). Los cálculos para determinar el porcentaje de nitrógeno o proteína cruda utilizaron la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 3. 1} \quad \%N = \frac{(\text{ml de ácido} \times \text{normalidad del ácido}) \times (1.40)}{(\text{peso de la muestra en gramos})}$$

$$\text{Ec. 3. 2} \quad \% \text{ Proteína calculada} = \%N \times 6.25$$

En el caso de la determinación de extracto etéreo o grasa cruda, se cuantificaron las sustancias extraíbles en éter etílico. El procedimiento de manera general consistió en extraer en un aparato Soxhlet aproximadamente 2 g de muestra seca con el solvente en un dedal de papel filtro que permitió el paso rápido del disolvente. El tiempo de extracción es variable (4-16 h), dependiendo de la velocidad de condensación, 5-6 gotas o 2-3 por segundo, respectivamente. Se recuperó el éter y se evaporó el disolvente residual sobre baño María en un lugar ventilado. Se secó el residuo a 100 °C durante 30 min, se enfrió y pesó.

El proceso de fibra cruda se realizó por el método de filtrado con fibras cerámicas. Este análisis determina la fibra común como la pérdida por calcinación del residuo de las digestiones ácidas y alcalinas de la muestra. Los reactivos empleados, así como la metodología paso a paso es enunciada a continuación:

- a) Solución de ácido sulfúrico 0.255 N (1.25 g de N_2SO_4 /100 ml de agua).
- b) Solución de hidróxido de sodio 0.313 N (1.25 g de NaOH/100 ml de agua libre de Na_2CO_3).
- c) Fibra cerámica preparada. Se colocaron 60 g de fibra cerámica (Cat. No. 1740 M Lab. Safety Supply) en un vaso de licuadora y se le agregaron 800 ml de agua y se mezcló por 2 min a baja velocidad.
- d) Alcohol etílico al 95%
- e) Antiespumante (Antiespumante A de Dow Corning diluido 1:4 con éter de petróleo que a su vez también esta diluido 1:4 con agua).
- f) Fragmentos de porcelana como cuerpos para regular la ebullición.

Los aparatos empleados para esta prueba, son los mismos que para el análisis anterior los cuales son:

- 1) Aparato digestor con vasos de Berzelius de 600 ml. (Labconco Corp.)
- 2) Crisoles de porcelana de 70 x 15 mm de 30 ml.
- 3) Desecador con material desecante.
- 4) Aparato para filtración con embudos Büchner cubiertos con criba No. 200 tipo 304 de acero inoxidable tipo California (Labconco Corp.)
- e) Aparato para succión de matraces en línea con embudos, con una válvula para detener la succión.

f) Aparatos de calentamiento automático para ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y agua. El procedimiento requiere tener la muestra totalmente molida en polvo fino, posteriormente para la digestión ácida se realizarán los siguientes pasos:

1) Pesar 2 gramos de muestra seca y desengrasada con éter etílico y transferirla a un vaso de 600 ml.

2) Agregar de 1.5 a 2 g en peso seco de fibra cerámica preparada (20-26 ml), 200 ml de ácido sulfúrico 1.25% hirviendo y 1 gota de antiespumante. También se le agregaron algunos pocos gránulos para regular la ebullición. Colocar el vaso inmediatamente en el digestor precalentado y hervir exactamente por 30 min., rotando el vaso cada 10 min a manera de mantener las partículas sólidas dentro de la solución.

3) Filtrar el contenido a través de una capa delgada de cerámica en un crisol Gooch y lavar con 4 porciones de agua hirviendo de 50 ml cada uno. Cuidadosamente se evitó que la capa de fibra cerámica no se secase antes de pasar todo el contenido restante a un vaso para la digestión alcalina.

Seguidamente de la digestión ácida, se procedió a realizar la digestión alcalina, para lo cual una vez transferido el residuo al vaso incluyendo la cubierta de fibra cerámica de la filtración anterior, se le añadieron 200 ml de la solución de NaOH 1.25% hirviendo y se colocó en una estufa a hervir por 30 min. La filtración, se realizó como el paso descrito con anterioridad en la digestión ácida e inmediatamente se lavó con una porción de 25 ml de H₂SO₄ 1.25% con tres porciones de 50 ml de agua y 25 ml de alcohol. Se secó el residuo y se transfirió a un crisol de porcelana. Después, se secó en crisol con su contenido a 130 °C por 2 horas. Posteriormente, se enfrió en un desecador y se pesó. Finalmente, se calcinó a 600 °C por 30 min y se enfrió nuevamente en desecador para ser pesado (balanza analítica de precisión +/- 5 mg). Las fórmulas para los cálculos del % de fibra cruda se muestran a continuación:

% fibra cruda en la muestra seca y desengrasada = C

$$\text{Ec. 3. 3} \quad C = \frac{(\text{Peso del crisol con residuo seco} - \text{Peso después de la calcinación}) \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\text{Ec. 3. 4} \quad \% \text{ FC} = (C)(100 - \% \text{ humedad} - \% \text{ grasa cruda})/100$$

Una vez obtenidos los cálculos de los procesos anteriores, se obtuvo el extracto libre de nitrógeno (ELN) con la Ec. 3.5.

$$\text{Ec. 3.5} \quad \% \text{ELN} = 100 - (\%H + \%M.M. + \%P.C. + \%E.E. + \%F.C.)$$

Donde:

% H= % Humedad

% M.M.= % Materia Mineral

% P.C. = % Proteína Cruda

% E.E = % Extracto Etéreo

% F.C. = % Fibra cruda

3.3 Síntesis de nanoestructuras de plata

Primeramente, se preparó la sal precursora AgNO_3 con una pureza del 98 % de la marca Sigma-Aldrich en agua desionizada a distintas concentraciones molares. Para el caso de los agentes nucleantes el procedimiento de preparación fue similar. Los agentes nucleantes que se propusieron en el presente trabajo fueron: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ de la marca Sigma Aldrich con pureza superior al 98 % de las sales de cobre.

Como primer ensayo de formación, se empleó el extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia* a una concentración final de 0.01 g/ml a temperatura ambiente. Primeramente, se adicionó cada uno de los agentes nucleantes hasta una concentración final de 5 mM. Después de 24 h, se tomaron 8 ml de la mezcla formada (sal de cobre con extracto) para combinarla con 8 ml de la sal precursora AgNO_3 a una concentración de 10 mM, con el objetivo de formar una relación volumétrica 1:1 entre ambas soluciones. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, sin la presencia de agitación. Posterior al cambio de color, la muestra se sometió a centrifugado a 12 000 rpm por un tiempo de 30 min en una microcentrífuga (Premiere) con un rango de operación comprendido entre 1000-12000 rpm. El proceso anterior se realizó por duplicado e inmediatamente se analizó por medio de la espectroscopia UV-Vis. Cabe destacar, que el análisis también se efectuó con una solución sin centrifugar, así como los sobrenadantes resultantes de la separación. Las concentraciones al final del ensayo fueron de 0.005 g/ml para el extracto de la planta, 2.5 mM de los agentes nucleantes y 5 mM de la sal precursora AgNO_3 .

Es importante mencionar que la concentración del extracto, sal precursora y agentes nucleantes se variaron de acuerdo al comportamiento observado en la síntesis inicial. Por esta razón, en la sección de resultados se presentaron solo aquellos parámetros que resultaron significativos en el proceso de síntesis. Sin embargo, a continuación, se enuncia de manera resumida los parámetros iniciales que fueron sujetos a modificación. Es importante mencionar, que solo una de las variables se modificó para cada uno de los ensayos, como consecuencia, las demás se mantuvieron fijas.

3.3.1 Variación de la concentración del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*

Las condiciones iniciales fueron los parámetros mencionados con anterioridad y a partir de ello se realizaron las variaciones correspondientes al extracto de la planta, mientras que las demás relaciones se mantuvieron fijas para el caso de los agentes nucleantes (2.5 mM) y sal precursora (5 mM). Por lo tanto, se consideraron como variables las concentraciones finales del extracto de la planta (0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 g/ml).

3.3.2 Variación de la concentración de la sal precursora

En este caso se mantuvieron fijas las relaciones finales del extracto de la planta (0.005 g/ml) y agentes nucleantes (2.5 mM). En consecuencia, se trabajó un rango de concentración final comprendido entre 1-10 mM. Después del análisis mediante espectroscopia UV-Vis y MEB se eligió el mejor resultado para su caracterización completa.

3.3.3 Variación del agente nucleante

Las relaciones se mantuvieron fijas para una concentración de la planta de 0.005 g/ml y sal precursora de 5 mM. Por ello, las variaciones de los agentes nucleantes fueron para un rango comprendido entre 1-5 mM. Del mismo modo que las muestras anteriores, se eligió el mejor resultado.

3.4 Resonancia magnética nuclear

3.4.1 Identificación de compuestos mayoritarios

Se realizó RMN con el objetivo de identificar los posibles compuestos involucrados en el proceso de formación de nanoestructuras de Ag. Primeramente, se analizó el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, sin ser sometido a un proceso de reacción. La técnica empleada consistió en la preparación de la infusión de la manera descrita con anterioridad. Posteriormente, la infusión se secó mediante un horno de secado a una temperatura de 60 °C, hasta obtener polvos. Para el caso de la muestra que contuvo la reacción de nanoestructuras de plata, se realizó la separación del material asistido por un doble proceso de centrifugación a 12 000 rpm por 20 min. Se monitoreó por espectroscopía UV-Vis, que la purificación fuera la indicada. El objetivo de separar la Ag metálica es para evitar que ésta interfiera con los campos magnéticos del equipo. El proceso de obtención de polvos fue similar al realizado para la infusión de la planta. Finalmente, ambas muestras se analizaron empleando como solvente de los polvos agua deuterada (D₂O).

3.5 Extracción de los compuestos principales de la planta *Lavandula angustifolia*

3.5.1 Maceración de la planta *Lavandula angustifolia*

Se molieron 100 g de la planta seca *Lavandula angustifolia* y se colocaron en un frasco para realizar maceraciones sucesivas con MeOH por 24 h. Posteriormente, el macerado se filtró en un rotavapor a presión reducida y se obtuvo el extracto total en forma de miel color café. El producto obtenido se analizó mediante RMN de ¹H para determinar la abundancia y naturaleza de los componentes. Posteriormente, con la intención de hacer extracciones selectivas, al extracto completamente seco se le adicionaron diferentes disolventes y se colocó en agitación, obteniéndose así tres fracciones con CH₂Cl₂, Acetona y MeOH, los cuales se analizaron con RMN de ¹H.

3.5.2 Separación de los compuestos principales de la planta *Lavandula angustifolia*

La fracción obtenida con MeOH se sometió a purificación en columna cromatográfica de 4 cm de diámetro, usando gel de sílice (230-400 mesh) como fase estacionaria (5 in de altura),

como fase móvil, se eluyó primeramente con 50 ml de CH₂Cl₂ y posteriormente se aumentó la polaridad usando sistemas 9:1 y 8:2 de CH₂Cl₂-MeOH. Las fracciones obtenidas se monitorearon con cromatografía de capa fina y se analizaron por RMN de ¹H.

La cromatografía en capa fina mostró la presencia principal de dos compuestos mayoritarios. Por esta razón, aquellas fracciones que contuvieron alguna proporción de los compuestos se mezclaron y se sometieron nuevamente a purificación en una columna cromatográfica abierta (condiciones mencionadas anteriormente). La elución de la muestra comenzó con la polaridad 9:1 de CH₂Cl₂-MeOH y se aumentó a 8:2. Finalmente, las fracciones se monitorearon con cromatografía de capa fina y se analizaron por RMN de ¹H.

3.6 Estimación de la concentración de las nanoestructuras de plata por medio de espectroscopia de absorción atómica.

Se empleó un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer modelo 3100) con la finalidad de conocer la concentración y el rendimiento porcentual de la reacción de síntesis de los nanomateriales. El primer paso consistió en la obtención de una curva patrón a partir de un estándar de plata de la marca Perkin Elmer grado puro. Posteriormente, las muestras fueron lavadas por un proceso de centrifugación, hasta la obtención del sobrenadante (solución donde se encuentran los iones de Ag sin reaccionar). Finalmente, se analizaron los valores de absorbencia de éstos. Mediante la curva patrón se les asignó un valor en concentración; por lo tanto, la diferencia entre los iones de Ag iniciales y los restantes en las soluciones lavadas resulta ser proporcional a la cantidad de iones reducidos a sólidos de plata. El rendimiento porcentual se calculó por medio de la (Ec. 3.8):

$$\text{Ec. 3. 6} \quad \% \text{ de Rendimiento} = \frac{A_{\text{gsal}} - A_{\text{gsobrenadante}}}{A_{\text{gsal}}} * 100$$

En donde *A_{gsal}* representa la cantidad de iones de plata presentes en la solución inicial de la sal precursora AgNO₃, mientras que *A_{gsobrenadante}* corresponde a los sobrenadantes.

3.5 Caracterización de los nanomateriales

Las diferentes técnicas estructurales empleadas fueron: MEB, DRX, MET y además las espectroscópicas de: UV-Vis e infrarrojo.

Se confirmó por medio de espectroscopia UV-Vis la síntesis de los nanomateriales, observando el comportamiento de las variables presentadas en los objetivos. Cada espectro fue calibrado a partir de una sustancia de referencia (agua desionizada y extracto de la planta *Lavandula angustifolia*), con el objetivo de garantizar que las muestras espectrales del estudio no sean alteradas por el medio de dispersión. Los análisis fueron obtenidos con un equipo Perkin Elmer Lambda 25.

La espectroscopia de infrarrojo proporcionó información de los grupos funcionales involucrados en la síntesis de los nanomateriales, ya que, se ha reportado que la reducción y estabilización se debe a compuestos aromáticos, fenoles, carbohidratos y flavonoides. La información específica de los compuestos y grupos funcionales es completada con los datos arrojados por la técnica RMN (descrita en la sección anterior).

Primeramente, se secaron las soluciones que contuvieron el extracto puro de la planta *Lavandula angustifolia* y posteriormente las que contienen los nanomateriales. Se elaboraron pastillas compactas de las muestras con la sal KBr para espectrofotometría de infrarrojo de la marca Sigma-Aldrich. Las muestras fueron estudiadas en el equipo Bruker Tensor 27

Con ayuda de la técnica MEB a través del equipo Jeol JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope se observó el tamaño y dispersión de los nanomateriales. Además, se realizó el análisis químico puntual (EDS) y mapeo químico para identificar la presencia del elemento de interés, siendo Ag para este trabajo. La preparación se efectuó colocando una gota de las soluciones en una cinta de carbono, para evitar el desprendimiento de las partículas.

A través de un equipo de difracción de rayos X D8 Advance, DAVINCI se determinó la estructura cristalina de los nanomateriales sintetizados. Las muestras se colocaron en un horno de secado a 45 °C hasta obtener polvos, para ser caracterizados por medio de la técnica instrumental DRX. Se colocaron en un portamuestra de vidrio esmerilado los polvos que contuvieron las materias primas y nanomateriales, analizándolos en un rango angular comprendido entre 20-85 ° empleando un tiempo de 0.6 s y un incremento de 0.02 °.

Finalmente, se empleó MET por su gran capacidad de resolución, ya que, esta técnica permite observar imágenes que reflejan claramente la morfología, tamaño y estructura de los

nanomateriales. Se prepararon las muestras mediante la adición de una gota de las soluciones líquidas en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro cubiertas con una película de carbón amorfo, posteriormente, se secó la gota y se analizaron a través de diferentes técnicas como fueron: imágenes de campo claro, campo oscuro, alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés), por contraste de masa (HAADF, por sus siglas en inglés) en un equipo Phillips Tecnai F20. Además, como complemento, se realizó análisis químico puntual y mapeo químico elemental en un microscopio electrónico de transmisión con corrección por aberración Cs de la marca JEM-ARM200F, Atomic Resolution Analytical Microscope.

3.7 Ensayos de toxicidad en levaduras

Las cepas de levaduras fueron obtenidas del laboratorio de Bioquímica por parte del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIBQ) de la UMSNH. Los géneros sujetos a estudio son *Saccharomyces cerevisiae* W303 y MC4, en conjunto de *Kluyveromyces marxianus* OFF1 y SLP1. La diferencia entre cepas es que algunos géneros presentan mayor termotolerancia en comparación de las otras. La metodología descrita a continuación es una modificación de la propuesta por Barajas y col. [95, 96] en diferentes estudios de comparación de la termotolerancia entre levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* y *kluyveromyces marxianus*.

3.7.1 Cultivo de las cepas de levaduras

El crecimiento de la levadura se estudió empleando medios YPD que contuvieron 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa como fuente de carbono. Las células se cultivaron a 30°C y se agitaron a 180 rpm durante 24 h. Finalmente, las células se recogieron mediante centrifugación y se diluyeron hasta una concentración de 1 g/ml.

3.7.2 Ensayo de crecimiento celular

En tubos falcón de 15 ml se adicionaron 10 ml del medio de cultivo YPD, 1 ml de glucosa al 20 % y 200 µl del preinóculo de cada una de las cepas enunciadas con anterioridad, con las soluciones que contuvieron los nanomateriales a evaluar a las diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 ppm). Estas mezclas se llevarán a una incubadora por un periodo de 24 h a una temperatura de 27° C y una velocidad de agitación de 110 rpm para su crecimiento. Posteriormente, se determinó la densidad óptica a una longitud de onda de 625 nm de cada

una de las muestras utilizando como control las levaduras sin tratamiento. Adicionalmente, se evaluó el efecto de los iones de Ag a las mismas concentraciones de nanomateriales, así como el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* a la concentración final de la reacción.

El crecimiento celular se calculó de acuerdo a la Ec. 3.9.

$$\text{Ec. 3. 7} \quad \% \text{ Crecimiento} = 100 * \frac{\text{Densidad óptica de las células tratadas}}{\text{Densidad óptica de las células control}}$$

3.7.3 *Ensayo viabilidad celular*

Este ensayo se realizó posterior a la lectura de la densidad óptica del crecimiento celular mediante el método de viabilidad MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio), donde el reactivo fue preparado en etanol a una concentración de 5 mg/ml.

Se mezclaron 3 ml de las cepas con soluciones que contuvieron los nanomateriales, extracto de planta y la sal precursora AgNO₃, en 1 ml de la solución de MTT para llevarse a incubación por un periodo de 60 min en la oscuridad para posteriormente determinar la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm. El cálculo de la viabilidad fue realizado de acuerdo a la Ec. 3.10, en donde el principal indicativo fue un cambio de coloración de la solución que va del amarillo pálido al morado, causante de la oxido-reducción del MTT a formazán.

$$\text{Ec. 3. 8} \quad \% \text{Viabilidad} = 100 * \frac{\text{Densidad óptica de las células tratadas}}{\text{Densidad óptica de las células control}}$$

3.7.4 *Exclusión mediante azul de Tripano*

Como complemento, para algunas muestras se realizó el ensayo de toxicidad de exclusión mediante el azul de tripano. Para este ensayo, primeramente, se prepararon los medios, material y reactivos los cuales fueron H₂O desionizada, PBS, dextrosa al 20 %, puntas de micropipetas para posteriormente ser esterilizadas.

Para el inicio de la prueba, se realizó un preinóculo en medio líquido a partir de una pequeña porción la cepa *Saccharomyces cerevisiae* conservada en una caja Petri en medio sólido. El medio líquido en la cual se insertó la porción de la cepa contenía 10 ml de medio líquido el cual estaba distribuido en 9 ml de medio YPD y 1 ml de dextrosa. Posteriormente, el preinóculo se incubó a las condiciones mencionadas con anterioridad en el apartado 3.7.1 referente al cultivo de cepas.

Para la preparación de los inóculos, se mezclaron 500 μ l del preinóculo a cada tubo muestra con medio líquido respetando la relación anterior de medio YPD con dextrosa. En este caso, las levaduras se dejaron en incubación por un periodo de 20 h, en donde pasado ese tiempo, se adicionaron los diferentes materiales a evaluar en un volumen de 500 μ l. El objetivo de evaluar en esas horas, se debe a que la fase de crecimiento celular es la estacionaria, es decir, donde hay mayor presencia de levaduras. Por lo tanto, el volumen final de la muestra quedó de 11 ml el cual se distribuye de la siguiente manera: 9 ml de medio YPD, 1 ml de dextrosa, 500 μ l del preinóculo y 500 μ l del material dispersado en H₂O desionizada. Los materiales se evaluaron en presencia de los microorganismos por 1 h. Por ello, el tiempo total de crecimiento de las levaduras hasta su observación fue de 21 h.

Después, las muestras sujetas a estudio fueran lavadas en medio PBS durante 3 ciclos, en el cual el primer ciclo consistió en eliminar el medio y los últimos dos en estrictamente lavados. Es importante mencionar, que el precipitado de cada lavado se suspendió en 3 ml de PBS. Solamente, el último lavado se dispersó en 1 ml de PBS, esto con el objetivo de obtener la muestra stock que fue observada en microscopio óptico.

Para el estudio mediante en microscopio óptico, las levaduras fueron preparadas de la siguiente manera:

1. **Solución 1:** Se mezclaron 50 μ l de la muestra de levaduras con 50 μ l del colorante azul de tripano.
2. **Solución 2:** Se tomaron 50 μ l de la mezcla anterior para añadirlos a 450 μ l de PBS.
3. Finalmente, se combinarán 50 μ l de la solución 2 con 50 μ l de la solución 1, con el objetivo de no perder coloración.

3.8 Evaluación antibacterial de las nanoestructuras de Ag

La actividad antibacterial de las nanoestructuras obtenidas fue determinada por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) modificado de acuerdo a lo reportado por Morales y col [97]. Las cepas sujetas a estudio fueron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, las cuales se encontraban liofilizadas y se cultivaron en caldo Mueller-Hinton. Posteriormente, se preparó el inóculo y se tomó con el asa bacteriológica las cepas previamente cultivadas y se colocaron en un tubo con solución salina (0.85%) ajustándose el inóculo a 0.5 unidades (10⁸ cel/ml) según la escala de Mc Farland, verificándose con la absorbancia a 580 nm cercana al 25%. Después, se tomaron discos de papel filtro y fueron sumergidos en cada una de las soluciones a evaluar por un tiempo de 30 min. Los discos fueron colocados en las cajas de Petri las cuales contenían agar Mueller-Hinton con los inóculos de las diferentes cepas. Es importante mencionar que las soluciones a evaluar fueron AgNPs, AgNWs, extracto de la planta *Lavandula angustifolia* como control negativo y la sal AgNO₃ en solución acuosa como control positivo. Finalmente se compararon los halos de inhibición después de un tiempo de incubación de 24 h a 37 °C.

Como complemento se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de acuerdo a los resultados obtenidos del ensayo de difusión de disco [98]. Para ello, se incubaron tubos de ensayo por 24 h y 37 °C que contenían una solución con volumen final de 3 ml de caldo Mueller-Hinton, inóculo de las cepas y nanomateriales. Posteriormente, se observó la turbidez de la solución, en la cual, a mayor claridad de la solución, el efecto antibacterial era mayor. Finalmente, una gota de las muestras más claras fue colocada en caja de Petri con agar Mueller-Hinton, en donde, si no era observado crecimiento bacteriano, significa que corresponde a la MIC.

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en la síntesis verde de diversas nanoestructuras de Ag. Primeramente, hablaremos de la planta y sus características fitoquímicas. También, observaremos el criterio de cambio de coloración como indicativo de formación de entidades nanométricas. Posteriormente hablaremos e identificaremos las diferentes nanoestructuras de Ag obtenidas de acuerdo a las variaciones presentadas en el apartado correspondiente a la metodología experimental. Por ello, en el proceso de caracterización se incluyen técnicas espectroscópicas y estructurales. Como complemento, se presentarán los ensayos de la elucidación de los compuestos prioritarios en la planta *Lavandula angustifolia*. Finalmente, se presentará la evaluación de los nanomateriales en modelos celulares eucariotas y su actividad antimicrobiana en bacterias.

4.1 Análisis proximal e identificación de metabolitos presentes en el extracto de la planta

Comenzaremos en este punto con lo relacionado a los compuestos presentes en la planta *Lavandula angustifolia* mediante la identificación de metabolitos secundarios, análisis bromatológico y un estudio previo a la síntesis de esta planta mediante Resonancia magnética nuclear.

4.1.1 Identificación de metabolitos

La síntesis de nanomateriales a partir de métodos verdes ha sido importante en los últimos años, no obstante, el desconocimiento de posibles mecanismos ha limitado su producción de manera industrial [99]. Por esta razón, es importante dilucidar la fitoquímica de los componentes bioactivos presentes en las plantas empleadas para la síntesis. Los compuestos que se evaluaron mediante las técnicas cualitativas son aquellos con enlaces acetilénicos, etilénicos, saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides, compuestos aromáticos y monosacáridos.

Primeramente, hablaremos de la prueba del permanganato de potasio, que se relaciona con decoloración del reactivo color púrpura. La figura 4.1a, exhibe la solución acuosa de

permanganato en conjunto con los polvos de la planta *Lavandula angustifolia*, para esta muestra se identificó que no hubo decoloración, por lo tanto, es negativa para el caso de los compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos.

Una de las pruebas más sencillas es la de espuma para identificación de saponinas. La figura 4.1b ejemplifica que es positiva para el caso de la planta de lavanda, ya que se aprecia la espuma a lo largo de un periodo constante. Esto es lógico, ya que las saponinas son glucósidos de esteroides [100], en donde el azúcar presente será la forma más soluble capaz de actuar en el mecanismo de la reacción.

Para el caso de la prueba de Shinoda se caracteriza por una reacción exotérmica con cambio de la solución de un rojo claro a oscuro, pero como se puede apreciar en la figura 4.1c, no hubo la presencia de ese cambio en la tonalidad, que refleja la prueba como negativa para compuestos con núcleo benzopirona, esencialmente flavonoides. Esto generó conflicto porque de acuerdo a estudios anteriores, la planta *Lavandula angustifolia* posee este tipo de compuestos, como es el caso de las cumarinas [101]. Sin embargo, más adelante se tratará la presencia del grupo de compuestos polifenólicos mediante técnicas más especializadas como es la resonancia magnética nuclear.

La siguiente prueba que discutiremos se denomina de cloruro férrico. Esta técnica es especial para un conjunto de polifenoles llamados taninos [100, 102], la cual se clasifica por la presencia de un precipitado azul verdoso. Es apreciable esta tonalidad en la figura 4.1d, por lo tanto, se determinó que la prueba es positiva para este ensayo.

Los alcaloides son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas a partir de los aminoácidos, por esta razón, son elementos nitrogenados. Éstos son generalmente empleados como sustancias psicotrópicas debido a su efecto sobre el sistema nervioso central. La figura 4.1e exhibe el ensayo de Mayer para identificación de alcaloides, en donde éste resulta negativo debido a la formación de un precipitado que nunca desapareció. Es importante mencionar que, aunque la planta tiene efectos sobre el sistema nervioso central por medio de su aroma, estos efectos pueden ser ocasionados por otro grupo de compuestos con la misma capacidad, como son los terpenos [103].

La prueba de formaldehído-ácido sulfúrico es empleada para determinar de manera general compuestos aromáticos. En esta clasificación se encuentran algunos componentes terpénicos y como es demostrado mediante la formación de precipitado café en la figura 4.1f, la prueba fue positiva, coincidiendo con lo enunciado con anterioridad.

La penúltima prueba es la de Benedict para azúcares reductores, siendo éstos importantísimos, a causa de que este tipo de compuestos son el primer paso en la formación de nanoestructuras metálicas asistida de métodos verdes. La figura 4.1g manifiesta una tonalidad verdosa, denotando que la prueba fue positiva.

Finalmente, el ensayo mediante el reactivo de Barfoed nos permitió conocer si la planta *Lavandula angustifolia* posee azúcares simples (monosacáridos). Para este caso, no se apreció un cambio de color que va del azul al naranja, es por ello que se estableció que la prueba fue negativa (ver figura 4.1h).

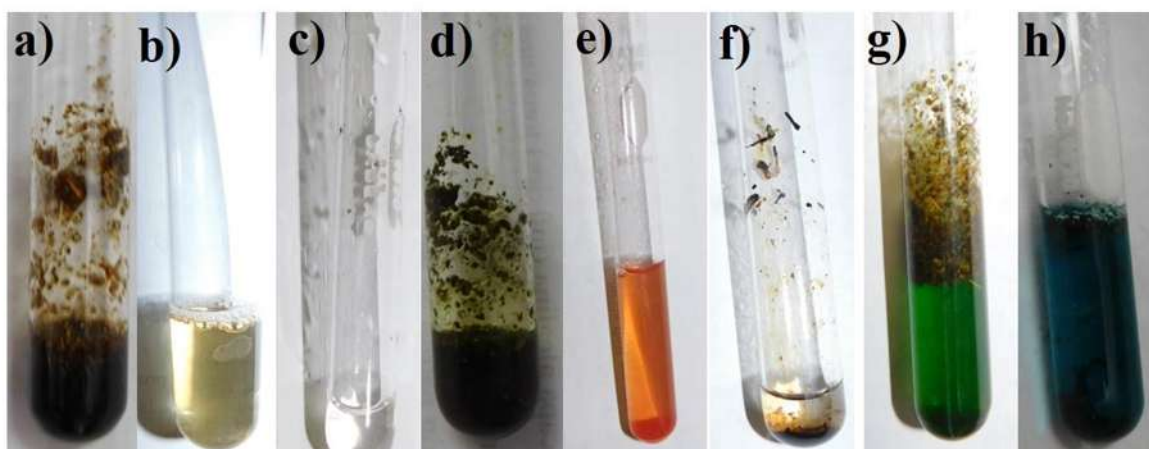


Figura 4. 1 Ensayos cualitativos de metabolitos secundarios a) enlaces etilénicos, b) saponinas, c) flavonoides, d) taninos, e) alcaloides, f) terpenos, g) azúcares reductores, h) monosacáridos.

La tabla 4.1 resume los resultados anteriores. Es fundamental aclarar que, aunque este tipo de experimentos poseen cierta aproximación de los compuestos contenidos en la planta *Lavandula angustifolia*, no es contundente el resultado, ya que para la determinación de las sustancias se emplearon una diversidad de solventes para extraer los distintos elementos [101, 104, 105], mientras que en el proceso establecido en el presente trabajo, es a través de soluciones acuosas. Por consiguiente, se esperaría que los componentes principales sean

carbohidratos, polifenoles en forma de flavonoides (flavonas, flavanonas, flavanoles, flavonoles, isoflavonas y antocianinas) o no flavonoides (estilbenos, taninos, ácidos fenólicos o cumarinas) [100, 102].

Tabla 4. 1 Identificación de metabolitos

Prueba	Metabolito identificado	Resultado
Permanganato de potasio	Compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos	Negativo
Espuma	Saponinas	Positiva
Shinoda	Flavonoides	Negativa
Cloruro férrico	Taninos	Positiva
Mayer	Alcaloides	Negativa
Formaldehido-ácido sulfúrico	Terpenos	Positiva
Benedict	Azucares reductores	Positiva
Barfoed	Monosacáridos	Negativa

4.2 Análisis proximal

Los ensayos bromatológicos son empleados de manera común para el análisis de alimentos, sin embargo, esta técnica cuantitativa facultó la dilucidación del posible mecanismo de formación en las distintas nanoestructuras de plata, es decir, que compuestos pueden estar involucrados en el proceso de nucleación y crecimiento a través de la reducción y estabilización [106]. El compilado de los análisis de la planta *Lavandula angustifolia* son presentados en la tabla 4.2, donde éstos fueron realizados en base fresca (Bf) y base seca (Bs). La primera sección corresponde al contenido de humedad y es notorio que el resultado fue similar para Bf y Bs, esto se atribuye que la materia prima en forma de polvos finos se colocó en un desecador por un tiempo de 24 h, para corroborar que el ensayo fuera correcto. El segundo ensayo denominado de materia seca es totalmente complementario al de humedad, ya que la suma de ambos ensayos debe ser el 100 % correspondiente a la materia total. Para el caso de la planta *Lavandula angustifolia* en todos sus géneros, los estudios son

mulos, esto es se debe a que este tipo de pruebas son enfocadas progresivamente a plantas con aplicación en el área de alimentos [107]. En el caso de Cabrera y col. [108] realizaron estudios bromatológicos en el nopal (*Opuntia ficus-indica*), en este caso el contenido de humedad es superior al 94 %, siendo más alto en comparación al presente estudio, en consecuencia, el contenido de materia seca es distinto. También, Loayza y col. [109] evaluaron cambio en la bromatología del cladodio, mejor conocido como penca del nopal a lo largo del tiempo, en el cual muestran un contenido de grasa muy bajo de aproximadamente un rango comprendido entre 0.11 a 0.17 %. En el caso de la planta *Lavandula angustifolia*, el resultado osciló de 1.88 al 2 %, aunque el resultado es mayor en comparación al nopal, el contenido de grasa todavía es bajo. Lo anterior, es común en el estudio de diversas plantas, ya que, es característico un bajo contenido en ellas. Por lo tanto, el resultado analizado es positivo, debido a que si se hubiera dado un alto contenido se traduciría a un efecto de arteriosclerosis y envejecimiento, ya que las plantas no requieren altas cantidades de grasas como método de obtención de energía.

El contenido de ceniza es relacionado con la cantidad de minerales. Se puede apreciar en el trabajo de Araque y col. [110] que la planta *Gliricidia sepium* posee un 8.88 % de ceniza que disminuye hasta 7.40 % a lo largo de un periodo de 12 meses. Al momento de comparar con la planta *Lavandula angustifolia* es menor, ya que para este caso es del 9.25 %. Por esta razón, la cantidad de minerales (Cl, Fe, Mg, Na y K) está directamente relacionada con la tasa de crecimiento y desarrollo de la planta.

Por parte de la proteína cruda el porcentaje resultante fue bajo para la planta *Lavandula angustifolia* (0.09 %) en comparación con los estudios mencionados con anterioridad para los vegetales de *Gliricidia sepium* [110] (28.31 %) y *Opuntia ficus-indica* (7.53 %), este resultado podría ser negativo, como consecuencia de que las proteínas están conformadas por aminoácidos que generalmente son empleados para el proceso de reducción y estabilización de AgNPs [99]. Sin embargo, éste fenómeno puede ser controlado manteniendo la planta seca sin almacenamiento, ya que en conjunto de la tasa de edad y desarrollo son los principales causantes de la disminución de proteínas.

La fibra cruda es la parte no digerible de los alimentos, donde su naturaleza química está establecida por celulosa, hemicelulosa y lignina. Para este tipo de ensayo es complicado

comparar con algún tiempo de planta, debido a que para *Lavandula angustifolia* se evaluó tanto el tallo como las hojas obteniendo un porcentaje comprendido entre 15-16 %. Sin embargo, en el caso del nopal esta cantidad es mínima [109].

Finalmente, el último ensayo fue para un grupo de compuestos importantísimos en el proceso de reducción. Aquí es destacado mencionar que la planta *Lavandula angustifolia* obtuvo un porcentaje que va del 65 % Bs al 73% Bf, que fue superior en comparación con estudios de *Opuntia ficus-indica* (5.96 %) [109].

A partir de los ensayos anteriores se comienza a dilucidar el posible mecanismo de síntesis de nanoestructuras de plata. Esto se debe a que los principales compuestos involucrados en la reducción y estabilización deben ser los carbohidratos, ya que para el caso de la planta *Lavandula angustifolia*, las proteínas no son significativas. También, aunque en los estudios es demostrada la presencia de extracto etéreo, este no debe de entrar en el proceso de formación de AgNPs a causa de que el solvente empleado en la síntesis es agua, donde las grasas no son solubles.

Tabla 4. 2 Análisis bromatológico de la planta *Lavandula angustifolia*.

Determinación	Base fresca (%)	Base seca (%)
Humedad	6	6
Materia seca	94	94
Extracto etéreo (grasa)	1.88	2
Cenizas o minerales	9.25	9.84
Proteína cruda	0.09	0.09
Fibra Cruda	15.56	16.55
Carbohidratos	73.23	65.52

4.3 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

La espectrometría RMN es generalmente empleada para estudiar mezclas de analito, para comprender efectos dinámicos como el cambio de temperatura y mecanismos de reacción [111, 112]. Por ello, se evaluó el extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia*

mediante RMN del protón ^1H con el objetivo de conocer el cambio de las señales características antes y después de la síntesis de nanoestructuras de plata. Es fundamental mencionar, que antes de conocer el mecanismo de formación de nanoalambres mediante los dos pasos planteados en la metodología, es prioridad conocer datos sobre el mecanismo de formación de nanopartículas, por ello, este primer estudio a través de RMN está basado sobre el mecanismo de reacción de AgNPs. La figura 4.2a presenta el espectro correspondiente al extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia*, en donde las señales protónicas comprendidas en el rango de 7.6 a 6 ppm son atribuidas a compuestos aromáticos del tipo de los fenoles, más específicamente al grupo de las flavonas glucosiladas. También, se identifica un pico intenso con centro en 4.7 ppm característico de los protones presentes en el agua deuterada (D_2O). En el caso del rango ubicado entre 4.2 y 3 ppm fue identificado para bases OH, donde los más comunes son los carbohidratos con carbono anómero. Finalmente, para la identificación total del espectro se muestran señales importantes entre 1.8 y 0.2 ppm que corresponden a otro tipo de azúcares de 6 carbonos como lo son la ramnosa y fucosa. La figura 4.2b ostenta las señales atribuidas al extracto posterior a la reacción de síntesis de AgNPs. Se distingue un decremento en las señales de las flavonas glucosiladas (7.6-6 ppm), en consecuencia, se puede afirmar que estos compuestos han formado parte del mecanismo de reacción. En el caso de las señales de D_2O y de azúcares demostraron no presentar cambios significativos.

Los resultados obtenidos son similares a los realizados por Rodríguez-León y col. [113] a través de RMN de protón con ^1H , los cuales demuestran que para la síntesis de AgNPs empleando la planta *Rumex hymenosepalus*, los principales compuestos involucrados en la formación de éstas son los fenoles. Otro trabajo enfocado en RMN es el realizado por Cure y col. [114], el cual es enfocado a la coordinación de ligandos de amina en AgNPs empleando RMN y SERS, en donde el primero es usado para evidenciar interacciones a corto plazo de hexadecilamida (HDA) y la superficie de la partícula, y el segundo para identificar la coordinación de la porción de amidina pegada en la superficie de las NPs. De manera general, se puede entender que dilucidar un mecanismo de reducción y estabilización es más sencillo, como consecuencia de que solo se monitorean cambios en las señales de un solo tipo de compuestos como es el HDA formando complejos de la Ag a través de los nitrógenos presentes en la molécula. Por esta razón, de acuerdo a los resultados obtenidos hasta este

apartado, se plantea el mecanismo en el cual las flavonas glucosiladas son las encargadas de reducir los iones de Ag a partir de la formación de complejos de coordinación entre la Ag y el O de estos fenoles, causando la estabilización de las AgNPs (ver figura 4.3).

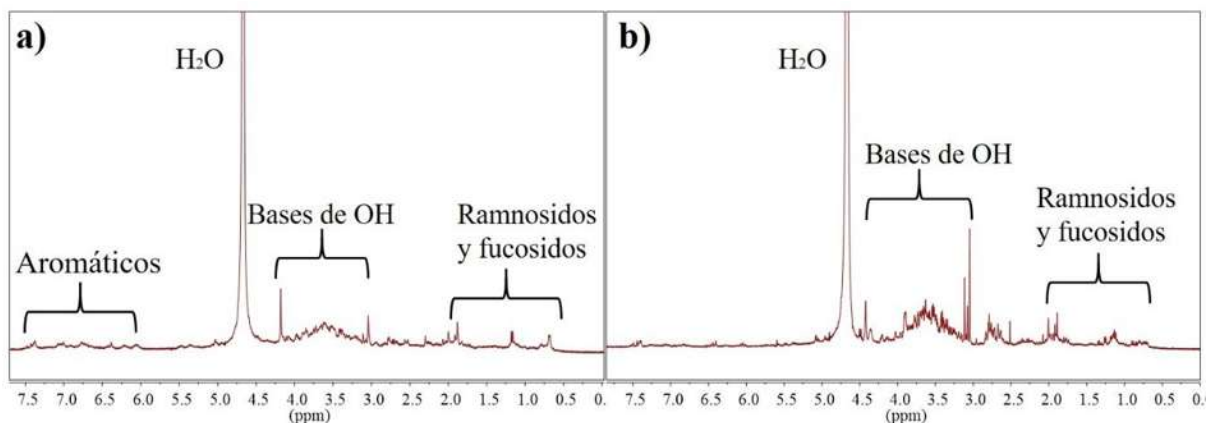


Figura 4. 2 Espectros de RMN del protón ¹H a) extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, b) remanente de la reacción.

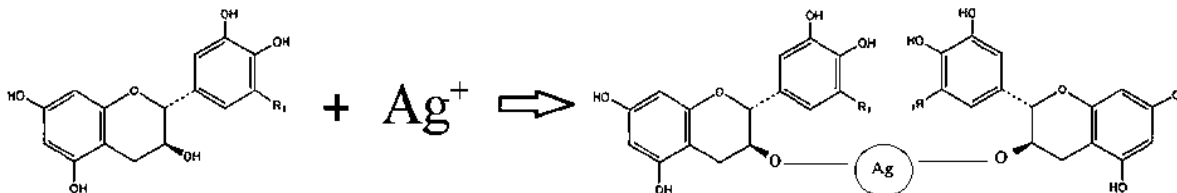


Figura 4. 3 Mecanismo de formación de AgNPs a partir de flavonoides.

4.4 Síntesis de nanopartículas de Ag a partir del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*

4.4.1 Cambio de coloración en sistemas nanométricos

Los cambios de coloración en la síntesis de nanomateriales metálicos son importantes debido a que a partir de ello podemos identificar el estado de evolución de nuestros sistemas. La secuencia del cambio de color está directamente relacionada con la reducción de los iones de Ag hasta la formación de nanoestructuras de diversas formas y tamaños [115-117]. El primer indicativo de formación de AgNPs es un cambio de coloración que va del amarillo al marrón. Sin embargo, a medida que incrementa el tiempo, las NPs formadas tienden a enlazarse,

estableciendo encadenamientos que culminan en la formación de nanoestructuras de mayor tamaño [118]. Lo anterior, es debido principalmente a la resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) [119]. La figura 4.4 ilustra la evolución del sistema en la síntesis de AgNPs empleando la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor-estabilizador, es notorio en la primera etapa el cambio mencionado con anterioridad (amarillo-marrón). No obstante, se identificó un cambio de la solución que va desde el amarillo hasta una tonalidad oscura. Este cambio se identificó con la formación de nanoestructuras 1D, de las cuales se hablará más adelante.



Figura 4. 4 Cambio de coloración de las nanoestructuras de Ag con respecto al tiempo.

4.4.2 Determinación de nanopartículas de Ag mediante espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis se empleó para evaluar el efecto del precursor (AgNO_3) sobre la síntesis de AgNPs, como se muestra en la figura 4.5. La banda de resonancia del plasmón de superficie (SPR) ubicada a 460 nm confirmó la formación de AgNPs. Es notorio, que la cantidad de AgNPs incrementó con la concentración del precursor de 1 a 7 mM, a excepción de 9 mM. Esto se debe a que se observa un comportamiento ascendente en el pico SPR para las muestras que contuvieron 1-7 mM de la sal precursora AgNO_3 . No obstante, se identificó un decremento en la absorbancia para la concentración 9 mM. Lo anterior, se atribuye a la capacidad antioxidante de la planta *Lavandula angustifolia* (concentración de 0.02 g/ml) para la reducción de AgNPs. Los mejores resultados se encontraron a 5 mM debido a la mayor intensidad y forma del máximo de la banda SPR, lo que significó tamaños de AgNPs homogéneos. Sin embargo, la capacidad estabilizadora de *Lavandula angustifolia* no es suficiente para la concentración de 9 mM, provocando la coalescencia de las AgNPs, que concluyen en la formación de estructuras de Ag fuera del tamaño nanométrico.

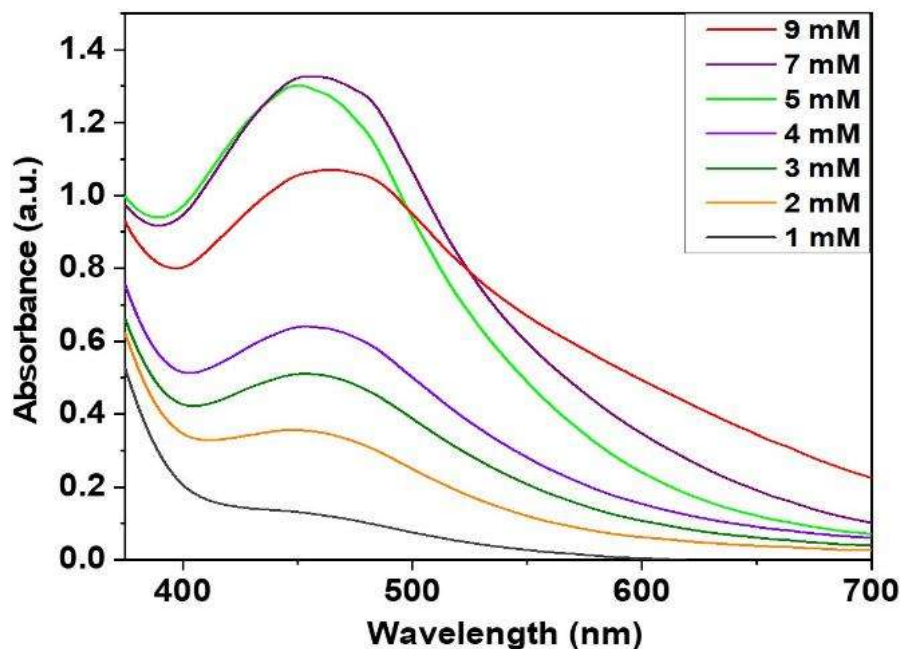


Figura 4. 5 Espectro de UV-Vis obtenido a diferentes concentraciones molares de la sal precursora AgNO_3 [120].

4.4.3 Caracterización de las AgNPs mediante MEB

Mediante MEB se identificó la distribución y tamaño del nanomaterial sintetizado. La figura 4.6 muestra un par de micrografías MEB con contraste Z que corroboran la síntesis verde de AgNPs empleando la planta *Lavandula angustifolia*. La micrografía de bajo aumento (figura 4.6a) muestra una población densa de AgNPs, mientras que la imagen de alto aumento (figura 4.6b) ilustra NPs semiesféricas y nanoplacas triangulares, con tamaños inferiores a los 100 nm. En el caso de las nanoplacas, aparecen dos orientaciones que se diferencian por las variaciones del contraste Z. Además, el análisis EDS confirma la presencia de plata reducida (recuadro figura 4.6a).

4.4.4 Análisis estructural de las AgNPs mediante DRX y MET

Se realizó un patrón de DRX después de 72 h de tiempo de reacción para confirmar la estructura cristalina de los productos, como se muestra en la figura 4.7. Los picos de difracción ubicados a 38° , 44.5° , 64.5° y 77.6° corresponden a los planos (1 1 1), (2 0 0),

(2 2 0) y (3 1 1) de la Ag fcc, (número de PDF 01-087-0720). A partir de la ecuación de Scherrer y la anchura a media altura del pico principal (FWHM, por sus siglas en inglés), el tamaño de cristalito medido fue de 20 nm. Además, aparecen picos atribuidos a los compuestos orgánicos responsables de estabilizar los AgNPs.

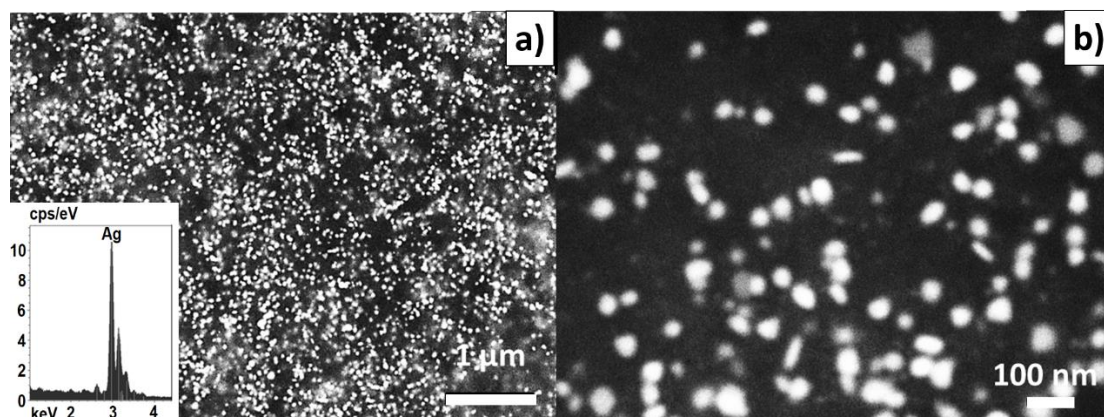


Figura 4. 6 Imágenes de MEB de las AgNPs a concentración 5 mM y su correspondiente análisis químico puntual (EDS) [120].

MET se empleó para analizar la estructura, morfología y tamaño de las AgNPs. La figura 4.8a confirmó las morfologías semiesféricas y triangulares por debajo de 100 nm, observadas con anterioridad en el análisis de MEB. Además, el histograma (figura 4.8b) a través de la medición de 250 partículas reveló que el tamaño de las NPs va desde 5 nm hasta 90 nm. Sin embargo, la frecuencia más alta se encontró entre 10 nm y 20 nm, con una media de 18 nm.

La figura 4.8c muestra una micrografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés) de las AgNPs. La presencia de planos de red en la imagen y la transformada rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés) confirmaron la naturaleza cristalina de las nanopartículas. La distancia interplanar fue de aproximadamente 0.24 nm, lo que coincide con los planos (111) de la estructura cúbica centrada en las caras de Ag. Estos hallazgos coinciden perfectamente con el análisis realizado mediante difracción de rayos X.

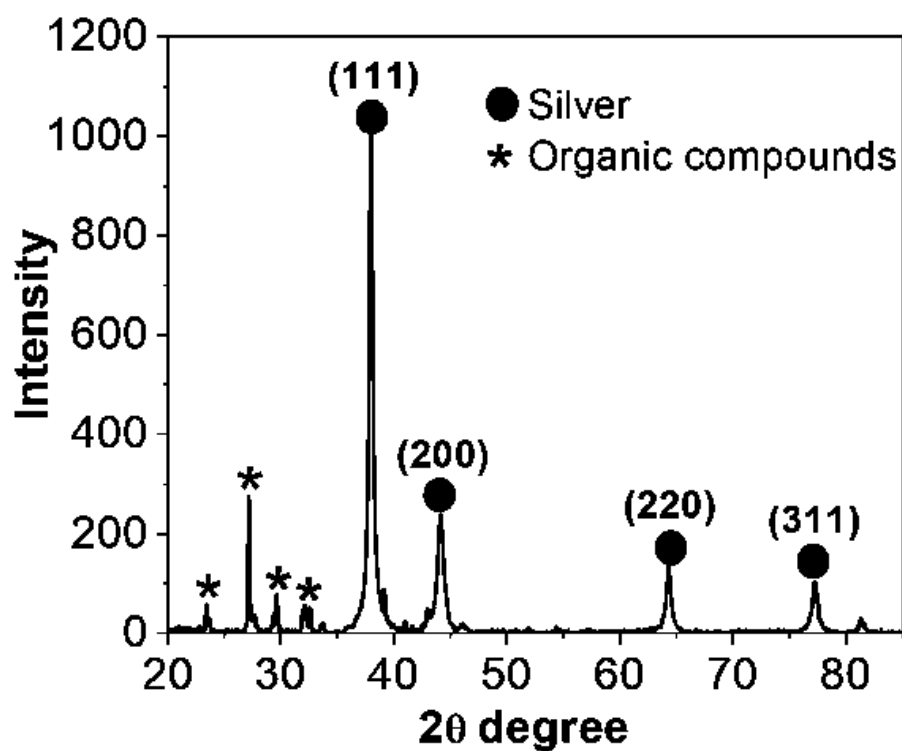


Figura 4. 7 Patrón DRX de las AgNPs a concentración 5 mM. Los ángulos y familias de planos a 38° (111), 44° (200), 64° (220), y 77° (311) corresponden a la estructura cúbica centrada en la cara (fcc) del cristal de plata [120].

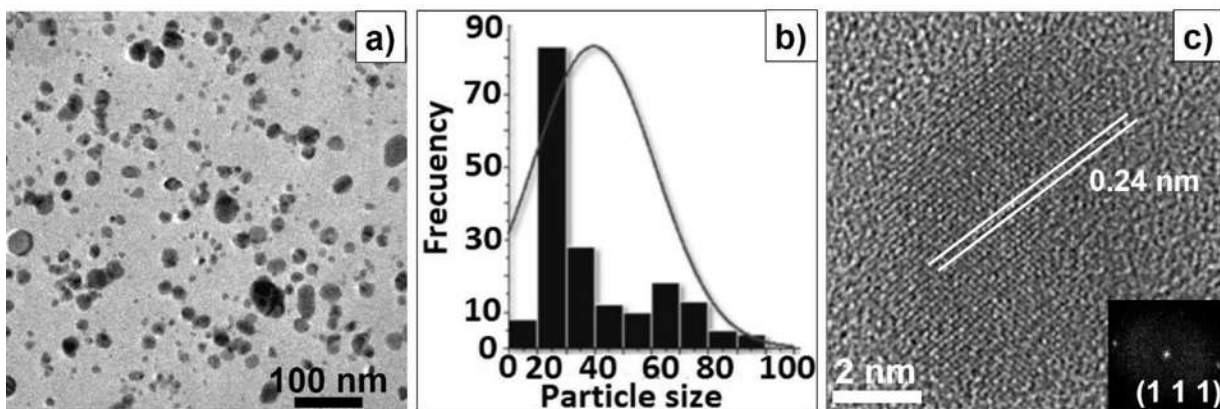


Figura 4. 8 a) Imagen de campo claro que muestra AgNPs a concentración 5 mM con morfologías esféricas y semiesféricas, b) histograma de tamaños, e c) imagen de alta resolución (HRTEM) de las AgNPs donde los planos de red son visibles e indican su naturaleza cristalina [120].

4.5 Autoensamblado de nanopartículas 0D a sistemas superiores (encadenamiento de nanopartículas)

Algunas de las ventajas de emplear métodos verdes en la síntesis de AgNPs son que las reacciones se llevan a temperatura ambiente, no usan residuos tóxicos y además son métodos sencillos. Sin embargo, el control de la dispersión y homogeneidad se complica [121]. Una de las características de los métodos verdes es que mediante la variación de algunos parámetros como lo son las concentraciones de las sales precursoras, extractos, modificación de pH y agitación se pueden obtener gran variedad de nanoestructuras con formas y tamaños debido al autoensamblaje de las NPs [122-124]. Por ello, en esta sección del trabajo comenzaremos a platicar acerca del efecto de la agitación magnética en el proceso de formación de nanoestructuras 1D, 2D y en algunos casos 3D [125-128].

Para demostrar el efecto de la agitación, se tomó la muestra estelar de 5 mM, la cual fue discutida en el apartado anterior. La diferencia radica en que el proceso de formación se realizó con una agitación magnética variable (0, 200 y 600 rpm) durante 24 h. Es importante mencionar, que se mantuvo la característica principal de los métodos verdes, la cual es realizar la reacción a temperatura ambiente. El primer indicativo de formación de nanoestructuras de plata fue un cambio de color en la solución en varias etapas, siendo este amarillo, marrón oscuro, negro y gris, respectivamente, a medida que incrementaba la agitación magnética (anexo en la figura 4.9). El cambio de coloración es debido al fenómeno SPR discutido en la sección anterior [129, 130]. La figura 4.9 muestra los espectros UV-Vis que confirman la reacción, observándose tres espectros con una longitud de onda característica entre 400-550 nm asociada a la formación de AgNPs. Además, se aprecian dos picos SPR relacionados con una segunda distribución de tamaños que desaparece al aumentar la agitación. Para la solución evaluada a 600 rpm el ancho de banda fue mayor en comparación con las demás, atribuido a la formación de nanoestructuras de plata de mayor tamaño [131].

El análisis MEB demuestra la presencia de nanoestructuras de plata en el medio de reacción (ver figura 4.10). El panel a) corresponde a la muestra sin agitación magnética reafirmando la síntesis de AgNPs. En este caso se observa la agregación de NPs en pequeñas zonas formando islas. De lo contrario, la muestra con agitación lenta (200 rpm) presentada en la

figura 4.10b ilustra la separación de las islas mejorando la distribución, se identificó que, al aumentar la agitación magnética hasta 600 rpm, el número de colisiones entre nanopartículas incrementó, provocando su coalescencia, por tal motivo, los surfactantes presentaron un reordenamiento de la estabilización inicial que se reflejó en la formación de nanoestructuras de plata 1D como varillas [132, 133]. Además, el análisis EDS confirma la presencia de plata reducida (figura 4.10d).

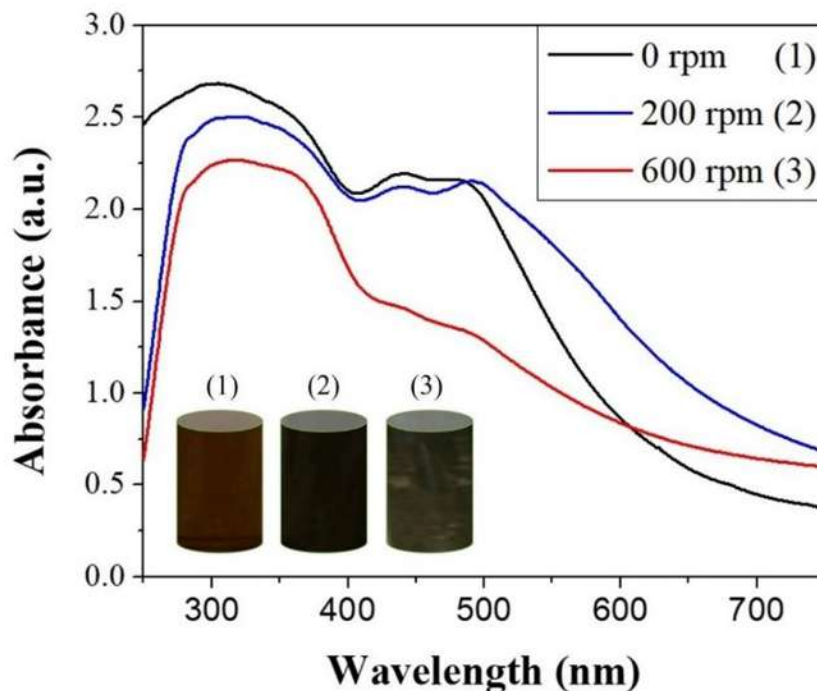


Figura 4. 9 Espectros UV-Vis de AgNPs sintetizados con diferente agitación magnética [32].

Finalmente, la figura 4.11 muestra el estudio de la estructura, morfología y tamaño de la muestra a 200 rpm mediante MET y DRX. La figura 4.11a revela que las AgNPs obtenidas están por debajo de los 100 nm con un tamaño promedio de 20 nm y dos morfologías: esférica y triangular. La figura 4.11b ilustra una imagen de alta resolución (HR-TEM) y su patrón FFT, evidenciando la naturaleza cristalina de las AgNPs. Los planos de red corresponden a una distancia de 0.24 nm que pertenece a los planos cristalográficos de plata (111). La figura 4.11c exhibe el patrón DRX, demostrando los picos de difracción indexados (111), (200), (220), (311) y (222) de acuerdo con los datos de difracción estándar de plata (No. JCPDS 04-0850) con un parámetro de red de 0.408 nm.

En resumen, en este apartado, se evaluó el efecto de la agitación magnética en la síntesis in verde de AgNPs utilizando un extracto acuoso de *Lavandula angustifolia* a una concentración de 0.02 g/ml. La velocidad de 200 rpm reflejó buen control en la dispersión de las mismas con un tamaño promedio de 20 nm con morfologías esférica y triangular. Sin embargo, se identificó que la velocidad de agitación es un factor importante en la síntesis de nanoestructuras 1D, favoreciendo la formación de este tipo de estructuras cuando la velocidad es elevada.

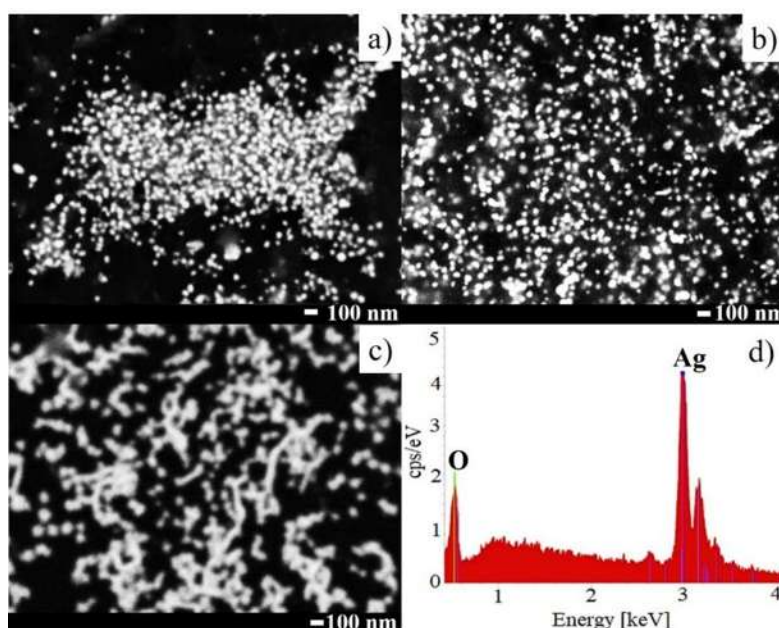


Figura 4. 10 Micrografías MEB de nanoestructuras de plata; a) 0 rpm, b) 200 rpm, c) 600 rpm y d) análisis EDS [32].

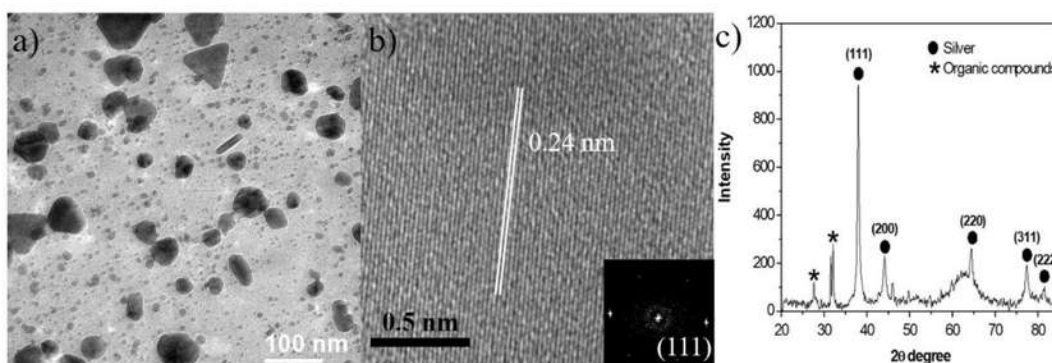


Figura 4. 11 AgNPs sintetizadas a 200 rpm, a) imagen de campo claro, b) imagen de alta resolución que indica su naturaleza cristalina y c) patrón DRX [32].

4.6 Identificación de los compuestos asociados a la síntesis de nanopartículas de Ag mediante FT-IR y RMN

La figura 4.12a muestra el espectro antes de la reducción de los iones de Ag, en donde se observaron resonancias de hidrógeno típicas de compuestos aromáticos en el rango de δ 7.50 - 5.95, así como de residuos glucosídicos entre δ 5.50 - 3.02, incluido un doblete en δ 1.17 (6.9 Hz), típico del resto de metilo asociado a la ramnosa [134], lo que sugiere la presencia de flavonoides glucosídicos [135] como los principales constituyentes del extracto de la planta, lo que es consistente con la literatura previa sobre los metabolitos de *Lavandula angustifolia* [136, 137]. Después de la reacción redox (figura 4.12b), el espectro de ^1H RMN de los sobrenadantes mostró solo la presencia de compuestos glucosídicos (δ 5.50 - 3.02), lo que sugiere que los flavonoides reaccionaron con la fuente del metal y se anclaron en la reacción del producto metálico. Por lo tanto, los compuestos fenólicos actúan como agente reductor.

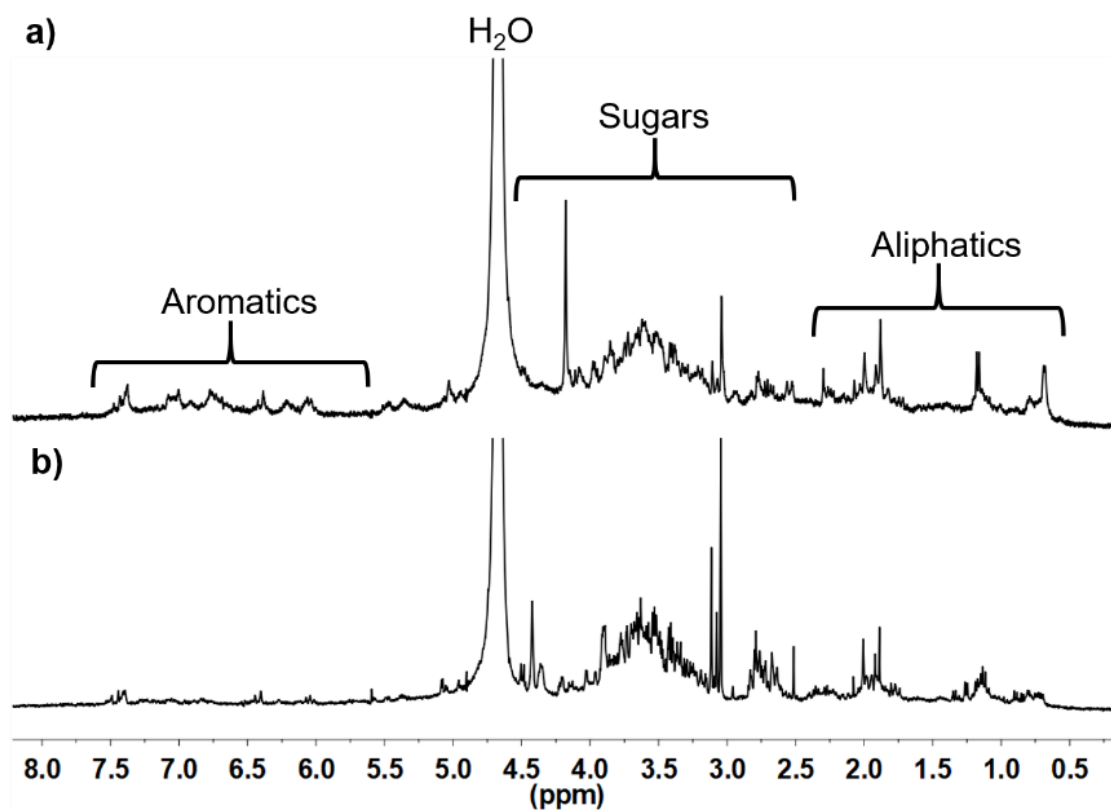


Figura 4. 12 Comparación de espectros de ^1H RMN de a) extracto de *Lavandula angustifolia* y b) sobrenadante de la reacción de nanopartículas de plata [120].

La espectroscopia infrarroja es una alternativa para identificar grupos funcionales de compuestos involucrados en la síntesis de AgNPs [138, 139]. La figura 4.13a muestra el espectro IR del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. Las siguientes bandas concuerdan con la presencia de compuestos flavonoides. Se identificaron vibraciones de estiramiento de OH a 3329 cm^{-1} , estiramientos CH a 2922 y 2852 cm^{-1} , vibraciones de estiramiento de carbonilo a 1732 y 1651 cm^{-1} , vibración de estiramiento de carbono sp^2 a 1604 cm^{-1} , la banda de CO a 1236 cm^{-1} ; Vibración de tensión C-H fuera del plano de los anillos aromáticos a 850 cm^{-1} [140, 141]. La banda más intensa observada en 1020 cm^{-1} se definió como un pico de glucosa característico [142]. Estos grupos funcionales concuerdan bien con los determinados por RMN.

La figura 4.13b muestra el espectro FTIR de las AgNPs biosintetizadas. En este caso se conservó la banda correspondiente a los compuestos flavonoides, desplazándose hacia longitudes de onda más pequeñas observadas para los complejos flavonoides-metal [143-145]. La vibración O-H se identificó a 3000 cm^{-1} , mientras que el estiramiento C-H se apreció a 2923 cm^{-1} , el carbonilo a 1600 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$). Además, una banda en 1379 cm^{-1} se asoció con C-O, cuyo número de onda aumentó debido a la coordinación oxígeno-metal como se sugiere en otros trabajos para los complejos de coordinación de flavonoides con metales de transición [136].

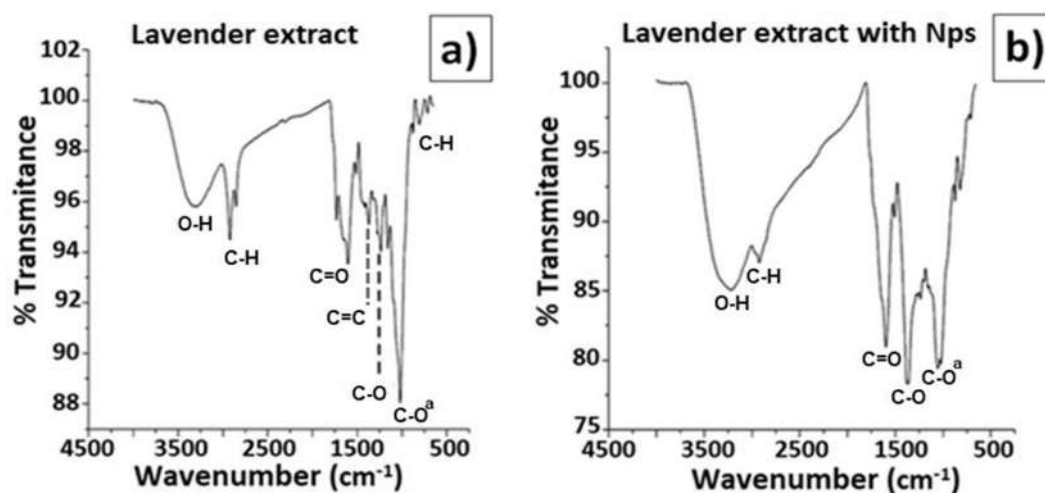


Figura 4. 13 Espectros FTIR obtenidos de las diferentes muestras a) extracto preparado a partir de *Lavandula angustifolia* b) AgNPs [120].

4.7 Síntesis de nanoestructuras 1D de plata (AgNWs)

La síntesis fue realizada en dos pasos, en donde primeramente se ponen en contacto la infusión de la planta *Lavandula angustifolia* con los agentes nucleantes por un periodo de 24 h. Una vez cumplido este tiempo, se adicionó la sal precursora AgNO_3 hasta observar un cambio de color que va del marrón al negro, siendo este característico de la formación de nanoestructuras de Ag [146]. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de centrifugación en 2 etapas por un periodo de 30 min a 12 000 rpm. Las mejores condiciones de los ensayos fueron a concentraciones finales del extracto de la planta de 0.005 g/ml, 5 mM de AgNO_3 y diferentes variaciones de los agentes nucleantes $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$, y $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. Cada uno de los agentes nucleantes fueron evaluados por separado y se hablará de ellos en un apartado específico más adelante.

4.7.1 Síntesis de nanoestructuras de Ag empleando la sal $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ como agente nucleante.

Se ha demostrado en trabajos previos que para lograr la síntesis de nanoestructuras 1D, 2D y 3D es necesario emplear modificadores de forma, usar templetos o agentes nucleantes exóticos, que son de un costo muy elevado [48]. Por ello, las sales de Cu se encuentran como excelentes alternativas, debido a que son económicas en comparación de éstas, incluyendo las de Ag.

La figura 4.14 presenta el espectro de UV-Vis de AgNWs empleando la sal $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ como agente nucleante a una concentración final de 3 mM. Es importante mencionar que las condiciones del extracto de la planta fue una concentración de 0.01 g/ml y la sal precursora AgNO_3 de 5 mM. Se distinguen la presencia de dos bandas de absorción características, siendo la primera a 350 nm, relacionada con el modo transversal de éstos [48]. Como complemento, es observado en el rango comprendido entre 400 y 600 nm la aparición de una distribución bimodal, relacionada con la síntesis de dos morfologías muy marcadas, siendo una de ellas nanoestructuras de mayor tamaño. Estas morfologías son AgNPs para la distribución ubicada en los 400 nm y AgNWs para la que inicia en los 500 nm. Algo similar reportan Jeevika y col. [74] los cuales demuestran la aparición de dos picos SPR alrededor de 350 y 387 nm en la formación de AgNWs que son debidos a la secciones transversal y longitudinal, respectivamente. Para el caso de la banda ubicada en los 300 nm, esta se

relaciona con los compuestos orgánicos de la planta, presentes en la estabilización de las nanoestructuras de Ag. Una de las diferencias del presente trabajo, es que, aunque se emplea una planta como agente reductor-estabilizador, el método de formación y crecimiento es distinto.

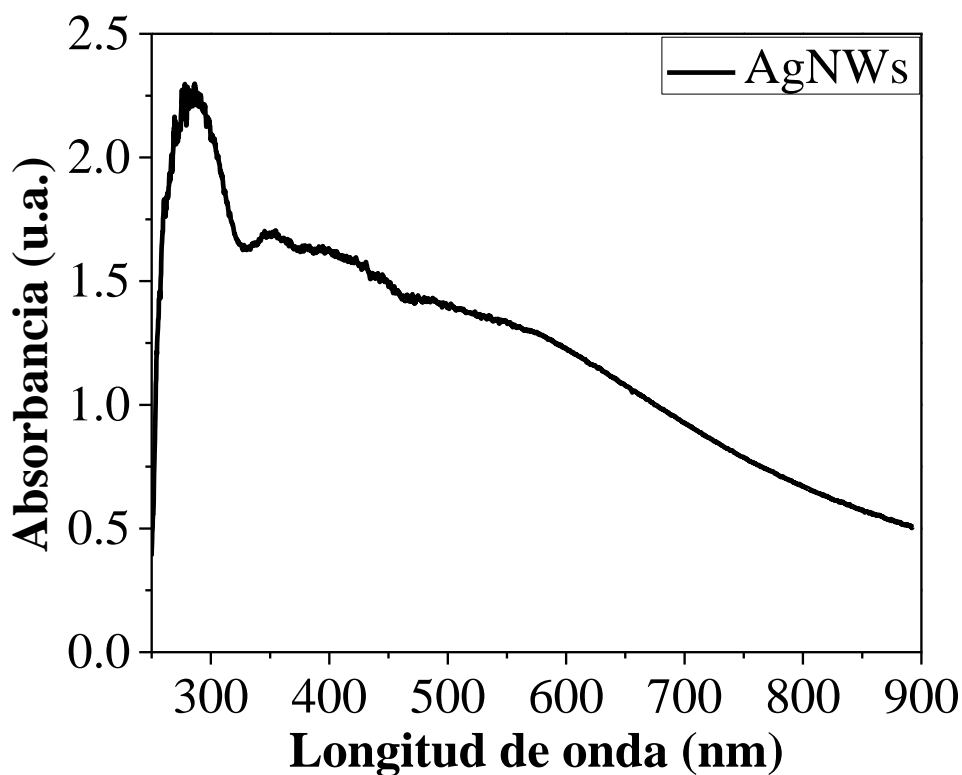


Figura 4. 14 Espectro de UV-Vis de AgNWs empleando acetato de cobre como agente nucleante.

En la figura 4.15 (a-d) se exhiben los AgNWs sintetizados en diferentes zonas y ampliaciones de la muestra, esto con el objetivo de entender los fenómenos que más adelante se explicarán en la sección de pruebas biológicas. Es importante mencionar que los nanoalambres presentan baja relación de aspecto como se aprecia en el caso de la figura 4.15a, sin embargo, una vez que estos comienzan a unirse, forman estructuras en forma de estambre, es decir una gran diversidad de alambres agrupados en ciertas zonas de la muestra cómo se presenta en las figuras 4.15b y 4.15c. Finalmente, en la figura 4.15d se ilustra un alambre individual, en el cual es notorio, que el diámetro mide aproximadamente 110 nm.

Cabe destacar, que el control de la forma es uno de los retos más grandes en la síntesis verde de estas nanoestructuras, esto se observa en las imágenes del artículo realizado por Lin y col. [80], los cuales obtienen AgNWs similares a los expuestos en el presente trabajo.

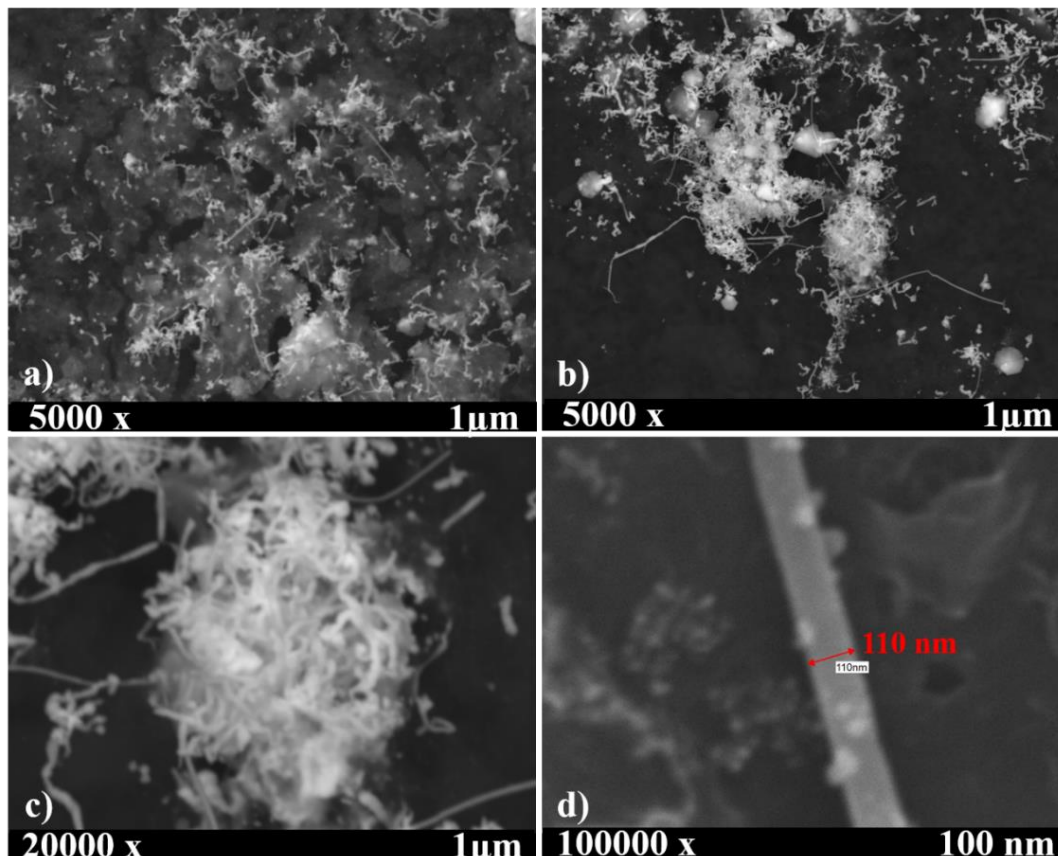


Figura 4. 15 Nanoalambres empleando $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ como agente nucleante a) AgNWs con baja relación de aspecto, b) zona concentrada del material sintetizado c) agrupamiento formado estambres y d) AgNW individual con diámetro de 110 nm.

Por otro lado, en la figura 4.16(a-e) es presentado el mapeo químico de una porción de los nanoalambres enredados, observando que los componentes principales de la estructura son Ag, Cu y Cl. Estos elementos pueden formar parte del mecanismo de reacción o de la estructura, ya que algunos estudios como es el caso de Wang y col. [147], informan que es necesaria una estructura inicial de AgCl para que los alambres de plata crezcan sobre ellas por medio de NPs de maclado tipo pentagonal.

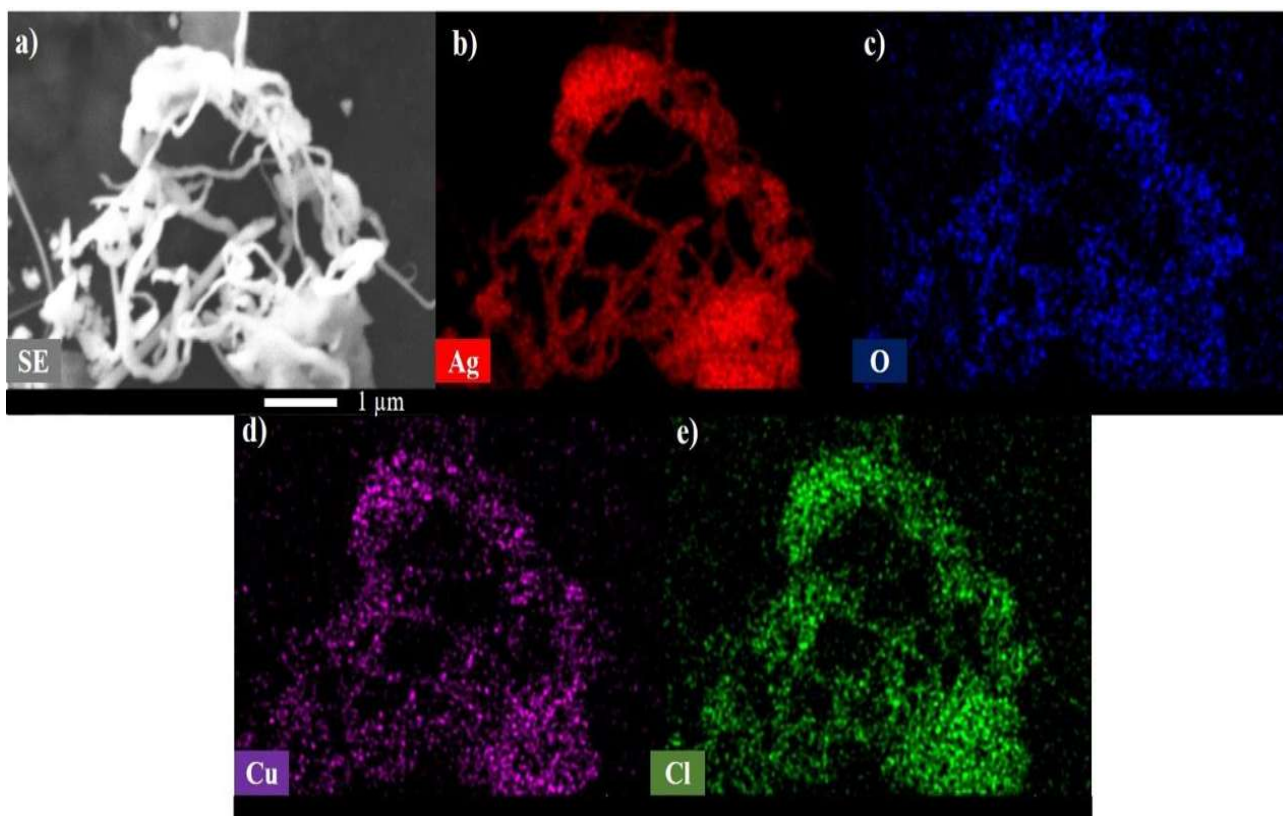


Figura 4. 16 Mapeo químico de una porción de nanoalambres a) imagen en gris, b) elemento plata, c) oxígeno, d) cobre y e) cloro.

La red cristalina de los nanoalambres sintetizados se caracterizó a través de DRX. La figura 4.17 ilustra el patrón DRX de los productos, en donde se exhiben 5 picos de difracción en 38.1° , 44.3° , 64.4° , 77.5° y 81.6° , a los que pueden ser asignados los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) y (2 2 2) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc) del cristal de Ag con número de tarjeta [00-004-0783]. Los picos no identificados a ángulos inferiores de 35° se asociaron a los compuestos orgánicos encargados del proceso de estabilización. Algo similar obtienen Ozturk y col. [148] donde a través de un método verde sintetizaron AgNPs obteniendo otras fases distintas al cristal de Ag. Es importante mencionar, que también los compuestos como AgCl, NaCl, KCl, óxidos de Ag y Cu fueron analizados, pero ninguno de ellos coincidió con el criterio de indexación.

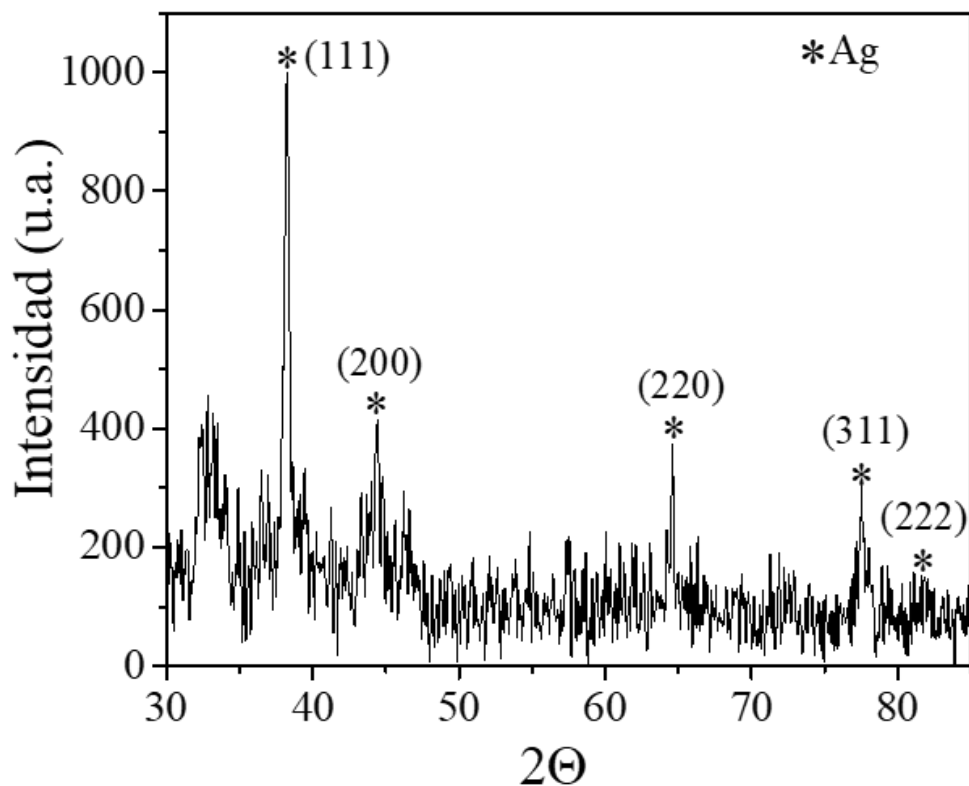


Figura 4. 17 Difractograma de los AgNWs empleando $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ como agente nucleante.

Al observar el comportamiento del sistema, se identifica que se había llegado a una zona en la cual se podría llegar a mejorar la eficiencia de los nanoalambres, se optó por disminuir un poco la concentración del agente nucleante $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ desde 3 mM hasta 2.5 mM. Para ello, la figura 4.18 representa el análisis realizado por espectroscopía UV-Vis con las condiciones mencionadas con anterioridad. Se observan claramente dos picos SPR, que son característicos de nanoestructuras de orden superior. De acuerdo a la literatura, el máximo en la banda de absorción en aproximadamente 350 nm se atribuye a la sección transversal de las nanoestructuras de Ag. Sin embargo, el ensanchamiento del plasmón ubicado entre los 400-550 nm con un máximo en 475 nm indica nanoestructuras de mayor jerarquía en comparación con las AgNPs. Sin embargo, es necesario realizar otras técnicas de caracterización, con el objetivo de determinar la forma y distribución específica.

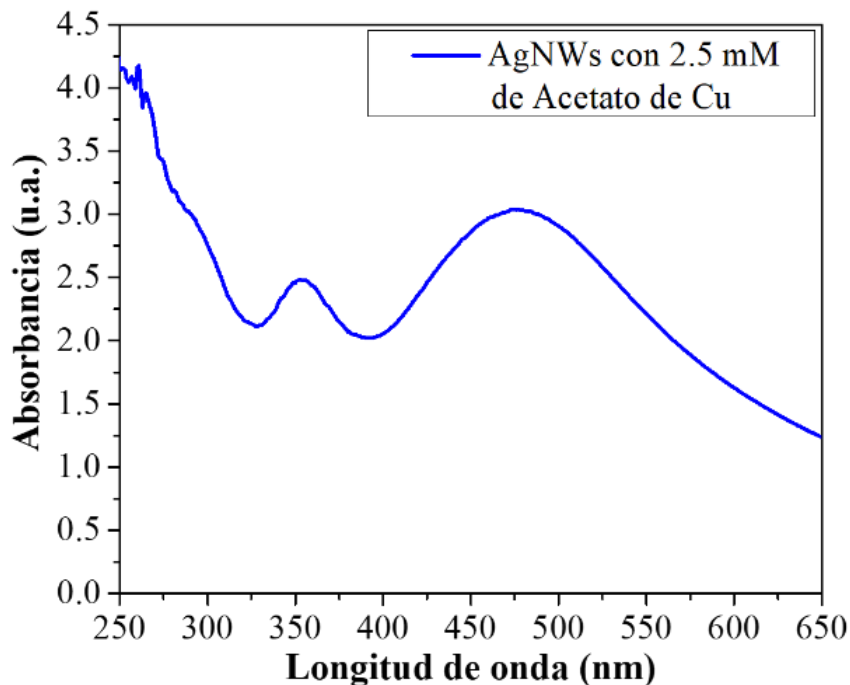


Figura 4. 18 Espectro de UV-vis de AgNWs empleando el acetato de Cu como nucleante a una concentración de 2.5 mM.

Como complemento de esta variación, la figura 4.19 (a-d) conjunta 4 micrografías de MEB a diferentes ampliificaciones, en las cuales se identificó una gran proporción de nanoalambres de Ag. Primeramente, en panel de la figura 4.19a se presentan los AgNWs a bajas ampliificaciones, es decir, un panorama general con el objetivo de que sea evidente la alta relación de aspecto de éstos posiblemente alcanzando una longitud de hasta 100 μm . La figura 4.19b demuestra que hay nanoestructuras más pequeñas rodeando la porción de los nanoalambres, lo cual es más evidente en el panel de la figura 4.19c, que corresponde a la micrografía de 10 000X. Finalmente, la figura 4.19d resalta que los AgNWs no son lisos, sino, parece que hay rugosidad en ellos, que podría interpretarse como la adherencia de AgNPs. Por esta razón, el agregado de las imágenes MEB demuestran que la eficiencia no fue cercana al 100%, debido a que hay una combinación de diversas nanoestructuras. Sin embargo, esta eficiencia es alta en comparación con otros métodos verdes [149-152]. Además, al identificar que los nanoalambres se encuentran rodeados de NPs, se puede

concluir que el ancho y principalmente la relación de aspecto de éstos puede controlarse con el tiempo.

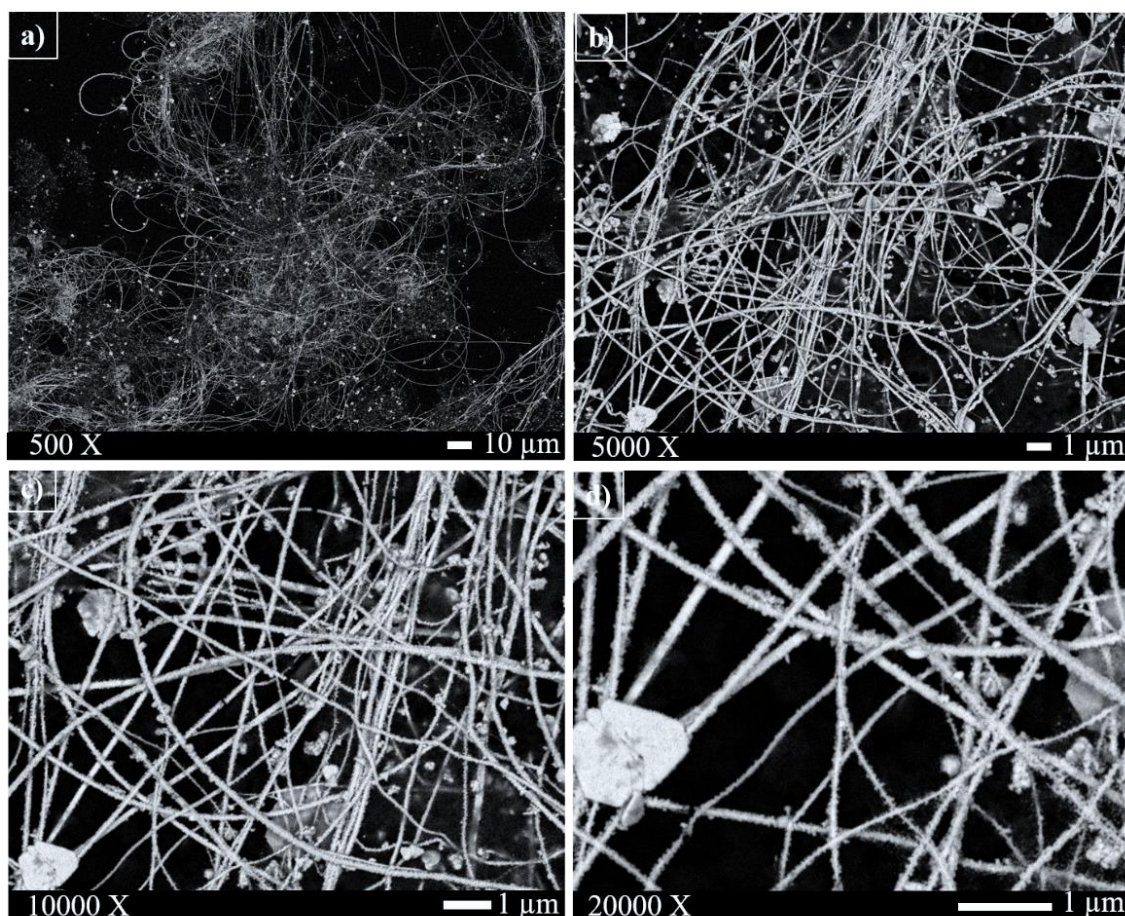


Figura 4. 19 AgNWs con acetato de Cu a concentración de 2.5 mM a) panorama general, b) alambres con alta relación de aspecto, c) diferentes nanoestructuras de Ag y d) crecimiento de los NWs a partir de NPs.

Con el objetivo de identificar más a detalle las características del nanomaterial sintetizado, se analizaron diferentes zonas de las muestras. En la figura 4.20 (a-c) se agrupan 3 micrografías de MEB que revela una segunda forma de AgNWs, siendo ésta geoméricamente plana. La figura 4.21a representa un panorama general de este material a bajas amplificaciones (10 000X), en la cual se identificó que el agregado completo del nanomaterial obtenido tiene una forma similar a las estructuras secundarias de las proteínas como lo son las hélices y láminas plegadas. Sin embargo, debido a la similitud y simplicidad del nombre las llamaremos nanocintas y/o nanolistones. En el panel de la figura 4.19b se

manifiesta que los nanolistones también, están rodeados de AgNPs, por lo tanto, confirma que el crecimiento es mediante la coalescencia de éstas. Esto es más evidente, en el panel de la figura 4.20 c) que corresponde a la amplificación de 40 000X. Aquí se identificó claramente las nanocintas y nanoalambres rodeados de NPs. Por lo tanto, se puede concluir que el crecimiento se da en etapas, las cuales consisten en, primero la sobresaturación del sistema mediante la sal $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ [147, 153]. La sal en este caso cumple dos funciones importantes que son disminuir la energía libre de Gibbs y otorgar una semilla o superficie [154], en la cual los iones de Ag al ser reducidos gracias a los compuestos de la planta *Lavandula angustifolia* formarán en un primer momento AgNPs de tipo maclado pentagonal como sugieren diversos autores [155, 156]. Posteriormente, éstos formaran agrupaciones como se ilustró en el apartado referente a la agitación magnética. Después, la centrifugación a altas revoluciones favorecerá la elongación de las nanoestructuras hasta la formación de pequeñas varillas con baja relación de aspecto que conforme pase el tiempo se van a transformar a nanoalambres delgados con alta relación de aspecto. Finalmente, la adición de mayor cantidad de AgNPs presentes en la solución lograrán formar los nanolistones tipo lámina plegada. Es importante mencionar, que la reacción se detuvo inmediatamente al cambio de coloración de la solución, es decir cuando fue del amarillo al negro. Sin embargo, de acuerdo a lo observado se puede determinar que a medida que incrementa el tiempo estas estructuras pueden enrollarse formando estructuras del tipo 3D en forma de estambres.

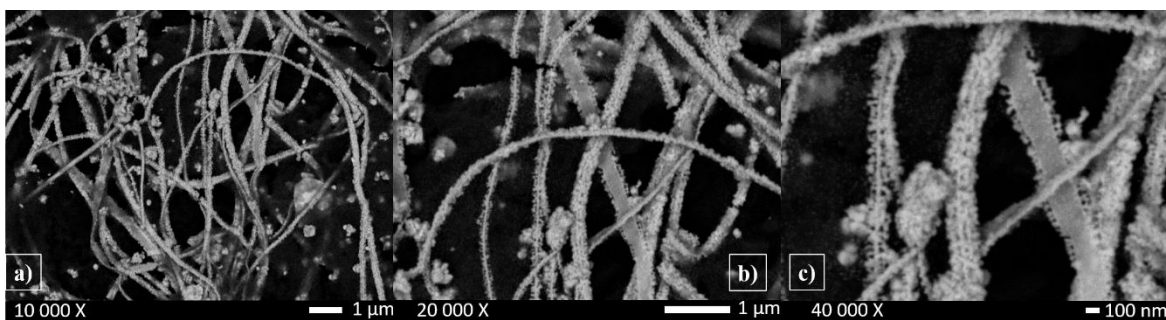


Figura 4. 20 Nanoestructuras de Ag tipo lámina plegada a) panorama general, b) nanolistones y c) crecimiento de nanolistones a partir de NWs con alta relación de aspecto.

Como complemento, en la figura 4.21(a-d) se exponen 4 micrografías de MEB para evidenciar lo discutido en el párrafo anterior. En los primeros paneles se comparan 3 zonas

distintas de las nanoestructuras obtenidas a las mismas ampliaciones, las cuales ilustran NWs con formas rugosas en potencial crecimiento a ser listones (figura 4.21a), alambres delgados con alta relación de aspecto (figura 4.21b), y nanolistones formados (figura 4.21c), esta última imagen corresponde al estudio mediante electrones secundarios para exhibir mediante su contorno y relieve su morfología. Cabe mencionar que este tipo de nanoestructura no ha sido reportada utilizando síntesis verde, lo que constituye un aporte de este trabajo.

El panel de la figura 4.21 d) es la imagen de mayor aumento obtenida mediante esta técnica, la cual descubre que a partir de NWs con alta relación de aspecto se forman los nanolistones.

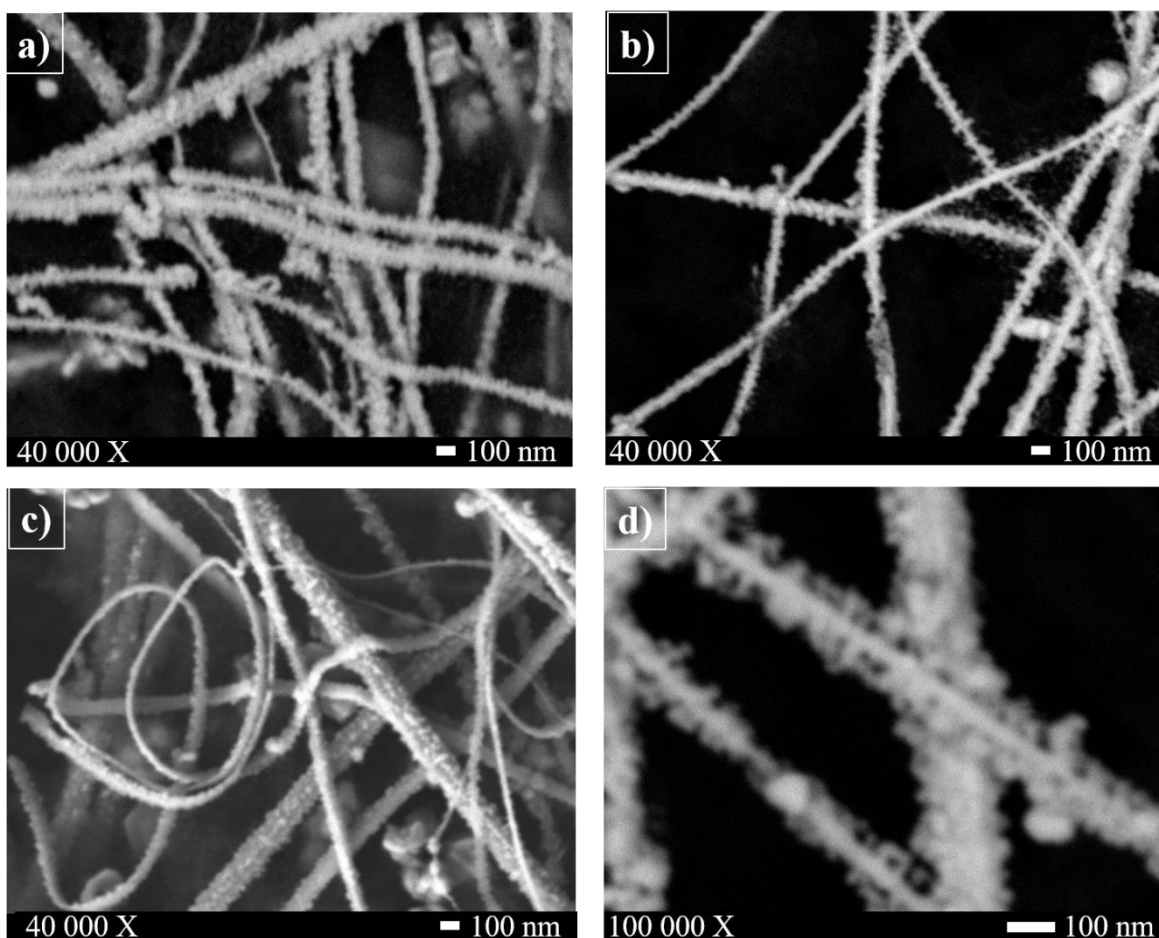


Figura 4. 21 Nanoestructuras sintetizadas con 2.5 mM de acetato de Cu a) alambres rugosos rodeados de partículas, b) nanocables con alta relación de aspecto, c) nanocintas formadas y d) formación de las nanocintas a partir de la coalescencia de NPs.

Para evaluar la pureza de las nanoestructuras obtenidas, es necesario emplear una técnica de MEB como es el análisis químico. Para ello, la figura 4.22a muestra un análisis puntual EDS, el cual revela que las nanoestructuras 1D obtenidas están formadas íntegramente del elemento plata. Adicionalmente, se integraron 4 imágenes que corresponden al estudio de las nanocintas mediante un mapeo químico elemental. La figura 4.22b ilustra la imagen en gris de la zona de los nanolistones que fueron sujetos a estudio. Además, La figura 4.22c exhibe que el producto obtenido está compuesto de dos elementos principales, siendo éstos Ag y Cu. Lo dicho con anterioridad, es más notorio en la figura 4.22d de para la plata y la figura 4.22e para el Cu, respectivamente. Por esta razón, se puede reafirmar lo mencionado con anterioridad respecto a las etapas del crecimiento, el cual asocia a la sal de Cu como un agente nucleante y/o templete sobre el cual los cristales de Ag crecerán.

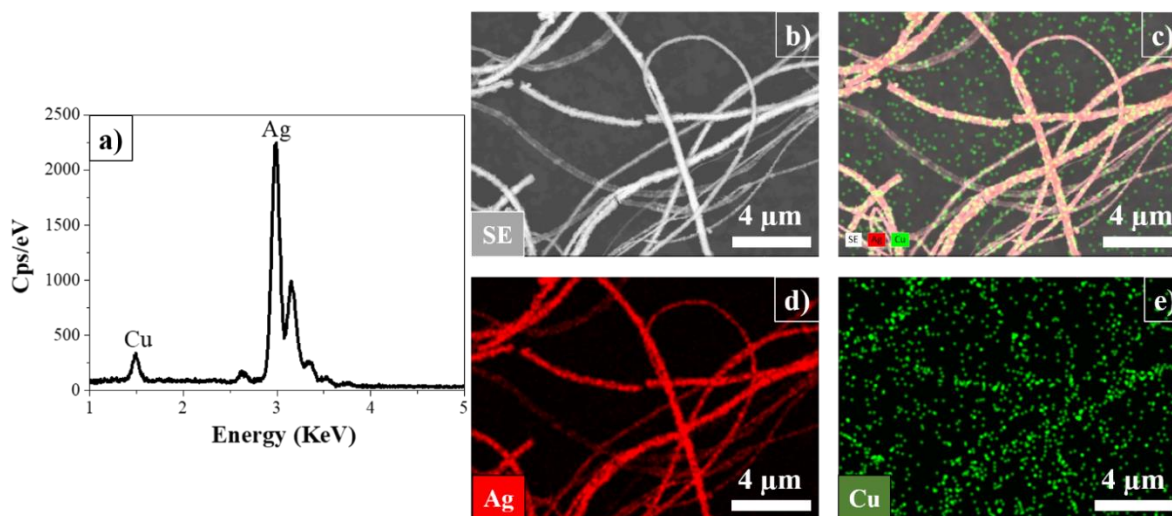


Figura 4. 22 Análisis químico de las nanocintas a) EDS, b) imagen en gris, c) evaluación en conjunto de los elementos Ag y Cu, d) plata y e) cobre.

Para conocer la estructura cristalina de las nanocintas, se realizó un análisis DRX. Para esto, la figura 4.23 presenta 4 picos de difracción a 38.21, 44.67, 65 y 77.50°, a los cuales se asignan los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) del cristal de Ag con número de tarjeta [00-004-0783] y un parámetro de red de 0.408 nm. Los picos observados a ángulos inferiores a los 35° se relacionan con los compuestos orgánicos remanentes del proceso de formación, debido a que no se encontró relación con otros materiales como el AgCl, Cu o algún óxido metálico.

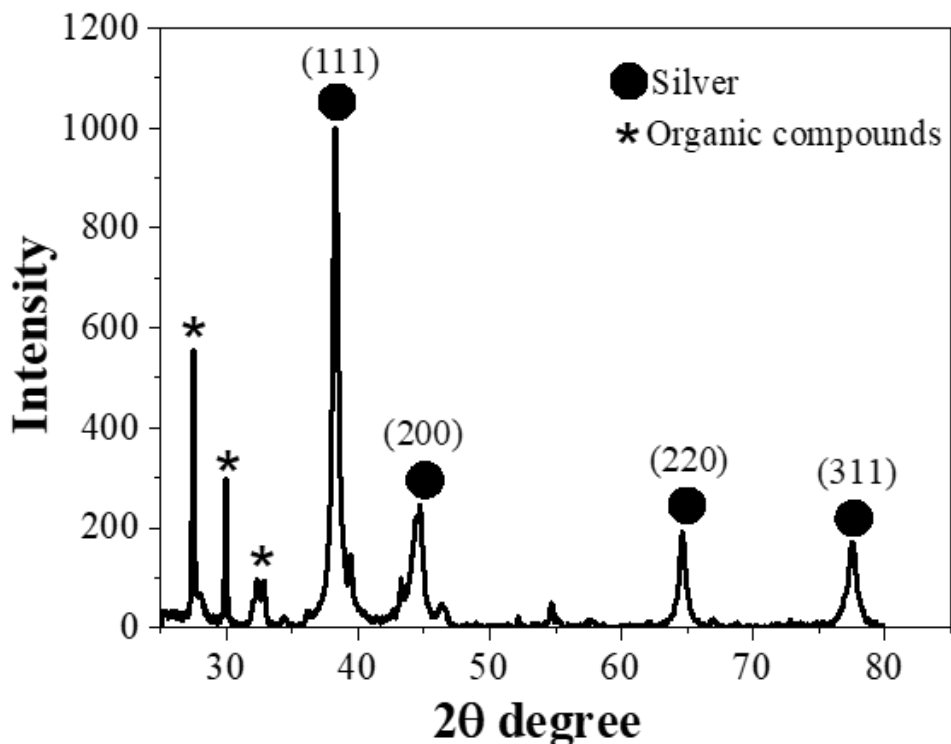


Figura 4. 23 Patrón DRX de las nanocintas de Ag obtenidas por métodos verdes.

4.7.2 Variación de la infusión con la sal Cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ como agente nucleante.

La síntesis se realizó en dos pasos de acuerdo con lo establecido en el planteamiento experimental. Se continuó probando las variables con la sal acetato de Cu, debido a que se obtuvieron buenos resultados. De esta forma, se mezcló el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* con la sal Cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$, para que 24 h después se adicionara la solución acuosa de la sal AgNO_3 . Las condiciones finales de los ensayos fueron de 0.0025 y 0.01 g/ml para el caso del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, 2.5 mM para la sal Cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ y 5 mM para la sal AgNO_3 (ver tabla 4.3). Es importante mencionar, que a las muestras denominadas con la letra A se les aplicó agitación magnética con la finalidad de acelerar la reacción. No obstante, aquellos ensayos identificados con la letra B, siguieron el procedimiento de dos pasos sin ningún cambio, coincidiendo con los descrito en apartados anteriores.

Tabla 4. 3 Condiciones finales de los ensayos de la síntesis de nanoestructuras de Ag

Nombre de la muestra	Concentración de la infusión	Concentración de la sal Cu (CH ₃ COO) ₂ H ₂ O	Concentración de la sal AgNO ₃	Agitación constante hasta el cambio de color
1 A	0.0025 g/ml	2.5 mM	5 mM	SI
2 A	0.05 g/ml	2.5 mM	5 mM	SI
1 B	0.0025 g/ml	2.5 mM	5 mM	NO
2 B	0.05 g/ml	2.5 mM	5 mM	NO

La figura 4.24 presenta los espectros de UV-Vis correspondientes a las muestras sometidas a proceso de agitación constante a 800 rpm. En el caso del espectro 1 A (ver tabla 4.3) es apreciable una banda ancha de absorción principal que abarca los 415-500 nm, con un pico máximo en la resonancia del plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) en 451 nm, que es indicativo de nanoestructuras de plata obtenidas con tamaños superiores. De hecho, la identificación del pico SPR a 352 nm confirma la presencia de nanoestructuras de plata largas que se acercan a niveles micro [48]. Sin embargo, el ancho del pico demuestra que las estructuras de mayor tamaño se encuentran en conjunto con nanopartículas de plata. Por otro lado, el espectro 2 A (ver tabla 4.3) que corresponde a una solución con mayor concentración de extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, se observa una banda principal de absorción comprendida en el rango de 400-500 nm con un pico máximo SPR en 457 nm que se atribuye a material nanométrico de plata [48, 75, 157]. Además, son notorias dos bandas secundarias, la primera ubicada a 352 nm que puede corresponder a nanoalambres de plata largos similares a la plata a nivel micro y 383 nm que se atribuyen al modo transversal de nanoalambres o nanorodillos [48]. La combinación de diversos máximos en el espectro de UV-Vis se debe a una combinación de diferentes morfologías en la solución tales como nanopartículas, nanotriángulos, nanorodillos y nanoalambres con una amplia sección longitudinal. Además, es posible que la luz incidente del espectrofotómetro muestre

resonancias de plasmón en diferentes partes del plano de alguna nanoestructura como en lo sugieren Amirjani y col. en el caso de los nanotriángulos [158]. De este modo, el comparativo demostró que la concentración del extracto de la planta influyó en la cantidad de material reducido, debido a que la muestra 2 A, presentó mayor pico de intensidad en comparación con la muestra 1 A (ver tabla 4.3). No obstante, este incremento en los agentes reductores influyó en la cantidad de formas y tamaños de las nanoestructuras sintetizadas, esto se debe a que presentó mayor cantidad de máximos en las bandas de absorción obteniendo una distribución polimodal. Por este motivo es importante identificar mediante MEB estas formas y tamaños.

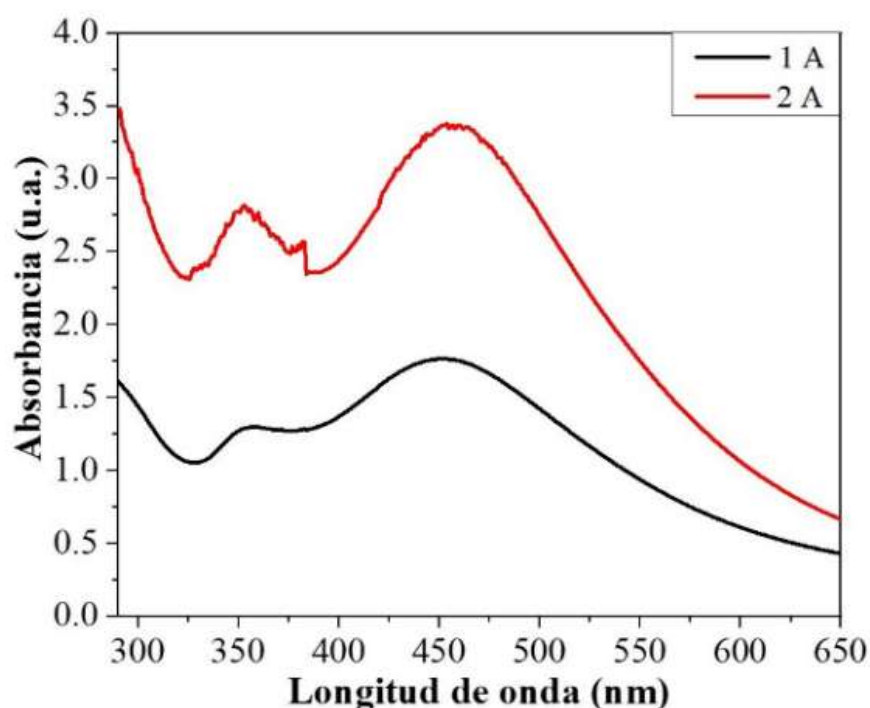


Figura 4. 24 Espectros de UV-Vis de nanoestructuras de plata sometidas a agitación constante de 800 rpm (ver tabla 4.3).

La figura 4.25 (a-d) muestra un conjunto de micrografías de MEB a distintas ampliificaciones de la muestra 1 A corroborando la síntesis de nanomateriales. En el panel a) es apreciable una imagen a 1500 X, en la cual se observa un panorama general del tipo de nanoestructuras sintetizadas, siendo en forma de alambres con alta relación de aspecto en conjunto de agregados de Ag con formas irregulares. Lo anterior coincide con el espectro de UV-Vis que indicó estructuras de tamaños cercanos al nivel micro. El panel b) se centra en la estructura

en forma de alambre, en la cual se aprecia que el éste no es cilíndrico, ni liso como otros estudios [159-161]. Por esta razón, los paneles b) y c) exhiben ampliificaciones a 50 000 X y 100 000 X, respectivamente, en donde se corrobora que el alambre es rugoso y está formado por agregaciones de pequeñas placas de Ag, así como AgNPs de tamaños y formas irregulares, similar a lo obtenido por Fahad y col. [162].

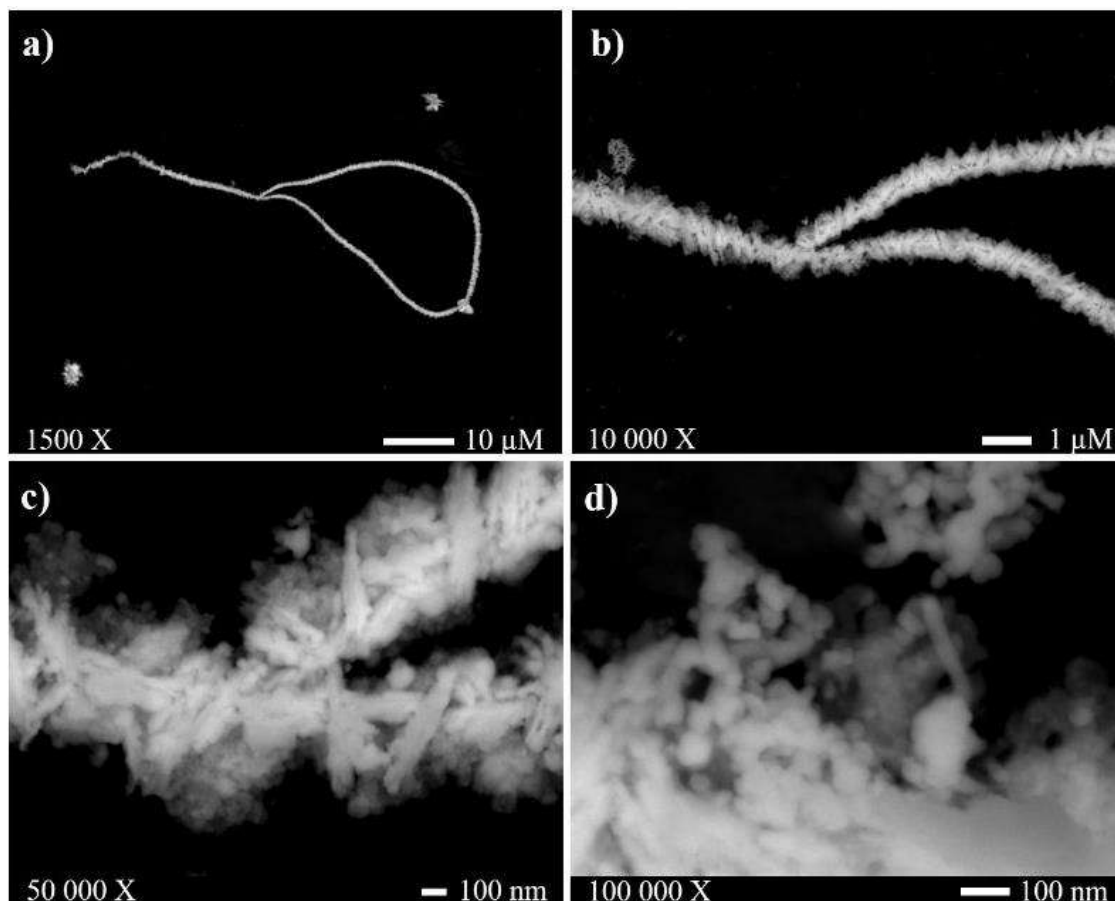


Figura 4. 25 Micrografías de MEB de la muestra 1 A, a) alambre de dimensiones micrométricas, b) forma rugosa del alambre de Ag, c) láminas que conforman la estructura, d) AgNPs de formas y tamaños irregulares presentes en la estructura.

Con la finalidad de reafirmar que los alambres obtenidos estuvieran formados por el material de interés, la figura 4.26 muestra la composición química dada por el espectrómetro dispersivo de energía (EDS, por sus siglas en inglés) con una fluorescencia principal alrededor de 3.0 KeV que pertenece al elemento plata. También, se aprecian fluorescencias menores de C y O que corresponden al material donde la gota fue depositada, el Cu pertenece

a la rejilla o portamuestras empleado, mientras que el S proviene de residuos de la planta *Lavandula angustifolia*.

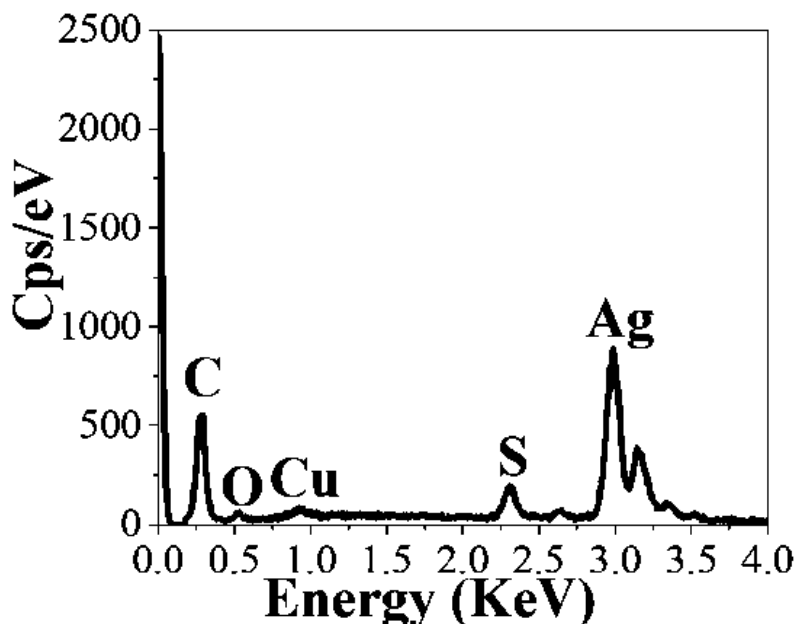


Figura 4. 26 Análisis químico EDS del ensayo 1 A.

Por otro lado, la figura 4.27 (a-d) exhibe un conjunto de micrográficas de MEB de la muestra 2 A (ver tabla 4.3), es decir la que contuvo mayor concentración del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. En el panel a) es notoria una combinación de nanoestructuras de diferentes formas y tamaños. Por esta razón, la distribución en el espectro de UV-Vis correspondió a una distribución polimodal donde existen estructuras irregulares de tamaño micrométrico y nanométrico. El panel b) se centra en las estructuras de tamaño micro alineándose en una dirección. Para mejor observación el panel c) ilustra estas estructuras a 50 000 X apreciándose que están formadas por una combinación entre láminas y partículas irregulares [163]. Finalmente, el panel d) exhibe las partículas de tamaño nanométrico que posiblemente tienden a agregarse a lo largo del tiempo, para ser parte de una nanoestructura de mayor tamaño [164] o posiblemente formen nanoensambles como el caso de Shah y col. [165]. Por lo tanto, de estos ensayos determinamos que el incremento en el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* propició un mayor número de iones reducidos de Ag que se reflejaron con el aumento en la cantidad de nanoestructuras de Ag obtenidas. No obstante, la diversidad de formas y tamaños determinó una deficiencia en el número de agentes

estabilizantes. Por lo tanto, es necesario aumentar la concentración del extracto o en su defecto disminuir las sales inorgánicas como se observó en el apartado anterior.

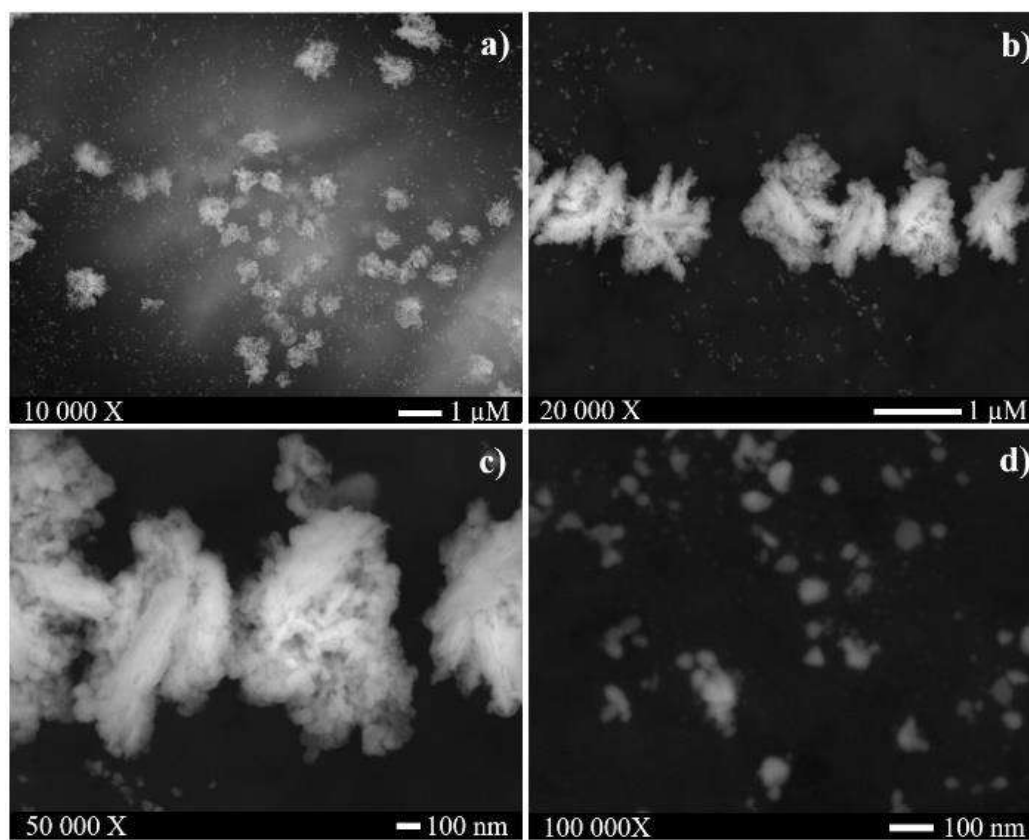


Figura 4. 27 Imágenes de MEB de la muestra 2 A, a) diversidad de formas de Ag, b) alineación de la estructura micrométrica de Ag, c) estructura conformada por láminas y AgNPs y d) nanopartículas de tamaños y formas irregulares.

Se emplearon las mismas condiciones de los ensayos anteriores para las muestras que se describirán a continuación, teniendo como única variación el proceso de agitación, que para este caso fue nula. Por ello, la figura 4.28 exhibe los espectros de UV-Vis de las soluciones 1 B y 2 B (ver tabla 4.3). Se puede observar menor absorción en el espectro de la muestra 1 B en comparación a la solución que contuvo mayor concentración del extracto de la planta, esto en teoría es lógico, debido a que posee una mayor cantidad de agentes reductores y estabilizadores [166]. Además, es apreciable una banda ancha de absorción que inicia en los 400 nm [167], que a pesar de no ser intenso, si refleja estructuras de tamaño superior al nanométrico. También, el SPR en 354 nm indica que la estructura posee tamaño

micrométrico en al menos una dimensión [48]. En el caso del espectro 2 B presentado en rojo, es evidente que la absorción fue mayor debido a la cantidad de iones de Ag reducidos. Sin embargo, la banda ubicada entre 400-500 nm con un pico SPR en 445 nm representa estructuras con formas y tamaños similares. Además, el pico identificado en la longitud de onda en 348 nm se relaciona con la Ag a nivel micro.

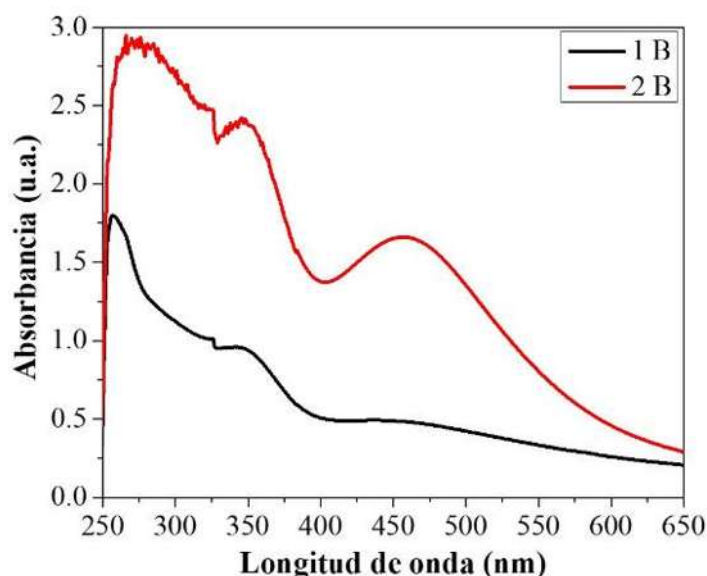


Figura 4. 28 Espectros de UV-Vis de los ensayos 1B y 2B sin proceso de agitación.

Las soluciones fueron verificadas mediante MEB para observar el proceso de formación. Por esta razón, la figura 4.29 (a-d) muestra las micrografías correspondientes al ensayo 1 B (ver tabla 4.3) a diferentes ampliificaciones. El panel a) exhibe un panorama general de las nanoestructuras obtenidas, donde es apreciable un nanoalambre con alta relación de aspecto con longitud superior a 20 μm . Además, en el panel b) se aprecia una ampliificación a 50 000 X del nanoalambre obtenido rodeado por AgNPs. Lo anterior es más notorio en el panel c) correspondiente a una ampliificación a 50 000 X, donde se aprecia un gran número de nanopartículas de diversas formas, siendo más comunes los tetraedros truncados como Wu y col. [168]. Finalmente, en el panel d) se identificó la longitud del nanoalambre, siendo este de 45 nm. Sin embargo, de acuerdo a lo observado es posible que al paso del tiempo las AgNPs tiendan a presentar el fenómeno de coalescencia [169] con la estructura del AgNW, hasta evolucionar en una estructura parecida a la muestra 1 A (ver tabla 4.3), debido a que ambas contienen las mismas condiciones, variando únicamente el proceso de agitación.

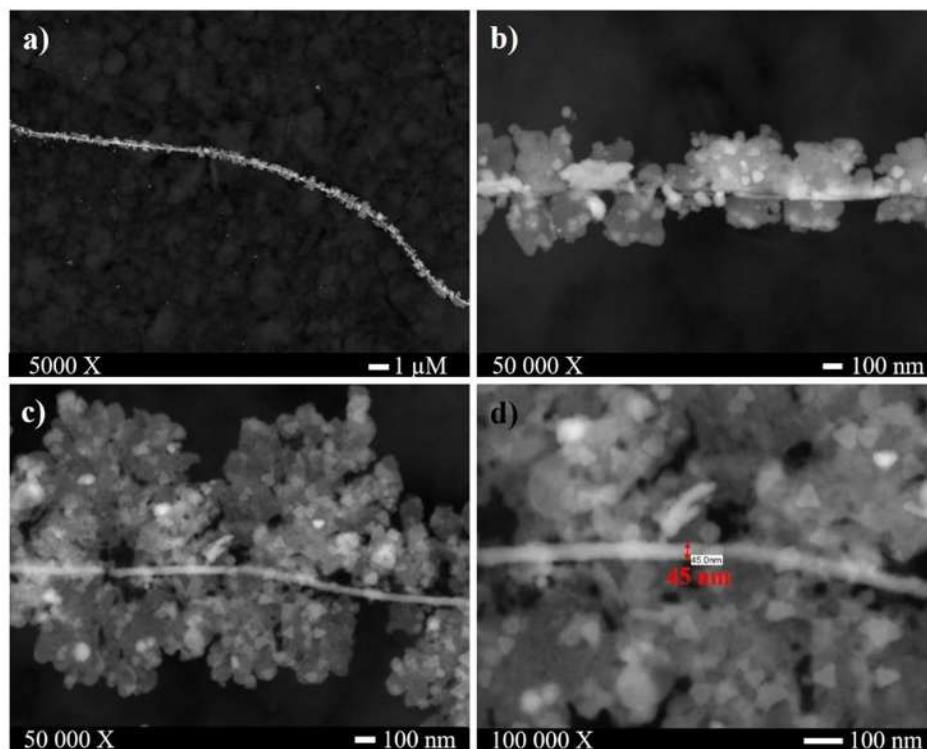


Figura 4. 29 Imágenes de MEB de la muestra 1 B, a) AgNW con longitud superior a 20 μm , b) conjunto de AgNPs y AgNW, c) AgNPs en forma de tetraedros truncados adhiriéndose al nanoalambre y d) AgNW con diámetro de 45 nm.

Por otro lado, la figura 4.30 (a-d) muestra las micrografías de la muestra 2 B (ver tabla 4.3). En el panel a) se pueden observar 3 morfologías principales, siendo éstas AgNPs al fondo, nanoalambres y plata de tamaño micrométrico. De acuerdo con lo establecido por el espectro de UV-Vis, la banda con máximo en 445 nm corresponde a las AgNPs, mientras que el SPR a 348 nm pertenece a las estructuras a nivel micro. Para el caso del panel b) se aprecian partículas agregadas de formas irregulares adhiriéndose al nanoalambre [80]. Esto es más notorio en el panel c), en el cual es contundente la falta de agentes estabilizadores en el proceso de formación, siendo similar a lo reportado por Chandran y col. [170]. Finalmente, el panel d) demuestra cómo se observarán las estructuras de plata debido al fenómeno de maduración de Oswald, ya que por la falta de agentes estabilizantes terminarán por coalescer entre ellas [169]. De acuerdo al comparativo de cada uno de los ensayos, se comprobó que aquellas muestras sometidas a proceso de agitación causan un aceleramiento en las reacciones debido a la energía transferida por este fenómeno. Esto se debe a que las imágenes

de las muestras que no fueron sometidas a un proceso de agitación parecen ser las precursoras de las que si lo presentaron. En el caso de la concentración del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* el comportamiento fue similar al del proceso de agitación, mostrando mejores resultados para una menor concentración de la infusión.

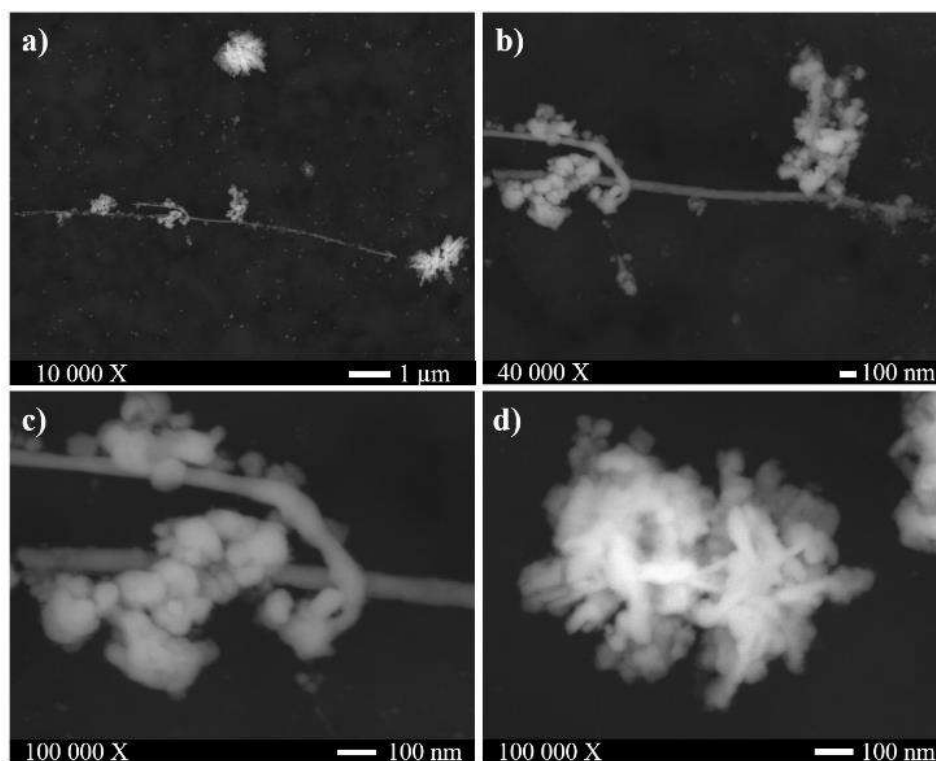


Figura 4. 30 Imágenes de MEB de la muestra 2 B, a) nanoestructuras de plata, b) partículas irregulares adhiriéndose al nanoalambre, c) posible coalescencia y d) nanoestructura final del proceso de coalescencia.

En esta sección del trabajo, se obtuvieron diferentes nanoestructuras de Ag variando el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* y el proceso de agitación. Los mejores resultados se presentaron para aquellos ensayos que contuvieron menor concentración de la infusión (0.0025 g/ml), 2.5 mM para la sal Cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ y 5 mM para la sal AgNO_3). Esto se debe a que se observaron estructuras en forma de alambre con alta relación de aspecto y superficie corrugada que van desde nanómetros en su diámetro hasta micrómetros en su longitud. Por otro lado, la energía de agitación provocó el envejecimiento prematuro del sistema de reacción, debido a que las muestras que no presentaron agitación fueron estructuras precursoras de las que sí lo llevaron a cabo. Sin embargo, la energía no es

suficiente para formar estructuras en formas de nanoalambres cilíndricos como los obtenidos por diversos autores. Por lo tanto, es necesario un proceso de centrifugación posterior a la síntesis con el objetivo de provocar un reordenamiento de los núcleos de Ag reducidos hasta la nanoestructura 1D. No obstante, es posible que un proceso de agitación constante a menores rpm pueda estar relacionado con la formación de nanoestructuras 3D como son los nanoensambles.

4.7.3 Síntesis de nanoestructuras de Ag empleando la sal Cu (NO₃)₂ como agente nucleante.

En otro orden de ideas, la figura 4.31 muestra el espectro de UV-Vis de las nanoestructuras de Ag sintetizadas empleando como agente nucleante la sal Cu (NO₃)₂ a una concentración de 2.5 mM. Es notoria la diversidad de bandas presentes a lo largo del espectro, en donde la perteneciente a 350 nm se atribuye a la sección transversal de una pequeña cantidad de nanoalambres de plata presentes. No obstante, la aparición de una distribución múltiple es causada por una diversidad de formas y tamaños presentes en la solución, como pueden ser nanoalambres, nanorodillos, nanopartículas, nanoláminas y nanoensambles. Por esta razón, es complicado comparar con otro tipo de trabajos, ya que la mayoría está enfocado a la obtención por separado de las distintas nanoestructuras.

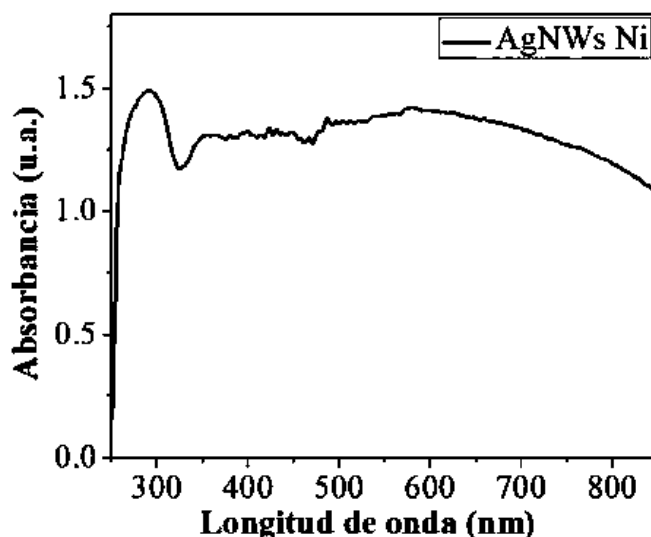


Figura 4. 31 Espectro de UV-Vis de AgNWs empleando nitrato de cobre como agente nucleante.

Por esta razón, como complemento la figura 4.32 presenta imágenes de MEB a diferentes ampliificaciones y zonas de la muestra de la variedad de nanoestructuras obtenidas. El panel a) muestra un panorama general a 2000 X, en el cual es notoria la presencia de una gran cantidad de nanoestructuras en forma de alambres, esferas y partículas, coincidiendo así con la información obtenida mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis. El panel b) corresponde a otra zona de la muestra con una ampliificación de 10 000 X, donde se demuestra que las posibles partículas formadas tienen diferentes formas semiesféricas, tetraedros truncados y tamaños diversos, concluyendo así que la muestra presenta heterogeneidad. Por esta razón, es importante variar algunos de los parámetros establecidos con la finalidad de lograr homogeneidad de alguna de las formas presentadas. Por otra parte, en el panel c) se exhiben alambres saliendo de una esfera. Es apreciable una diferencia de contraste entre estas formas, que puede ser interpretado como la formación de AgNWs a partir de un cristal precursor de AgCl. Es fundamental mencionar, que a pesar de que las sales empleadas no contienen en su estructura química el elemento Cl, este puede estar presente a través de la infusión de la planta. Finalmente, en el panel d) se señala el ancho o sección transversal de un nanoalambre a través de un acercamiento a uno de ellos, el cual es aproximadamente 157 nm. Cabe mencionar, que, aunque la literatura considera por definición que el estado nano se encuentra en el rango de 1-100 nm, diversos autores en los artículos relacionan el concepto de nano cuando las propiedades a nivel macro o micro cambian, sin importar que el tamaño supere los 100 nm [171, 172]. Lo mencionado con anterioridad ocurre generalmente para aquellos trabajos donde son sintetizados nanoalambres o nanoestructuras orgánicas [173]. Por otro lado, es necesario mencionar que la longitud del alambre alcanzo decenas de micras, obteniendo una alta relación de aspectos en comparación a otros trabajos [72, 174].

Es importante mencionar que las muestras fueron analizadas mediante MEB después del cambio de coloración. No obstante, para entender el funcionamiento de la evolución de las estructuras, éstas mismas fueron estudiadas una semana posterior al proceso de síntesis. Por ello, La figura 4.33 (a-d) presenta lo observado, en el cual es evidente un cambio en la morfología y tamaño de las nanoestructuras. Al parecer la mayoría de la Ag reducida en sus distintas formas comenzó a agregarse entre ellas, para posteriormente coalescer en nanoestructuras 3D en forma de nanoestambres. El panel a) ilustra una micrografía de bajo aumento con una gran proporción de este material. En el caso del panel b) se realizó un

acercamiento para demostrar que el interior es hueco, esto se atribuye al plegamiento de nanoestructuras 1D. El panel c) es una micrografía a 40 000 X que se centra en un nanoestambre en específico evidenciando lo mencionado con anterioridad. La evolución del sistema a lo largo del tiempo se debe principalmente a que el nitrato de cobre presenta mayor solubilidad en comparación al acetato, lo que significa que no hay formación de pequeños núcleos de Cu, es decir, se forman gran cantidad de AgNPs de manera espontánea, hasta agotarse el agente reductor y estabilizador. Es importante recordar que el estudio de la evolución fue después del proceso de centrifugación, por esta razón, es probable que si se hayan formado una pequeña proporción de nanoalambres que fueron enredándose entre sí hasta formar este tipo de estambres.

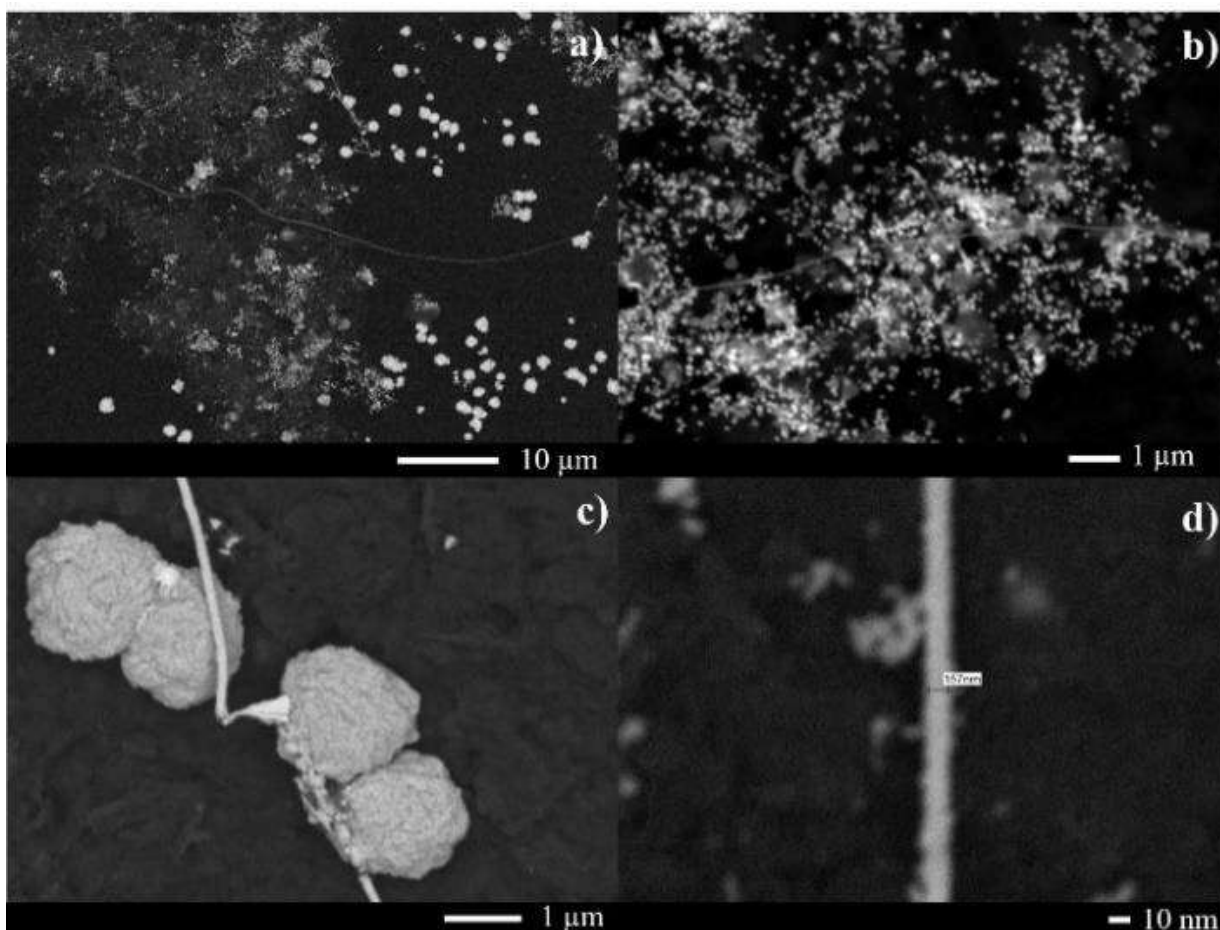


Figura 4. 32 Nanoestructuras de plata empleando $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ como agente nucleante a) panorama general a 2000 X, b) diversidad de formas a 10 000 X, c) crecimiento de NWs a través de un cristal, d) ancho de un nanoalambre.

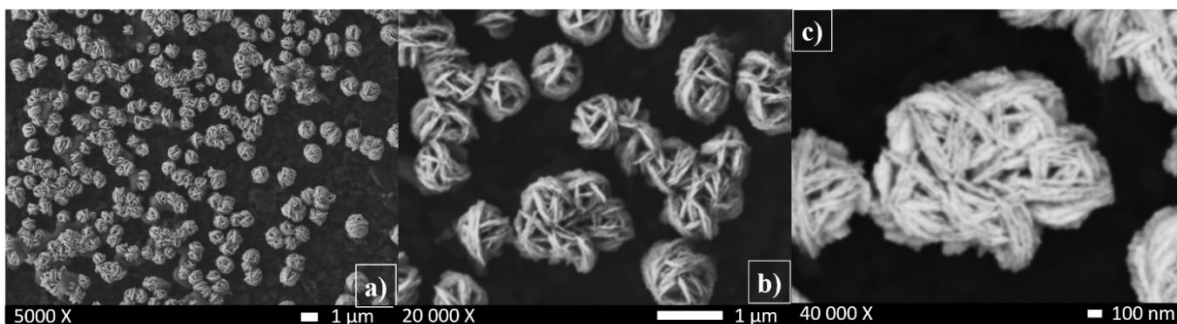


Figura 4. 33 Nanoestambres obtenidos a) panorama general, b) nanoestambres unidos y c) nanoestambre hueco.

Adicionalmente, la figura 4.34 (a-d) exhibe otro tipo de nanoestructuras presentes en la muestra, la cual puede ser la culminación de los nanoestambres. Por esta razón, el panel a) representa un panorama general de la zona donde fue encontrada la muestra, aquí es apreciable que en el costado de la esfera hay una gran cantidad de partículas adheridas, lo cual confirma lo explicado en el párrafo anterior acerca del mecanismo de formación. También, es importante mencionar la presencia de nanodentritas de Ag en la esquina superior derecha, las cuales son precursoras de las famosas estructuras llamadas nanorosas, como las propuestas por K. Chávez y col. [175]. La figura 4.34b se centra en una de las esferas obtenidas, la cual elucidada que esta nanoestructura se encuentra entrelazada de pequeñas láminas de Ag, cuyo espesor se encuentra dentro del rango nanométrico. Por lo tanto, es una estructura que constituye una matriz de nanomaterial autoensamblado del tipo 2D. Es de suma importancia mencionar, que estos autoensamblajes contienen una separación nanométrica entre capas laminares, cuya porosidad y superficie puede ser apta para aplicaciones catalíticas. Las nanoestructuras laminares son de suma importancia en el área de catálisis por ellos diversos autores las han sintetizado con aminoácidos, bacterias y proteínas [176-179]. Adicionalmente el panel c) corrobora a partir del análisis químico puntual de energía dispersiva de rayos X (EDS) que la esfera está conformada del elemento Ag, indicando la pureza del producto.

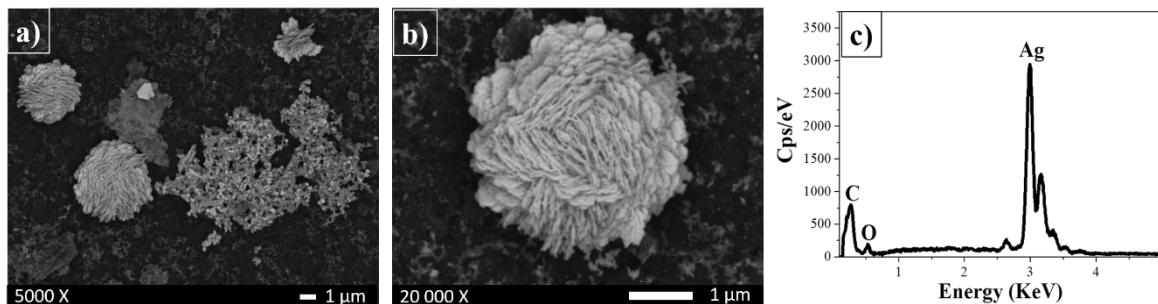


Figura 4. 34 Nanoestructuras obtenidas mediante la sal nitrato de cobre a) NPs, nanodentritas y esferas, b) nanoesfera compuesta de láminas y c) análisis químico EDS.

Finalmente, se confirmó la estructura cristalina de las diversas nanoestructuras sintetizadas mediante la técnica de DRX. En la figura 4.35 se exhiben cinco picos de difracción en 38.2, 44.45, 64.52 y 77.3 ° a los que pueden ser asignados los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) del cristal de Ag con número de tarjeta [00-004-0783]. Además, se exhiben 5 picos de difracción en 27.8, 32.2, 46.2 y 54.8 y 57.6 ° a los que se les pueden asignar los planos (111), (200), (220), (311) y (222) del cristal AgCl con número de tarjeta [00-006-0480]. Por lo tanto, de acuerdo con el estudio revelado mediante difracción de rayos X se puede concluir que el crecimiento es favorecido por pequeños cristales de AgCl como lo sugieren diversos autores [180-182]. Sin embargo, la síntesis de diferentes formas y tamaños empleando la sal de nitrato de cobre es todavía incierto, por consiguiente, la obtención de nanoestructuras de Ag a través de este método sigue teniendo un campo amplio de estudio, que puede ser excelente material de publicación para el futuro, ya sea, mediante la variación del extracto de alguna planta en concentraciones diferentes o eligiendo otra. También, a través del empleo de una mayor concentración de alguna de las sales, ya sea la de cobre o la de plata. En lo que respecta al presente trabajo, y de acuerdo a lo estudiado, se sugeriría incrementar el nitrato de cobre si el objetivo principal fuera la síntesis de nanoestructuras 1D como lo son nanoalambres, nanolistones, nanovarillas, entre otros. Sin embargo, si el deseo final fuera obtener las esferas en sus distintas variantes, se propondría descartar el método de dos pasos mediante la eliminación del agente nucleante, es decir, el proceso cambiaría a un solo paso a través de la mezcla de la sal precursora AgNO_3 y el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, siendo de suma importancia una

concentración alta de la sal precursora (superior a 5 mM), ya que, de lo contrario se formarán AgNPs.

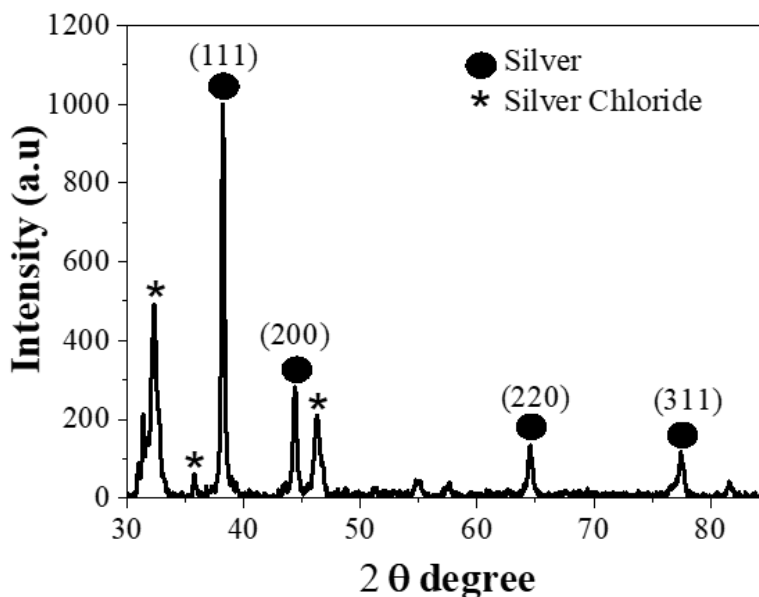


Figura 4. 35 Patrón DRX de las nanoestructuras obtenidas empleando la sal nitrato de cobre.

4.8 Elucidación del compuesto principal de la planta *Lavandula angustifolia* en la síntesis de nanoestructuras de Ag.

En esta sección se presentan y analizan los resultados de la elucidación del compuesto prioritario en la síntesis y estabilización de los diferentes nanomateriales de plata. Los estudios de RMN en conjunto de la espectroscopia de infrarrojo nos dieron un panorama general de lo que estaba sucediendo hasta el momento (ver tema 4.3), el cual explica una probabilidad alta de que el compuesto prioritario fuera una flavona glucosilada. Por esta razón, fue importante separar los compuestos a través de diferentes solventes para después identificarlos mediante cromatografía en columna.

A partir de la maceración de las partes aéreas de la planta *Lavandula angustifolia*, se obtuvo el extracto metanólico total, cuyo análisis del espectro de RMN de ^1H presentado en la figura 4.36 mostró una mezcla compleja de compuestos, presentando señales de hidrógenos aromáticos entre 8.20 y 6.20 ppm, entre 6.00 y 4.50 ppm se identificaron señales de

hidrógenos vinílico, entre 4.00 y 3.00 ppm se observaron señales correspondientes a bases de heteroátomo y finalmente, entre 2.5 y 0.50 ppm se identificaron señales características de hidrógenos alifáticos.

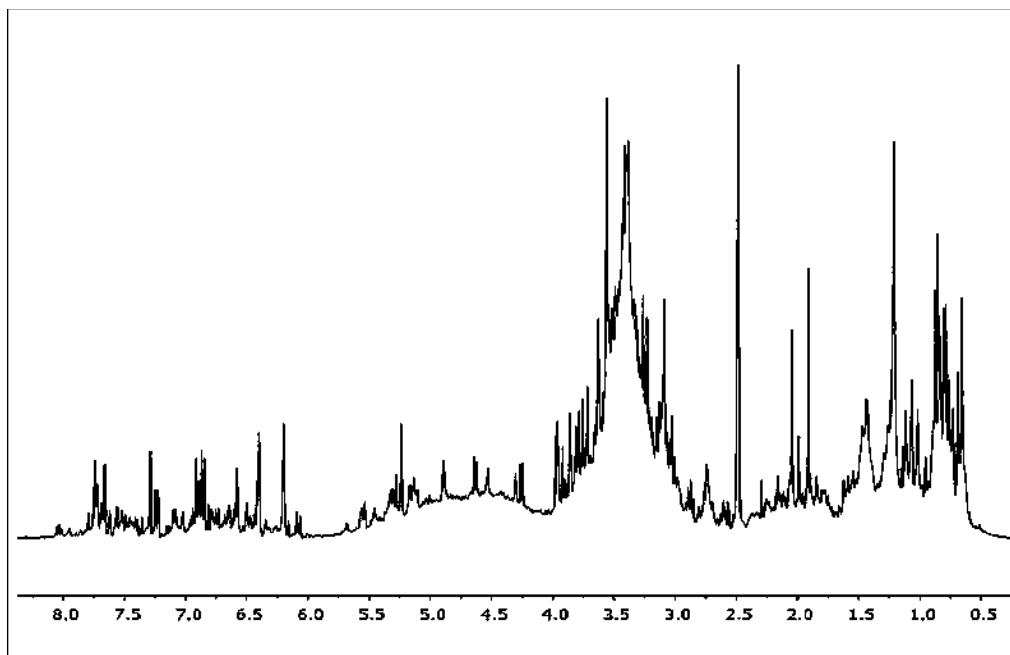


Figura 4. 36 Espectro de RMN de ¹H del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (400 MHz, DMSO-d₆).

En el caso de los espectros de RMN de ¹H de las fracciones obtenidas con CH₂Cl₂ (figura 4.37) y acetona (figura 4.38), se identificaron señales características de hidrógenos aromáticos (8.20 y 6.00 ppm), vinílicos (5.50-4.50 ppm) y alifáticos (2.50 y 0.50 ppm). En el caso del espectro del extracto metanólico ilustrado en la figura 4.39 se presentaron las mismas señales mencionadas con anterioridad, no obstante, en este espectro se integró un patrón de señales comprendido entre 4.50 y 3.00 ppm característico de azúcares, confirmando la presencia de éstos, como componentes mayoritarios en este extracto.

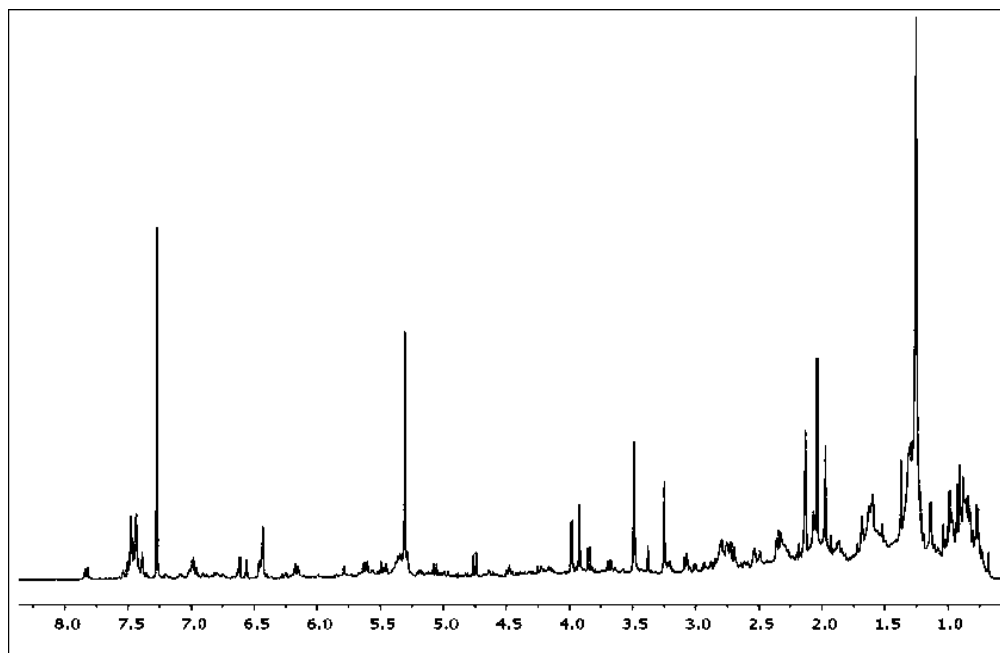


Figura 4. 37 Espectro de RMN de ^1H de la fracción obtenida con CH_2Cl_2 a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (400 MHz, CDCl_3).

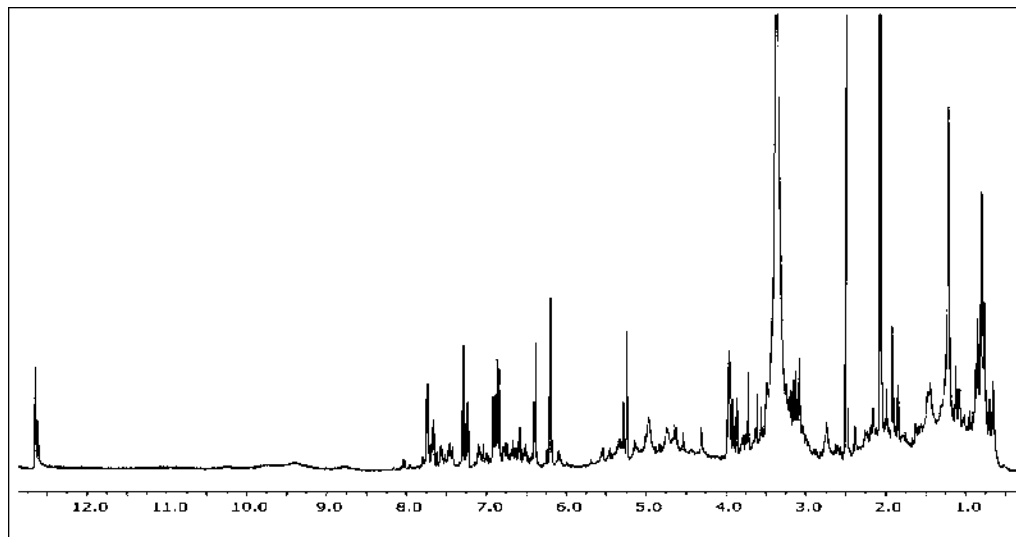


Figura 4. 38 Espectro de RMN de ^1H de la fracción obtenida con Acetona a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

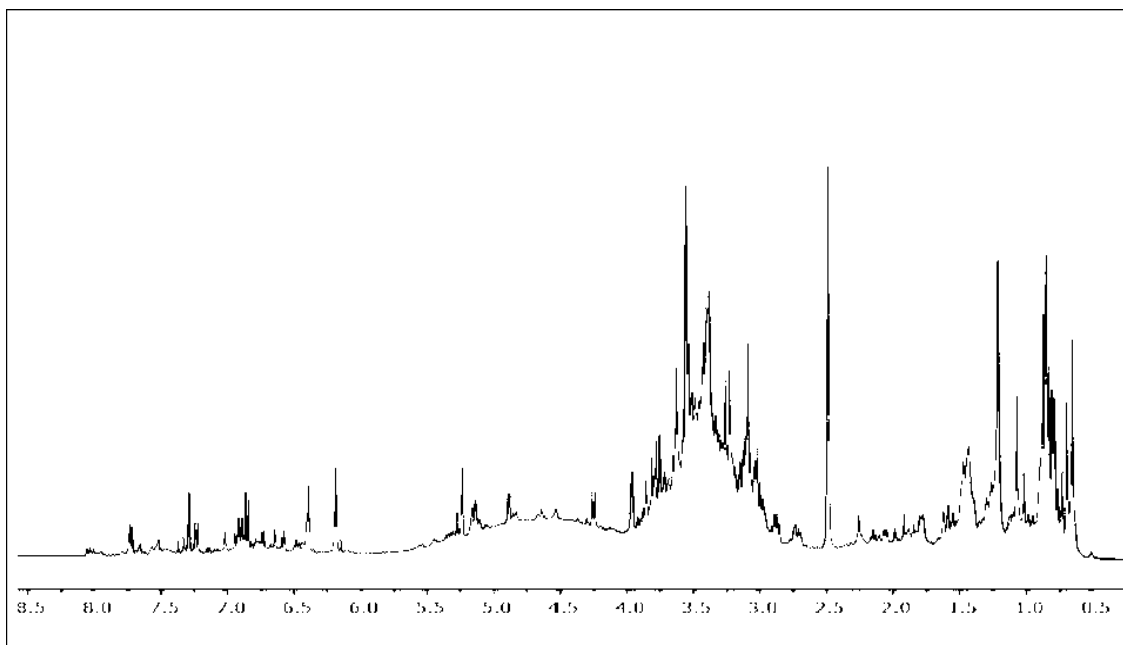


Figura 4. 39 Espectro de RMN de ^1H de la fracción obtenida con MeOH a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

De la cromatografía en columna para la purificación de los componentes mayoritarios de la fracción metanólica se obtuvo un sólido amorfo de color amarillo claro. Analizando sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se observaron señales características de un compuesto flavonoide glicosilado cuyo patrón de señales de hidrógeno (figura 4.40) mostró en 12.61 ppm una señal simple característica del puente hidrógeno de flavonas, en 7.74 y 6.90 ppm dos señales dobles ($J= 8.6$ Hz) que integraron para dos hidrógenos cada una; en 6.40 y 6.20 ppm se apreciaron dos señales dobles ($J= 1.8$ Hz) que integraron para un hidrógeno cada una; entre 5.30 y 3.00 ppm se observaron señales características de la presencia de un azúcar; encontrándose en 5.28 ppm una señal doble (1.3 Hz) correspondiente al hidrógeno anomérico del azúcar (H-1''), en 4.97 y 3.96 ppm se apreciaron señales simples anchas correspondientes a los OH del azúcar y entre 3.45 y 0.77 ppm se observaron el resto de las señales de hidrógeno del azúcar. Con el experimento de espectroscopia de correlación (COSY, por sus siglas en inglés) (figura 4.41) se logró asignar las señales correspondientes del azúcar, atribuyéndose la señal simple ancha en 3.96 ppm al H-2'', en 3.46 ppm una señal simple ancha correspondiente al H-3'', en 3.10 y 3.05 ppm se observaron las señales múltiples asignadas a H-4'' y H-5'', respectivamente.

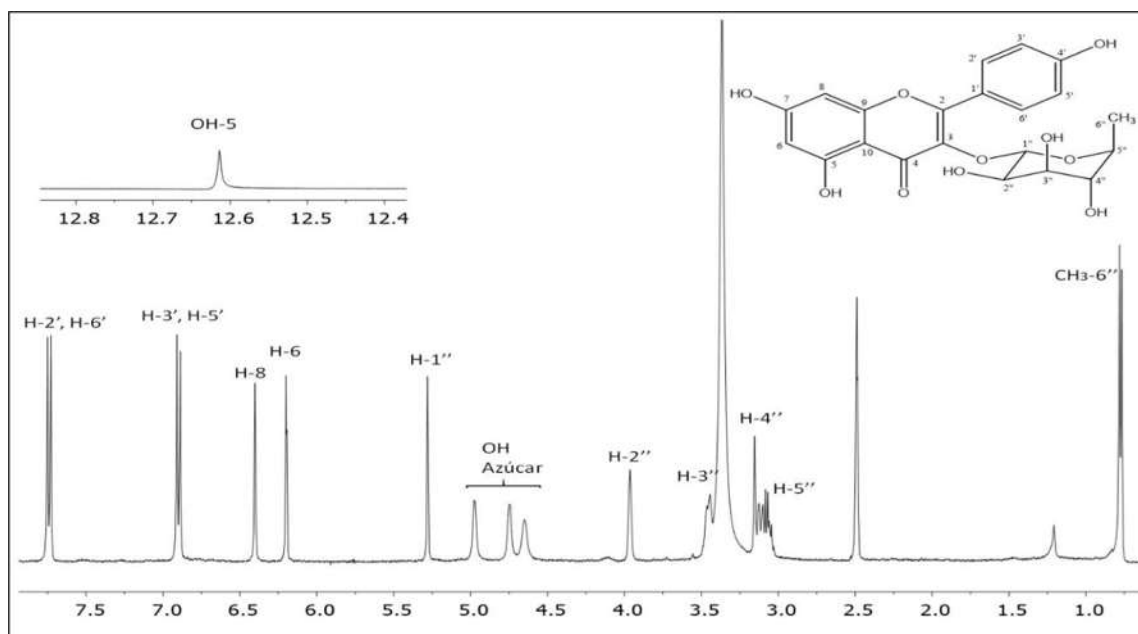


Figura 4. 40 Espectro de RMN de ^1H del Kaempferol-3-O-ramnósido obtenido de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

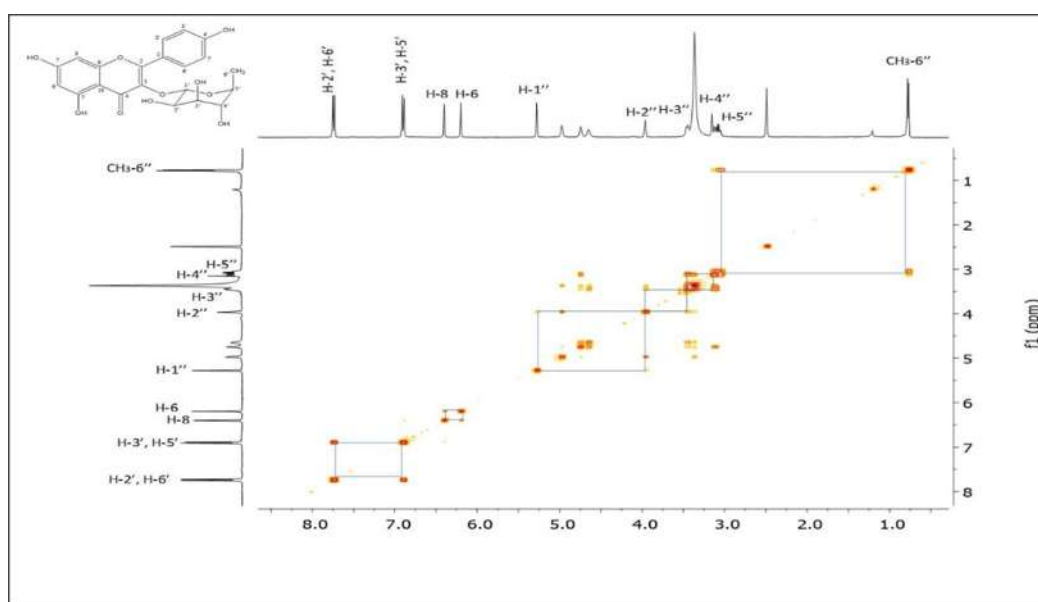


Figura 4. 41 Espectro COSY del Kaempferol-3-O-ramnósido obtenido de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Finalmente, el espectro de ^{13}C (figura 4.42) mostró 21 señales en δ (ppm) 177.7 (C-4), 164.2 (C-7), 161.3 (C-5), 159.9 (C-4'), 157.2 (C-2), 156.5 (C-9), 134.2 (C-3), 130.6 (C-2', 6'),

120.5 (C-1'), 115.4 (C-3', 5'), 104.1 (C-10), 101.5 (C-1''), 98.5 (C-6), 93.7 (C-8), 71.1 (C-4''), 70.6 (C-3''), 70.3 (C-5''), 70.1 (C-2''), 17.5 (C-6''). Los datos se compararon con la literatura en el estudio presentado por Li y col., coincidiendo éstos para el compuesto kaempferol-3-O-ramnósido [183].

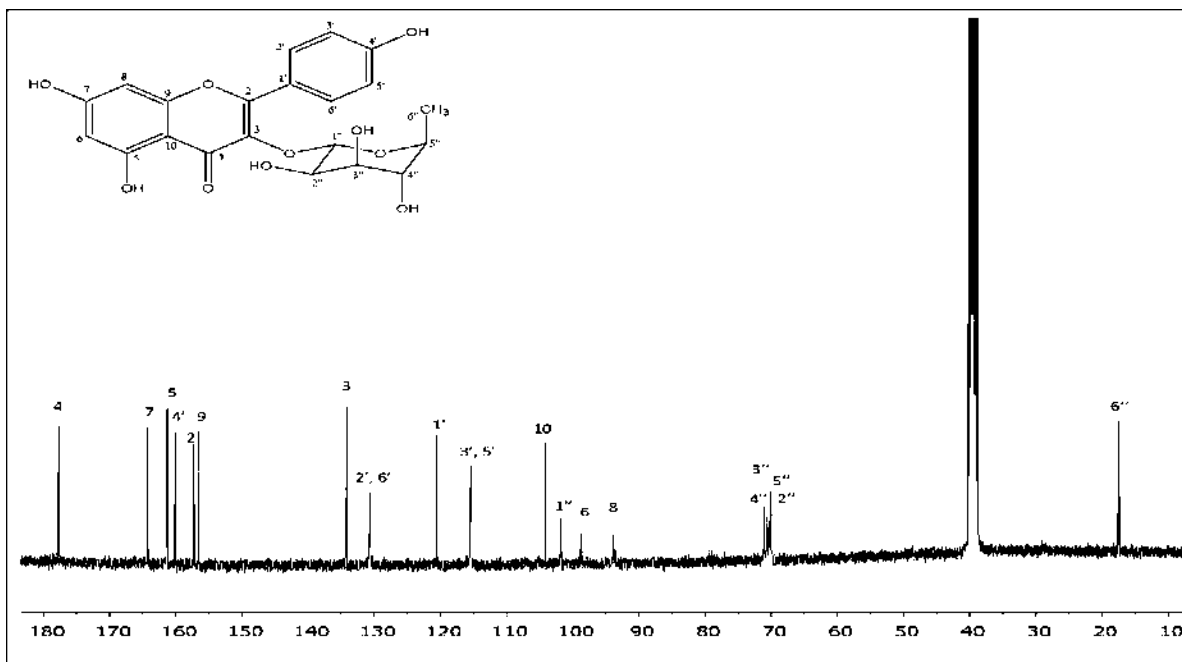


Figura 4. 42 Espectro de RMN de ^{13}C del Kaempferol-3-O-ramnósido obtenido de las partes aéreas de *Lavandula angustifolia*. (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

En manera de resumen, la maceración de las partes aéreas de la planta *Lavandula angustifolia* en MeOH mostró una mezcla compleja de compuestos, principalmente aromáticos y glicosídicos. Por esta razón, se realizaron procesos cromatográficos empleando gel de sílice como soporte y mezclas de CH_2Cl_2 - MeOH en orden ascendente de polaridad. En la fracción 4:1 (CH_2Cl_2 -MeOH) se aisló un sólido amorfo amarillo. El compuesto aislado se caracterizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C para determinar el esqueleto molecular del compuesto, dando como resultado la presencia de kaempferol-3-O-ramnósido, cuyos datos espectroscópicos fueron iguales a los de la literatura [184, 185]. Con base en este hallazgo experimental, puede proponerse que kaempferol-3-O-ramnósido está estrechamente relacionado con los procesos redox para la obtención de las nanopartículas de Ag.

Debido a la naturaleza química y a la alta capacidad antioxidante de los flavonoides [186-189], se propone un mecanismo de la síntesis de nanomateriales (figura 4.43), en donde, el kaempferol-3-O-ramnósido favorece la reducción de una molécula de AgNO_3 para generar Ag^0 (**I**). Este proceso favorece la formación del radical fenóxido en el anillo B del flavonoide (**II**). La posterior estabilización del radical **II** con ayuda del medio de reacción, o bien, de la atmósfera de reacción promueve la generación de la respectiva quinona (**III**) con la concomitante formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dicho proceso se ha sugerido en reacciones redox donde se involucran metales de transición externa e interna, incluyendo cobre, un elemento de la misma familia de la plata [190]. La presencia de ROS en el medio de reacción permite la ruptura del enlace glucosídico para generar la oxidación del anillo C (**IV**) como se ha establecido en procesos oxidativos de kaempferol [187]. El espectro de RMN de ^1H del crudo de reacción de la síntesis de AgNPs (figura 4.2) apoya esta idea, ya que se aprecian las señales características de ramnosa libre entre 5.60-5.10 ppm [191]. Continuando con el mecanismo, el medio de reacción favorece una posterior oxidación del anillo C de la flavona libre (**V**), la cual puede coexistir en equilibrio termodinámico con la tricetona **VI**. El isómero **VI** es susceptible de transformación hacia el derivado procatecólico **VII** con ayuda del medio de reacción. La banda de absorción característica de **VII** se aprecia en el espectro de UV-Vis de las AgNPs en alrededor de 255 nm [192], sugiriendo que esta clase de derivados se encuentran estabilizando el nanomaterial sintetizado (**VIII**), cuyas interacciones son favorecidas, como se ha descrito en la literatura [185]. Es bueno considerar que la síntesis de AgNPs podría favorecerse por la acción redox del benzofurano **VIII**, el aducto **VIII**, o por kaempferol-3-O-ramnósido, y que la presencia de grupos OH en estas moléculas favorecen la estabilización química del nanomaterial, así como su control de crecimiento [193-197].

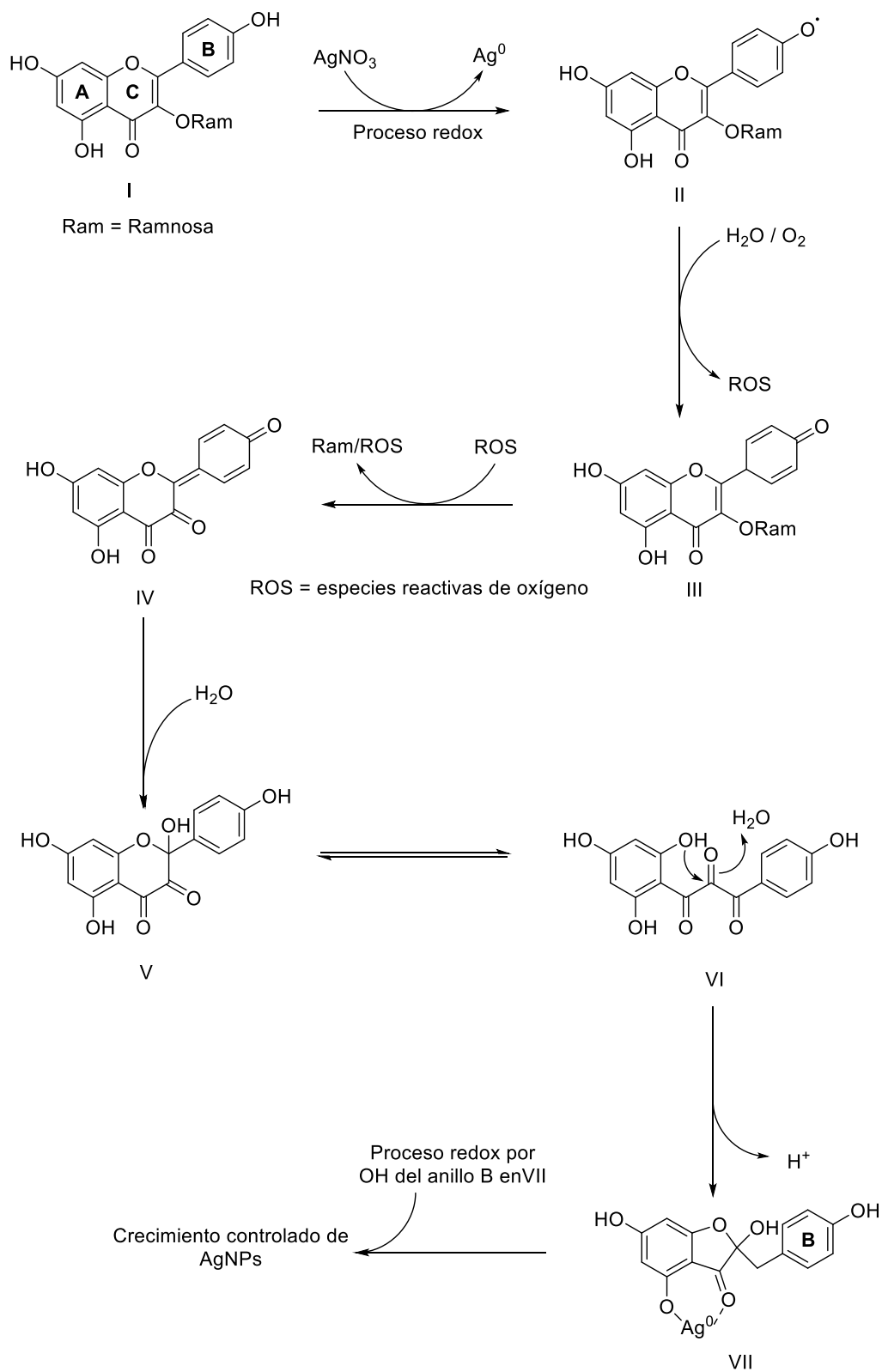


Figura 4. 43 Mecanismo químico del proceso de formación de nanoestructuras de Ag empleando la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor-estabilizador.

El segundo esquema (ver figura 4.44) es una representación de las etapas del proceso de formación a partir del crecimiento de los cristales. La figura 4.44a ilustra del crecimiento de los cristales de Ag sin emplear otra sal externa, en donde el primer paso consiste en la sobresaturación del sistema favoreciendo a la segregación de la solución [39]. La reducción de la energía global de Gibbs formará una fase sólida con el objetivo de mantener el equilibrio en la solución. Esta fuerza impulsora de la nucleación consiste de dos términos, los cuales son un volumen de transición líquido-sólido y una superficie de formación. Posteriormente, un núcleo recién formado será estable, hasta que alcance un radio crítico (r^*), el cual es dependiente de los parámetros establecidos en el procedimiento experimental, siendo la concentración del extracto y la sal precursora para el caso de las AgNPs. En el siguiente paso, existirá el crecimiento subsecuente del núcleo mediante coaliciones de las partículas entre ellas y sumándose mediante un fenómeno conocido como maduración de Ostwald. Finalmente, éstas al estar ligadas al compuesto orgánico quedarán atrapadas por el mismo el Kaemferol-3-O-ramnósido que servirá como estabilizante estérico.

Como complemento la figura 4.44b revela el mecanismo propuesto para las nanoestructuras empleando las sales de cobre los cuales consisten en la formación de pequeñas agrupaciones atómicas de Cu o AgCl, las cuales comenzarán a ser envueltas por una gran cantidad de núcleos de Ag por medio de un proceso de nucleación heterogénea. Una vez formada la partícula de Ag continuará el crecimiento a través de un proceso de nucleación secundaria. A partir de aquí se los AgNWs crecen bajo la influencia de la nucleación del cristal formado. Para el caso de sales de Cu, los iones de Cu(I) saturan rápidamente la solución mediante la eliminación de los átomos de oxígeno de la superficie de las semillas de plata, evitando que los átomos de oxígeno bloqueen el crecimiento de las nanoestructuras de plata y limitando el grabado oxidativo [48].

En pocas palabras, se forman partículas del tipo MTP, las cuales mediante coaliciones con otras partículas crecerán en una dirección preferencial [100] hasta la formación de los nanoalambres de Ag, los cuales al continuar el proceso de coalescencia con otro material reducido aumentarán su relación de aspecto evolucionando a las famosas nanocintas discutidas con anterioridad (ver sección 4.7). Finalmente, el material se plegará tanto sobre sí misma que terminarán formando las esferas en forma de nanoestambres.

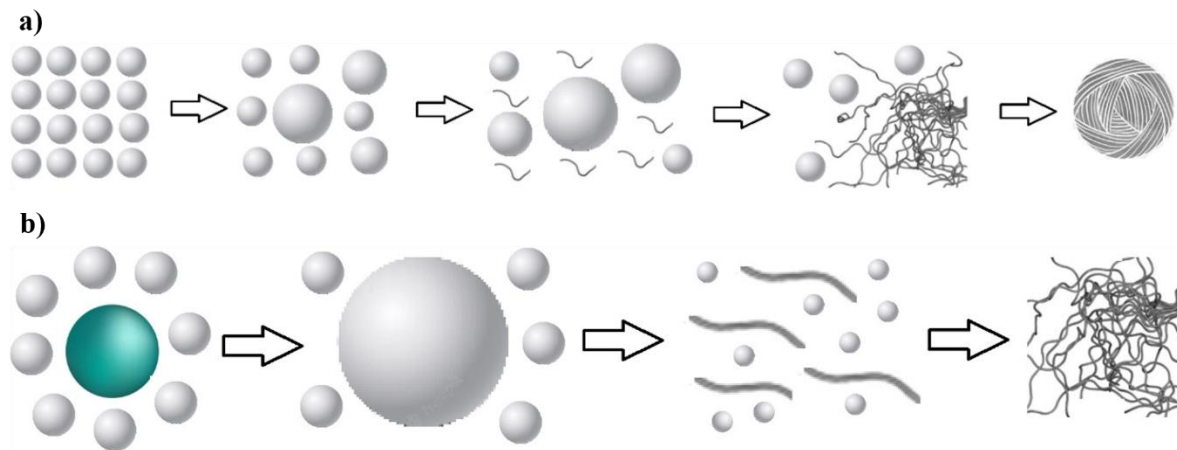


Figura 4. 44 Mecanismo de crecimiento de las nanoestructuras Ag obtenidas.

4.9 Ensayos biológicos.

En esta sección se presentan los resultados de la evaluación de los mejores nanomateriales obtenidos en dos microorganismos diferentes como son las levaduras y bacterias. El objetivo principal de realizar las mediciones en los microorganismos se debe a que las levaduras fungen como modelos celulares eucariota, es decir, su estructura celular se asemeja a la de los mamíferos, por lo tanto, podemos relacionar su toxicidad con las células de los humanos. Por otra parte, se conoce que los iones de Ag tienen capacidad bactericida, al igual que las AgNPs, por ello es importante determinar el comportamiento de la Ag sólida en diferentes formas y tamaños.

4.9.1 Determinación de la concentración empleando espectroscopia de absorción atómica

Uno de los objetivos trazados en el presente proyecto es el conocer la toxicidad de los nanomateriales sintetizados, por esta razón, es importante la determinación de su concentración, en donde, ésta se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica, mediante la cuantificación de Ag^+ sin reaccionar en el proceso de reducción. La concentración de iones fue calculada en función de la curva ajustada de las soluciones estándar (ver figura 4.45). Para la medición de la muestra, ésta se lavó a partir de centrifugaciones diluyendo el precipitado en H_2O desionizada y se verificó mediante espectroscopia UV-Vis que el sobrenadante no presentará banda de plasmón de superficie.

Una vez corroborado lo anterior, la muestra fue medida obteniendo un valor de absorbancia, el cual fue relacionado con la curva patrón. Lo mismo ocurrió para la solución acuosa de la sal AgNO_3 a la concentración de partida. Es importante mencionar que se realizó la suposición de que todo el material reducido pertenece a las nanoestructuras de Ag, así que la diferencia entre los iones de la solución original y la del sobrenadante sin plasmón SPR, es la que corresponde a la concentración aproximada. Por lo tanto, la concentración determinada fue de 457 y 381 ppm con una eficiencia del proceso de reducción de aproximadamente el 84 y 70 % para las AgNPs y las nanocintas (ver apartado 4.7) sintetizadas usando la sal acetato de cobre a concentración 2.5 mM, respectivamente.

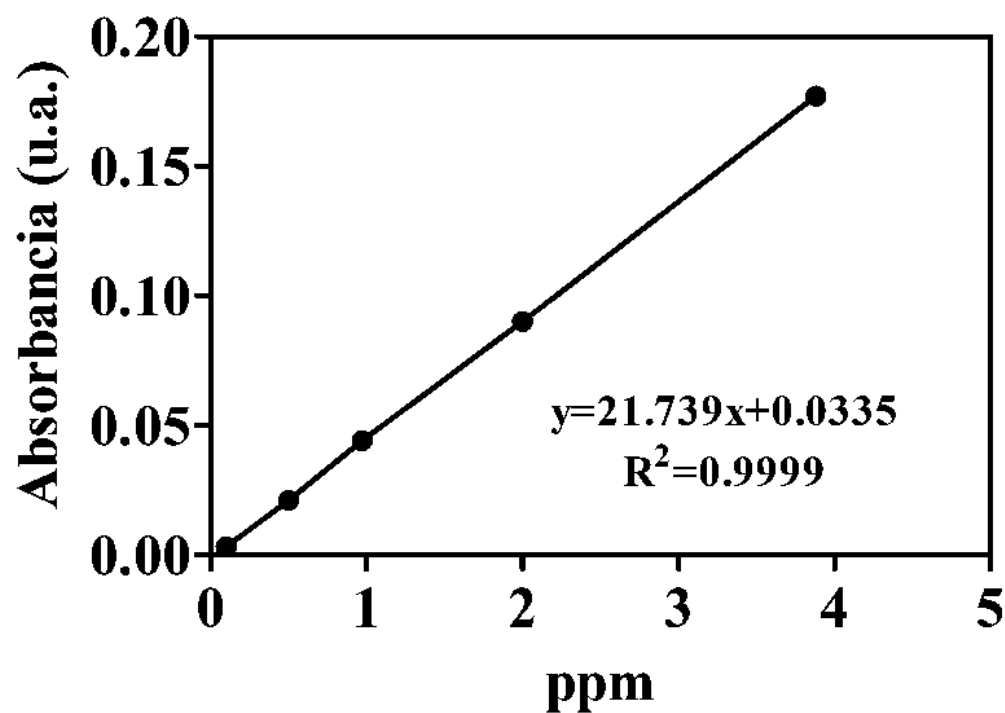


Figura 4. 45 Curva estándar de iones de Ag para cálculo de la concentración.

4.9.2 Determinación del crecimiento celular en levaduras con AgNPs

Se realizaron dos ensayos para comprender y explicar el comportamiento de las 4 cepas de levaduras al ser expuestas a un agente externo como lo son las AgNPs. A lo largo del análisis y descripción de los resultados se explican algunos desafíos presentados.

La figura 4.46 muestra el crecimiento de 4 cepas de levaduras expuestas a diferentes condiciones experimentales como lo son: extracto de planta *Lavandula angustifolia* (0.02 g/ml o 20 ppm), AgNPs (222 ppm) y la sal precursora AgNO₃ (528 ppm). Las cuatro cepas en el medio YPD se emplearon como controles para el ensayo. La figura 4.46a presenta la evaluación de 100 µl de las diferentes soluciones en la cepa *Saccharomyces cerevisiae MC4*, indicando una disminución en el crecimiento de aproximadamente un 20% para la infusión de la planta *Lavandula angustifolia* y las AgNPs. Por otro lado, las levaduras incubadas con la sal precursora AgNO₃ mostraron una disminución de hasta un 50% en su crecimiento. Por lo tanto, la Ag en forma de nanopartículas presentó menor toxicidad en comparación con las formas iónicas. La figura 4.46b muestra una comparación similar con la levadura *Kluyveromyces marxianus OFF1*, sin cambios significativos en su crecimiento. Lo destacado en esta cepa fue el incremento en el crecimiento de la levadura por parte de la solución salina AgNO₃. La figura 4.46c muestra los resultados de las diferentes soluciones evaluadas con la cepa *Kluyveromyces marxianus SLPI* presentando un crecimiento superior al control para cada una de ellas. Lo anterior, es causado por los azúcares y otros compuestos orgánicos presentes en las soluciones [198-200]. Finalmente, la figura 4.46d ilustra las soluciones evaluadas en la cepa *Saccharomyces cerevisiae W303*, en donde es apreciable una disminución de aproximadamente un 10% para la solución con AgNPs. Estos resultados mostraron que 100 µl de AgNPs (222 ppm) no mostraron cambios significativos en el crecimiento, esto se debe a las cepas incubadas indicaron un efecto similar a aquellas sin tratamiento. Es importante mencionar, que en las cepas del género *Kluyveromyces marxianus* y la *Saccharomyces cerevisiae W303* expuestas a la sal precursora presentaron un incremento en el crecimiento en comparación al control causado por el estrés en ellas, en respuesta a la modificación del pH provocada por la adición de la sal AgNO₃ [201-203].

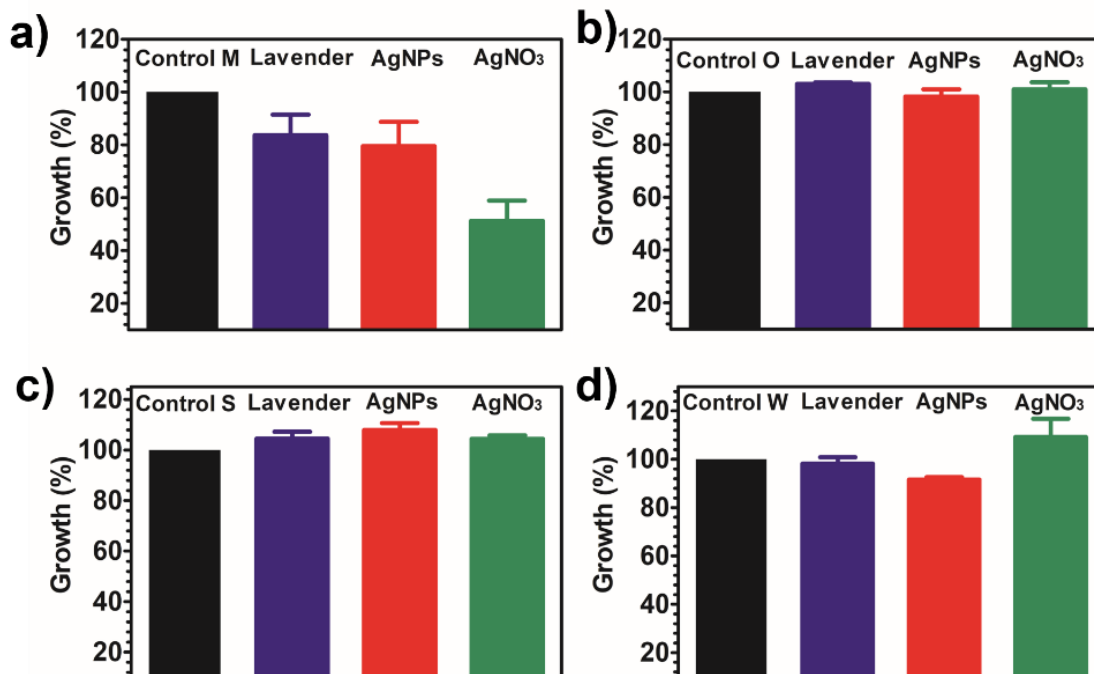


Figura 4.46 Ensayo de crecimiento celular en distintas cepas de levaduras a) *S. cerevisiae* MC4 b) *K. marxianus* OFF1 c) *K. marxianus* SLP1 d) *S. cerevisiae* W303 [120].

En otro orden de ideas, es apreciable que las cepas del género *Kluyveromyces marxianus* mostraron mayor resistencia en comparación con las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se comprobó que la sal precursora AgNO₃ fue la solución que presentó mayor toxicidad, este resultado es interesante, porque el efecto de los iones y nanosólidos de Ag es completamente diferente [204-206], esto puede ser atribuido por los agentes estabilizantes involucrados en el proceso de síntesis del nanomaterial, ya que los compuestos orgánicos pueden fungir como los encargados de reducir la toxicidad al momento de rodear las estructuras inorgánicas de plata. Otros estudios como el de Lee y col. [207] han trabajado en el crecimiento celular de levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, esta investigación se centra en la evaluación de la inhibición de la proliferación de AgNPs de 5 y 100 nm en células fúngicas, obteniendo mejores resultados inhibitorios para aquellas nanopartículas con tamaños de 5 nm, demostrando que el crecimiento se suprime dependiendo de la cepa, tamaño del nanomaterial y dosis a la que se expone el microorganismo. Además, el mecanismo de inhibición es independiente de la generación de radicales libres (ERO).

4.9.3 Determinación de la viabilidad celular en levaduras con AgNPs

El ensayo MTT es responsable de determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La figura 4.47 muestra el efecto de las diferentes soluciones AgNPs (222 ppm), extracto vegetal (0.02 g/ml o 20 ppm) y AgNO₃ (528 ppm) en las cuatro cepas de levadura estudiadas. Es importante mencionar, que las AgNPs no presentaron un cambio significativo en la viabilidad celular para *Saccharomyces cerevisiae* MC4 (figura 4.47a). Por el contrario, la funcionalidad metabólica de las levaduras expuestas a la sal de AgNO₃ mostraron una disminución de hasta aproximadamente el 50%. La figura 4.47b no muestra un daño significativo en la cepa de *Kluyveromyces marxianus* OFF1 con la solución de AgNPs. La cepa de *Kluyveromyces marxianus* SLP1 tiene la mejor resistencia al daño celular (figura 4.47c), porque no muestra ningún cambio significativo en el extracto de la planta, las AgNPs y la solución salina de AgNO₃. Finalmente, la figura 4.47d muestra los resultados obtenidos para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* W303 después del tratamiento, en el cual se observó una reducción en la viabilidad de aproximadamente un 30% cuando fue adicionada la sal precursora AgNO₃. Como se mencionó con anterioridad, la toxicidad depende de diversos factores del nanomaterial como la morfología, tamaño y dosis administrada. Sin embargo, el microorganismo evaluado y la técnica realizada son también factores a considerar. Para realizar un comparativo de lo realizado en el presente trabajo, hablaremos un poco del estudio realizado por Solemaini y col. [204], donde se evaluó el ensayo de viabilidad MTT en células MCF-7 presentando resultados de toxicidad para concentraciones superiores a las 10 ppm independientemente de la forma de la nanoestructura de Ag. Por otro lado, Guerra y col. [208] estudiaron la toxicidad de AgNPs de forma poligonal de tamaño aproximado de 35 ± 15 nm en los microorganismos *Candida tropicalis* (hongos patógenos) y *Saccharomyces boulardii* (probiótico), donde se demostró que es necesario 25 µg/ml (25 ppm) para inhibir el 90% del crecimiento celular de *Candida tropicalis*. Sin embargo, a la concentración de 25 µg/ml (25 ppm), el 50% de la población de células de *Saccharomyces boulardii* sigue siendo viable, siendo capaz de potenciar la reproducción celular.

En manera de resumen, se puede enunciar que los resultados anteriores mostrados en el presente apartado, indican que las nanopartículas no provocan una disminución en los procesos metabólicos celulares estudiados en las cuatro cepas. Para el caso de la adición de

la sal precursora AgNO_3 , la viabilidad celular demostró que la toxicidad fue mayor para la Ag en forma iónica en comparación con el nanomaterial. Por otro lado, se comprobó que la infusión de la planta *Lavandula angustifolia* puede favorecer la viabilidad en comparación con el control, atribuido a la presencia de flavonas glucosiladas.

Es importante mencionar, que esta sección del trabajo se culminó antes de la pandemia causada por el COVID-19, por esta razón, se trabajó por separado de las nanoestructuras de Ag. Sin embargo, se logró publicar un artículo de carácter internacional en ese tiempo que no hubo disposición de laboratorios, gracias al conjunto de datos referentes a la síntesis y caracterización de las AgNPs (ver artículo en la sección anexa a la tesis al final del documento). A causa de lo antes mencionado, no se siguió trabajando la evaluación de las AgNPs en levaduras.

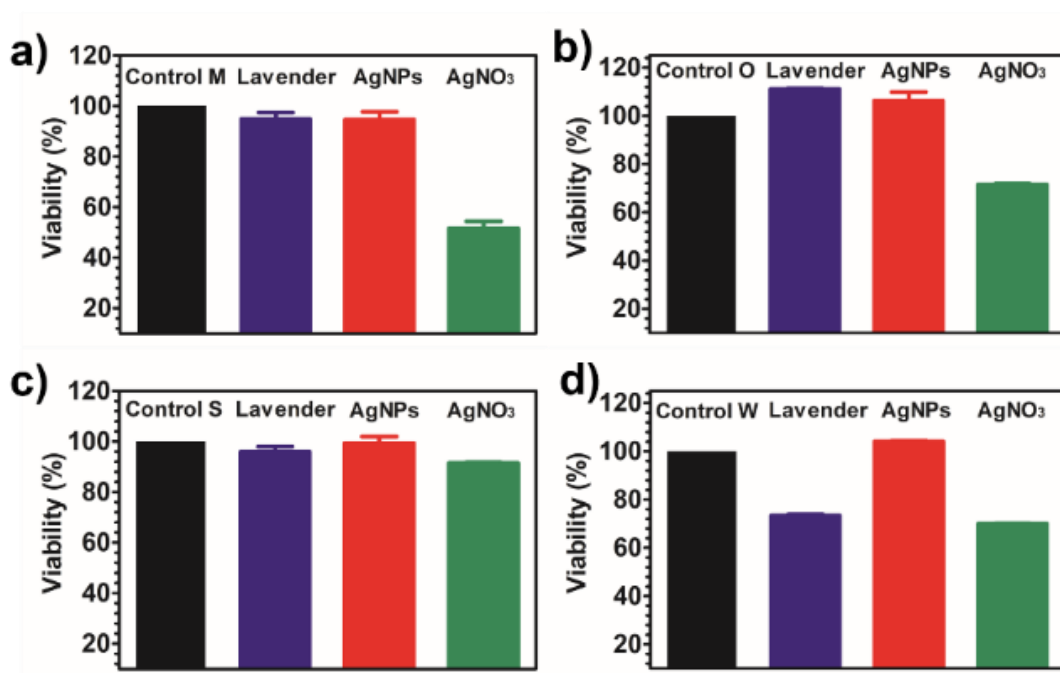


Figura 4.47 Ensayo de viabilidad celular en distintas cepas de levaduras a) *S. cerevisiae* MC4 b) *K. marxianus* OFF1 c) *K. marxianus* SLP1 d) *S. cerevisiae* W303 [120].

4.9.4 Determinación del crecimiento celular en levaduras con nanoestructuras de Ag

A continuación, se presenta una imagen que muestra los resultados obtenidos en el ensayo de crecimiento celular en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* MC4 para las estructuras

superiores obtenidas en el presente trabajo. Para este ensayo no se tomó en cuenta el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, debido a que ya se discutió su efecto en el apartado anterior, no obstante, el AgNO_3 si se tomó en cuenta debido a que es importante mostrar el comparativo entre la diversidad de nanoestructuras de Ag, en especial la de los iones, donde fue observado el mayor efecto. En la figura 4.48 se ilustra el comparativo de diferentes nanoestructuras de Ag, es de suma importancia comentar que la concentración de evaluación fue de 222 ppm. Se eligió esta concentración debido a que puede ser comparada con los ensayos de AgNPs. Primeramente, a la izquierda de color azul se identifica la muestra sin ningún tratamiento o agente externo que interrumpa el crecimiento de la levadura, por ello, representa el 100 % de crecimiento debido a que es el control del ensayo. En color rojo se aprecia la muestra AgAcCu M1 que representa las nanocintas sintetizadas a partir de la sal acetato de Cu la cual mostró un crecimiento superior al 3% en comparación al control. Sin embargo, la muestra AgNi M2 que son las nanoesferas compuestas de arreglos de láminas delgadas 2D exhibieron un crecimiento superior de aproximadamente el 30 %. La barra en morado representa las mismas condiciones que AgAcCu M1, sin embargo, la diferencia radica en que la muestra Ag AcCu ext no tuvo un lavado en diferentes etapas como las demás evaluadas. Para este caso es notorio un crecimiento de la cepa superior del 10% y del 7% en comparación de los ensayos sin tratamiento y su similar lavada, respectivamente. Definitivamente, el crecimiento fue favorecido por las sustancias remanentes del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*.

A continuación, hay 3 muestras denominadas F1, F2 y F3 que son AgNPs formadas a partir de diferentes especies de sargazo, las AgNPs están lavadas, redispersadas en agua desionizada y se sintetizaron con una concentración de 5 mM de la sal precursora, que fue la misma empleada en el caso de la planta *Lavandula angustifolia* con anterioridad. Por consiguiente, usaremos solo el término de 5 mM para estas muestras debido a que es necesario emplear una técnica de cuantificación para conocer el rendimiento. Aquí, es notorio que F1 contuvo una reducción en el crecimiento de aproximadamente el 27 %, siendo la muestra sólida que más influyó. En el caso de F2 y F3 su reducción fue muy similar siendo del 5% y del 3 %, respectivamente. Por último, los Ag^+ disminuyó el crecimiento celular en aproximadamente el 45 %, acercándose casi a la mitad de la población estudiada, reafirmando

los resultados analizados y discutidos en el apartado referente al crecimiento celular con levaduras.

En resumen, la interrupción del crecimiento celular depende totalmente de la forma de la Ag, ya sea iónica o metálica, siendo más alta su toxicidad para el caso los Ag^+ . También, la forma y tamaño de las nanoestructuras juegan un papel importante en su toxicidad, debido a que las de menor tamaño exhibieron mayor efecto en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* MC4, coincidiendo este resultado con lo mencionado por otros autores en sus investigaciones en diferentes modelos biológicos [209-212]. Por esta razón, podemos concluir que el efecto presentado fue inversamente proporcional donde a mayor tamaño, se presentó menor efecto.

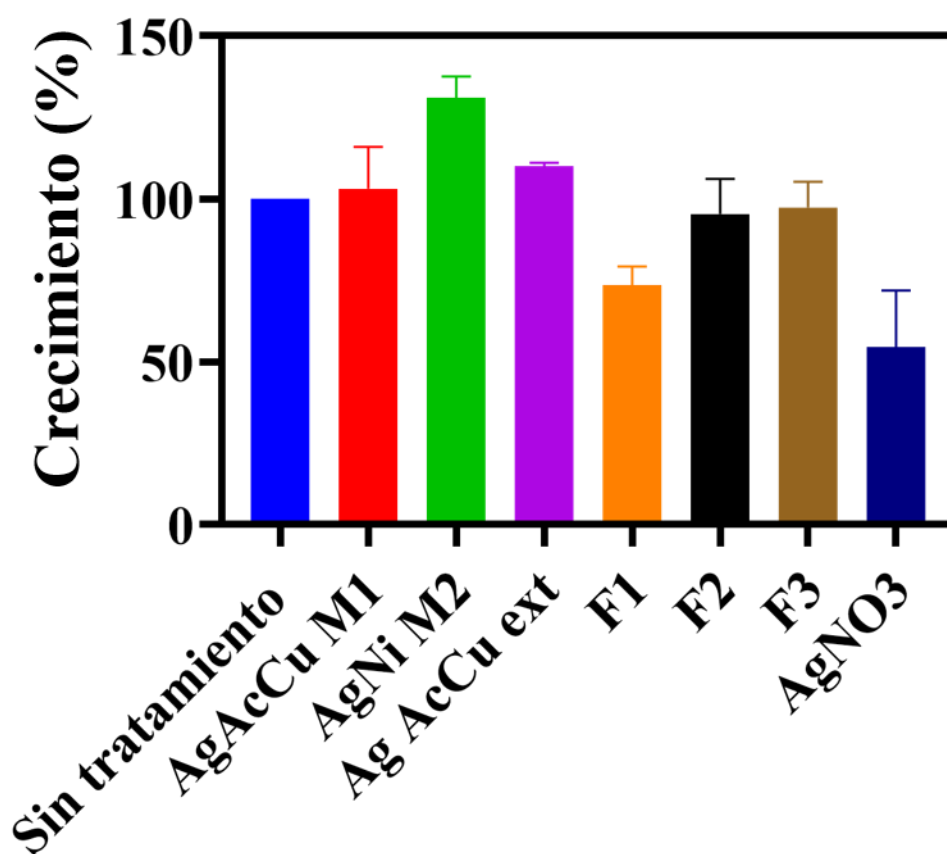


Figura 4. 48 Comparativo de la evaluación de nanoestructuras de Ag en el ensayo de crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* MC4.

4.9.5 Determinación de la viabilidad celular en levaduras con nanoestructuras de Ag mediante el ensayo de exclusión con azul de Tripano.

En la figura 4.49 (a-d) se presenta un agregado de imágenes, los cuales complementan la evaluación biológica de los nanomateriales sintetizados empleando la planta *Lavandula angustifolia*. En este ensayo, se puede apreciar un panorama de las muestras, vistas a través del microscopio óptico. Es necesario recordar que la técnica consiste en evaluar el número de células que sufren una tinción total mediante el colorante azul de Tripano, es decir, aquellas que no presenten tinción o solo presenten un halo de color azul, serán células totalmente viables. Sin embargo, como es perceptible, ninguna de las imágenes presentó células completamente teñidas de color azul, lo que significó nulo daño de parte de las diferentes muestras. El panel a) corresponde al control del ensayo, es decir aquella muestra que no emplea ningún tratamiento o está sujeto a un factor externo, el panel b) es el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* a la concentración evaluada en el ensayo de viabilidad celular MTT (0.02 g/ml o 20 ppm).

Para el caso de los nanomateriales, también, se evaluaron los mejores resultados observados en el presente trabajo, siendo AgNPs (222 ppm) sintetizadas con la planta *Lavandula angustifolia* (figura 4.49c) y las nanocintas de Ag (222 ppm), empleando la sal acetato de cobre como nucleante (ver figura 4.49d), donde ninguna de las nanoestructuras presentó daño significativo sobre las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae MC4*, coincidiendo con lo analizado en el ensayo de viabilidad MTT. Sin embargo, el panel e) donde se exhibe el daño por parte de la sal AgNO_3 (528 ppm) tampoco mostró efectos significativos, contraponiéndose a la idea anteriormente expuesta. Cabe destacar que la muestra se realizó por triplicado en experimentos independientes, los cuales arrojaron los mismos resultados. También, aunque no se anexa una imagen al presente trabajo, es importante comentar que se analizó la sal AgNO_3 a una concentración de 20 mM (2112 ppm), la cual es considerada muy elevada para los análisis biológicos, la cual proporcionó resultados similares al conjunto de todas las muestras. Por esta razón, concluimos que este ensayo no fue adecuado para la evaluación de la viabilidad celular en una primera instancia, por lo tanto, se debe considerar prioritariamente, realizar un estudio general a través de la técnica MTT como lo fue para las AgNPs. En resumen, podemos determinar que de acuerdo a los resultados obtenidos se

necesita elevar la concentración del material, debido a que las muestras no presentaron una tinción total de color azul, lo que significó células viables con membranas celulares intactas, ya que éstas son muy selectivas con los compuestos que dejan pasar, por ende, al no absorber el azul de Tripano al interior celular, se concluyó que siguió con su funcionamiento adecuado.

4.10 Evaluación antibacterial de AgNPs y nanocintas de Ag

El primer ensayo cualitativo que se realizó fue el de difusión de disco (Kirby-Bauer), el cual consistió en la impregnación de discos de papel filtro previamente esterilizados con las soluciones sujetas a estudio. La figura 4.50 (a-b) presenta el control positivo del ensayo en las cepas estudiadas (*E. coli* y *S. aureus*). La sal precursora AgNO_3 fue elegida como el control del ensayo, debido a que por años es conocido que los iones de Ag presentan efecto antibacterial. De hecho, el mecanismo de daño hacia las bacterias se asocia con la desnaturalización del ADN, evitando así su replicación [213, 214]. En la figura 4.50a se observa la formación de halos de inhibición para cada una de las concentraciones estudiadas (25, 50 y 100 ppm), en donde es notorio un diámetro similar para cada una de ellas, lo que indica que se requiere de una concentración baja para que inicie el efecto antibacterial en la cepa *E. coli*.

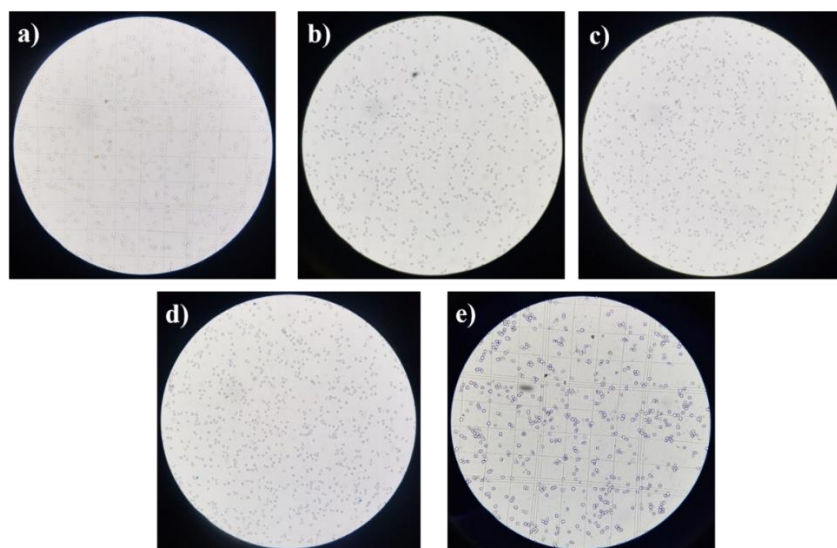


Figura 4. 49 Exclusión por azul de Tripano en *Saccharomyces cerevisiae* MC4 a) sin tratamiento, b) *Lavandula angustifolia*, c) AgNPs, d) nanocintas de Ag y e) AgNO_3 .

Por otro lado, en el apartado de la figura 4.50b se identificó un aumento en los halos de inhibición a medida que se incrementó la concentración, lo que significa que en el caso de *S. aureus* presenta menor sensibilidad en comparación a la cepa *E. coli*.

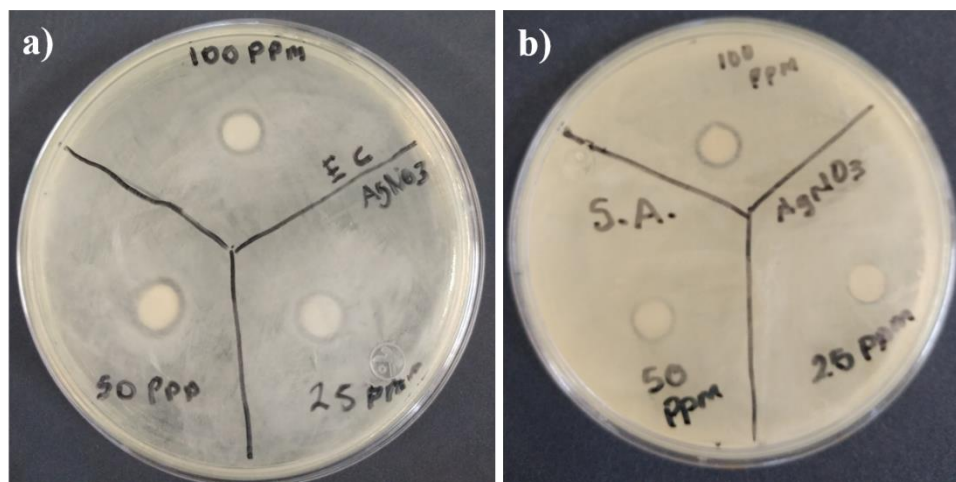


Figura 4. 50 Evaluación del poder antibacterial del AgNO_3 a diferentes concentraciones a) *E. coli* y b) *S. aureus*.

Por otro lado, la figura 4.51 (a-b) ilustra el ensayo correspondiente a las nanoestructuras de Ag y el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* en la cepa *E. coli*. Primeramente, la figura 4.51a presenta la evaluación antibacterial de las AgNPs, en donde se aprecia que, a concentraciones bajas, éstas no tuvieron efecto antimicrobiano, sin embargo, para la concentración más alta (100 ppm), se presentó un halo de inhibición que pudiera ser considerado como efecto tóxico hacia las bacterias, no obstante, es necesario realizar el ensayo MIC para confirmar lo identificado. Para el caso de las nanocintas de Ag identificada con la leyenda AgNWs presentados en la figura 4.51b, no se identificaron halos de inhibición, esto se debe a que las nanoestructuras 1D no pueden entrar en contacto directo con las bacterias al ser de un tamaño superior al de las AgNPs. Para el caso del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* tampoco se observó mecanismo de daño, esto es bueno para nosotros, ya que, si se encontrará un efecto bactericida en alguna evaluación, éste tiene que ser atribuido en su totalidad al nanomaterial. Debido a que la planta no presentó toxicidad, se puede considerar como otro indicativo positivo para ser evaluado en sistemas relacionados a la salud humana para su biocompatibilidad. Baygar y col. [215] realizaron estudios similares de acuerdo a lo mencionado con anterioridad, en su trabajo se puede identificar la recubierta

de suturas químicas con AgNPs evaluando su actividad antimicrobiana en *E. coli* y presentando buenos resultados.

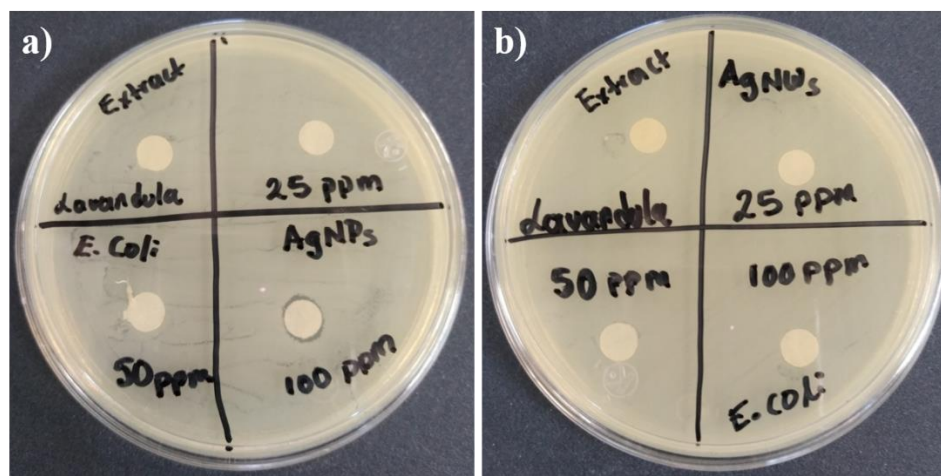


Figura 4. 51 Método Kirby-Bauer en *E. coli* de a) AgNPs y b) AgNWs a diferentes concentraciones.

También, se puede apreciar en la figura 4.52 (a-b) la evaluación de los nanomateriales en la cepa *S. aureus*, en donde fácilmente se identificó nula inhibición para las concentraciones sujetas a estudio, reafirmando que este tipo de cepa presenta mayor resistencia a diversos agentes antimicrobianos de Ag en comparación con la cepa *E. coli*.

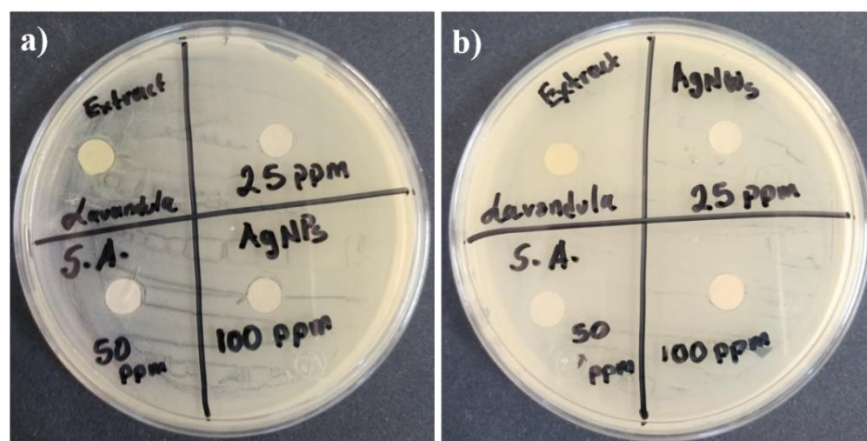


Figura 4. 52 Método Kirby-Bauer en *S. aureus* de a) AgNPs y b) AgNWs a diferentes concentraciones.

Es importante mencionar que las concentraciones de partida se seleccionaron de acuerdo a un estudio previo realizado por el autor del presente trabajo, con el objetivo de cerrar un ciclo

de concentraciones en 2 modelos celulares distintos. Por esta razón, a partir de los resultados identificados, se realizó el estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en un barrido de concentraciones que comprendieron 1, 5, 15, 25, 35, 50 y 100 ppm. La causa principal de bajar la concentración en primera estancia se debe a que en ocasiones los fenómenos nanométricos son distintos a los macrométricos, esto quiere decir que no siguen las reglas de a mayor concentración el daño en el organismo es superior [216].

Por ello, en la figura 4.53 se muestra el análisis MIC del control positivo y negativo con el objetivo de explicar el criterio de selección de las muestras, para posteriormente colocar el líquido al disco de la prueba de agar nuevamente. Como se explicó en la sección experimental, el análisis MIC requiere dos pasos consecuentes. El primero consiste en realizar una mezcla con tres factores, los cuales son, inóculo previamente incubado (ambas cepas), caldo nutritivo y la solución a evaluar (nanomateriales o extracto). Es apreciable en la figura 4.53 una diferencia de turbidez entre las soluciones que contuvieron el extracto y la sal precursora AgNO_3 , siendo esta mayor para la primera. Por esta razón, aquellas soluciones que presentaron claridad en el medio, se relacionaron con una inhibición parcial de los microorganismos. Por lo tanto, las muestras turbias fueron desechadas y las claras fueron incubadas en una siguiente etapa que consistió en evaluar 10 μl por medio de una gota en el agar sólido de las cajas de Petri.

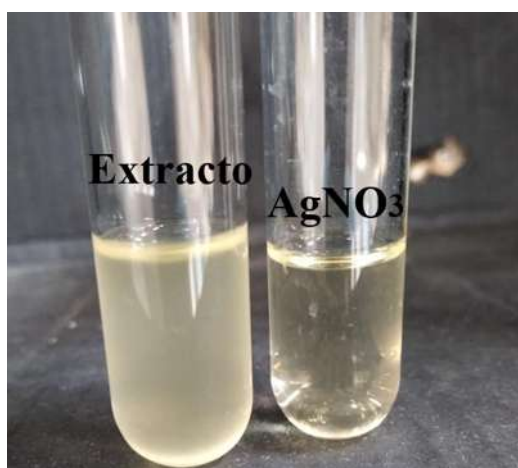


Figura 4. 53 MIC en caldo Mueller-Hinton del control positivo y negativo del ensayo.

Por otro lado, la figura 4.54 (a-b) ilustra las muestras seleccionadas por los criterios mencionados con anterioridad. En el apartado de la figura 4.54a se puede apreciar la

evaluación de AgNPs a concentraciones de 35, 50 y 100 ppm, en donde es notoria la presencia de crecimiento microbiano para cada una de las concentraciones, aunque 100 ppm presentó inhibición parcial. También, se puede destacar de la imagen, que la Ag en forma de iones presentó efecto antimicrobiano, concluyendo así, que el mecanismo de acción es diferente al de materiales nanoestructurados como fue el caso de las nanocintas de Ag. Por otra parte, en la figura 4.54b se identificó que tanto el AgNO_3 como los AgNWs presentaron inhibición para la cepa *S. aureus*. Cabe destacar, que esta prueba es más contundente en comparación a la del disco de inhibición, ya que este ensayo es cuantitativo. Este análisis fue comparado con lo realizado por Ozturk y col. [148], los cuales evaluaron AgNPs comprendidas entre 20-50 nm en las cepas bacteriana *E. coli* obteniendo una MIC de aproximadamente 260 ppm. Diversos autores mencionan que la capacidad antibacteriana depende de diversos factores tales como tamaño, forma, estructura, la dispersión [217], y el proceso de síntesis por el cual fue elaborado, debido a que el agente estabilizante puede causar una disminución del efecto bactericida.

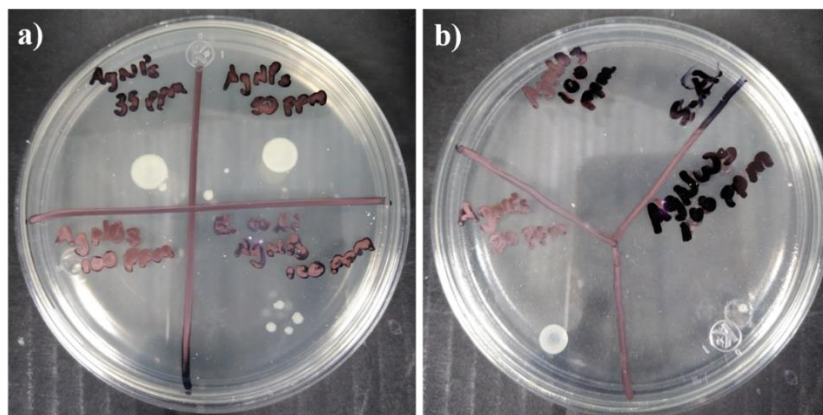


Figura 4. 54 Prueba MIC en agar Mueller-Hinton de las muestras seleccionadas a) *E. coli* y b) *S. aureus*.

Como complemento, se evaluaron aquellas soluciones que no fueron lavadas, es decir las nanoestructuras inmersas en el extracto, en conjunto del sobrenadante que se analizó para EAA en ambas cepas, con el objetivo de relacionar el efecto antibacteriano con la forma química de la plata y su concentración. Para identificar unas muestras de las otras, aquellas con la leyenda directa corresponden a las soluciones sin proceso de purificación, mientras que las denominadas como S1 se relacionan con el sobrenadante 1 proveniente del proceso

de centrifugación. En la figura 4.55a es apreciable que el halo de inhibición es menor para aquellas muestras sin proceso de lavado en el caso de la cepa *E. coli*, sin embargo, en la figura 4.55b la muestra de nanocintas de Ag (AgNWs), sin un proceso de lavado, ésta no presentó halo de inhibición en comparación con las AgNPs sin lavar y los sobrenadantes resultantes de ambas nanoestructuras. De esta manera, se puede relacionar que las sustancias que presentaron un mayor diámetro en el halo de inhibición son las denominadas sobrenadantes, esto coincide con la mayoría de los ensayos realizados ya que el poder bactericida es mayor para la Ag iónica en comparación a la forma sólida. Esto se debe, a que los iones son más reactivos y presentan una mejor disposición al rodear la célula bacteriana con mayor facilidad, causando daños de reacción en cadena, debido a que los Ag^+ deterioran la pared celular, reaccionan con enzimas desnaturalizándolas, generan especies reactivas de oxígeno y finalmente fragmentan el ADN.

En otro orden de ideas, las AgNPs sin lavar presentaron efecto inhibitorio debido a una combinación de iones de Ag y nanopartículas, así como una alta concentración de éstas. Finalmente, en el caso de las nanocintas de Ag (AgNWs), fue notoria su falta de inhibición a medida que se incrementó la concentración, esto es atribuido a que en ocasiones la longitud o plegamiento de las nanoestructuras es superior al tamaño bacteriano, lo que significa que no hay contacto directo entre el nanomaterial y el microorganismo.

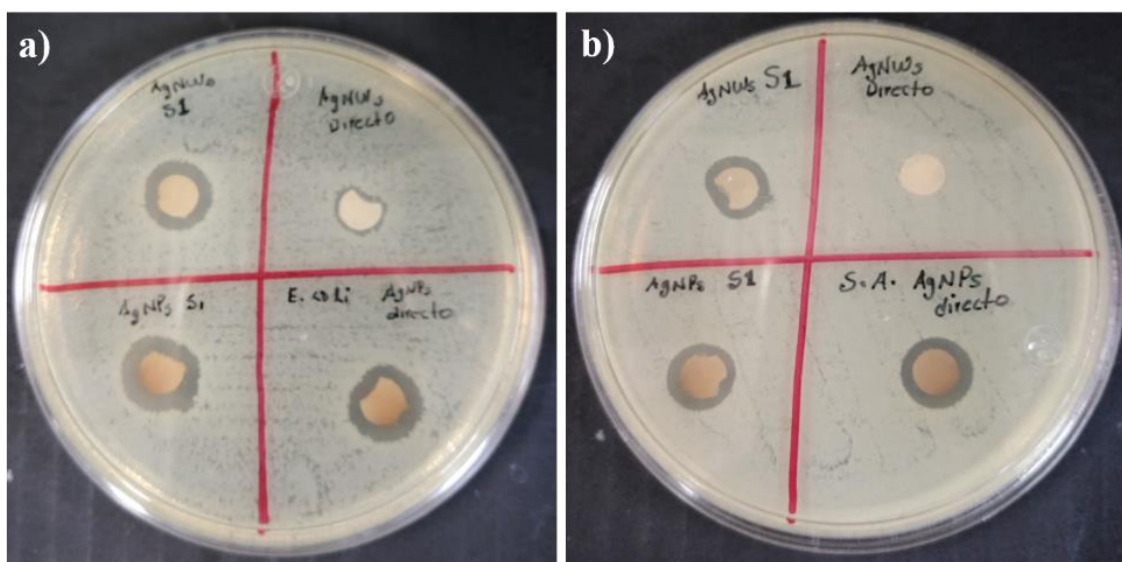


Figura 4. 55 Kirby- Bauer de AgNPs y AgNWs sin lavar (directo) y sus residuos del primer centrifugado (S1) a) *E. coli* y b) *S. aureus*.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

Los estudios demostraron que a partir de un método verde empleando el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* se pueden obtener nanoestructuras de Ag con diversas morfologías y tamaños que van desde nanopartículas de 20 nm hasta nanoalambres con alta relación de aspecto con longitudes superiores a los 100 μm , que con el tiempo se pliegan entre sí para formar nanoestambres y esferas conformadas por láminas, mediante la variación de parámetros experimentales como son la concentración del extracto y la sal precursora, respectivamente. El empleo de un agente externo como nucleante (sales de cobre), permitió que el proceso fuera más sencillo y económico en comparación a otros métodos verdes asistidos por plantas.

Además, se propusieron dos mecanismos del proceso de formación, uno de crecimiento y otro químico, que en conjunto establecieron que el compuesto Kaemferol-3-O-ramnósido es el encargado de la reducción de los iones de Ag, los cuales forman en una primera instancia AgNPs. Sin embargo, la adición de las sales de cobre a los sistemas de reacción sirve como la fuerza impulsora que facilita el proceso de formación de nanoestructuras de Ag de diferentes formas y tamaño predominando las estructuras 1D como lo son alambres y cintas. Este proceso se logró mediante la formación de AgNPs con maclado pentagonal y una dirección de crecimiento [100].

Las pruebas de citotoxicidad en levaduras mostraron que las AgNPs no presentaron efectos significativos sobre el crecimiento celular y la inhibición. Sin embargo, se comprobó que las cepas del género *Kluyveromyces marxianus* mostraron mayor resistencia en comparación de las del género *Saccharomyces cerevisiae*. Además, a partir de ensayos específicos sobre la cepa *Saccharomyces cerevisiae MC4* se identificó que las formas y tamaños de la Ag son importantes en la toxicidad celular, en donde, el daño es inversamente proporcional al tamaño. De la misma manera, los Ag^+ disminuyen el crecimiento y metabolismo celular.

Los ensayos de la actividad antibacteriana corroboraron la información obtenida con las levaduras, en donde fue demostrado que la toxicidad depende de la morfología, tamaño, estructura y forma química disponible. Por lo tanto, los Ag^+ causaron mayor daño, debido a su interacción con la pared celular bacteriana provocando un efecto en cadena, el cual

consistió en el deterioro de la pared celular, desnaturalización de enzimas, generación de especies reactivas de oxígeno y fragmentación del ADN.

BIBLIOGRAFÍA

1. Achával, A., *crecimiento demografico y contaminacion ambiental*. 2006: Dunken.
2. Castells, X.E., *Reciclaje de residuos industriales: Residuos solidos urbanos y fangos de depuradora*. 2012: Editorial Díaz de Santos, S.A.
3. Edelstein, A.S. and R.C. Caçaratra, *Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications, Second Edition*. 1998: Taylor & Francis.
4. Hoseinpour, V. and N. Ghaemi, *Green synthesis of manganese nanoparticles: Applications and future perspective—A review*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2018. **189**: p. 234-243.
5. Lancaster, M., *Green Chemistry 3rd Edition: An Introductory Text*. 2016: Royal Society of Chemistry.
6. Kanchi, S. and S. Ahmed, *Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and their Applications*. 2018: Wiley.
7. Prabhu, S. and E.K. Poulouse, *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. International Nano Letters, 2012. **2**(1): p. 32.
8. Ashkarran, A.A., et al., *Controlling the Geometry of Silver Nanostructures for Biological Applications*. Physics Procedia, 2013. **40**: p. 76-83.
9. Khodashenas, B. and H.R. Ghorbani, *Synthesis of silver nanoparticles with different shapes*. Arabian Journal of Chemistry, 2015.
10. Du, J., et al., *A review on silver nanoparticles-induced ecotoxicity and the underlying toxicity mechanisms*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018. **98**: p. 231-239.
11. Lab, S. *Material Safety Data Sheet Sodium borohydride MSDS*. 2018; Available from: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924969>.
12. Lab, S. *Material Safety Data Sheet Aniline MSDS*. 2018 [cited 2018 27 de Noviembre]; Available from: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927435>.
13. Ma, H., et al., *Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008. **233**(2): p. 247-253.

14. JUAREZ ROSETE, C.R., et al., *Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación*. CONACYT, 2013.
15. Denner, S.S., *Lavandula angustifolia miller: english lavender*. Holistic Nursing Practice, 2009. **23**(1): p. 57-64.
16. Lesage-Meessen, L., et al., *Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(8): p. 3375-3385.
17. Ciobanu, A., et al., *Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in Lavandula angustifolia essential oil*. Carbohydrate polymers, 2012. **87**(3): p. 1963-1970.
18. Spiridon, I., et al., *Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (Origanum vulgare), lavender (Lavandula angustifolia) and lemon balm (Melissa officinalis) from Romania*. Natural product research, 2011. **25**(17): p. 1657-1661.
19. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *9 Phytochemistry of the genus Lavandula*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, 2002: p. 86.
20. Sandoval Altamirano, C.P., *Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete y flavonoides: efecto del medio*. 2012.
21. Arellano-Plaza, M., et al., *Respiratory capacity of the Kluyveromyces marxianus yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013. **29**(7): p. 1279-1287.
22. Mejía-Barajas, J.A., et al., *Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast*. brazilian journal of microbiology, 2017. **48**: p. 326-332.
23. Martos, J.M.M., F. de Paula Gómez Cuevas, and J.C. Físico, *Ciencia e ingeniería de los materiales*. 2014: Ediciones Paraninfo, S.A.
24. Bandyopadhyay, A.K., *Nano Materials*. 2008: New Age International (P) Limited.
25. Rodríguez, F.D.d.C., *Introducción a los nanomateriales* 2012, Cuatitlán Izcalli: UNAM.
26. Takeuchi, N., *Nanociencia y nanotecnología: La construcción de un nuevo mundo átomo por átomo*. 2012: Fondo de Cultura Económica.
27. Nagarajan, R., et al., *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*. 2008: American Chemical Society.

28. Bhushan, B., *Springer Handbook of Nanotechnology*. 2010: Springer Berlin Heidelberg.
29. Hornyak, G.L., et al., *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. 2008: CRC Press.
30. Duran, P., *El procesado de polvos cerámicos nanoparticulados*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 1999. **38**(5): p. 403.
31. Xiong, Y. and X. Lu, *Metallic Nanostructures: From Controlled Synthesis to Applications*. 2014: Springer International Publishing.
32. Villalpando, M. and G. Rosas, *Effect of magnetic stirring on the green synthesis of silver nanoparticles using Lavandula angustifolia plant extract*. Microscopy and Microanalysis, 2019. **25**(S2): p. 1976-1977.
33. Cao, G. and Y. Wang, *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*. 2011: World Scientific.
34. Huck, W.T.S., *Nanoscale Assembly: Chemical Techniques*. 2006: Springer US.
35. Ngô, C. and M. Van de Voorde, *Nanotechnology in a Nutshell: From Simple to Complex Systems*. 2014: Atlantis Press.
36. Singh, S.C., et al., *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*. 2012: Wiley.
37. Almendárez-Camarillo and González-Calderón, *Nanomateriales: su crecimiento, caracterización estructural y tendencias*. CONCYTEG, 2011: p. 772-787.
38. POLO, J.D.C. and L.A.D. MERCADO, *SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA Y MODIFICACIÓN CON PULPA DE PAPEL PARA APLICACIÓN ANTIMICROBIAL*, in *Facultad de Ingeniería Química* 2013, Universidad de Cartagena Cartagena, Colombia
39. de la Fuente, J.M. and V. Grazu, *Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles Vs Organic Nanoparticles*. 2012: Elsevier Science.
40. Haumesser, P.H., *Nucleation and Growth of Metals: From Thin Films to Nanoparticles*. 2016: Elsevier Science.
41. Cao, G., *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. 2004: Imperial Colleg.
42. Tadros, T.F., *Nanodispersions*. 2015: De Gruyter.

43. Tantra, R., *Nanomaterial Characterization: An Introduction*. 2016: Wiley.
44. Groza, J.R. and J.F. Shackelford, *Materials Processing Handbook*. 2007: CRC Press.
45. Sergeev, G.B., *Nanochemistry*, ed. G.B. Sergeev. 2006, Amsterdam: Elsevier Science. 7-36.
46. Stokes, R.J. and D.F. Evans, *Fundamentals of Interfacial Engineering*. 1997: Wiley.
47. Rodríguez Llamazares, S.M., *Obtención de nanopartículas y nanoordenamientos metálicos empleando la química de los compuestos de inclusión*. 2007.
48. Zhang, P., et al., *Silver nanowires: Synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications*. *Materials Science and Engineering: B*, 2017. **223**: p. 1-23.
49. Dupas, C. and M. Lahmani, *Nanoscience: Nanotechnologies and Nanophysics*. 2007: Springer Berlin Heidelberg.
50. Lee, K.J., et al., *In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos*. *ACS nano*, 2007. **1**(2): p. 133-143.
51. Loo, C., et al., *Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy*. *Nano letters*, 2005. **5**(4): p. 709-711.
52. Ávalos, A., et al., *Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente*. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2013. **7**(2): p. 1-24.
53. Meyyappan, M. and M.K. Sunkara, *Inorganic Nanowires: Applications, Properties, and Characterization*. 2009: CRC Press.
54. Valverde, V. *Lavandula angustifolia*. 2013 30 de mayo del 2018]; Available from: <http://www.scoop.it/t/lavanda>.
55. Gilman, E.F. *Lavandula angustifolia Lavender, English Lavender*. 2011 30 de mayo del 2018]; Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FP/FP33700.pdf>.
56. online, B. *El cultivo de la lavanda* 2014 30 de mayo del 2018]; Available from: <http://www.botanical-online.com/cultivolavanda.htm>.
57. Ryman, D., *Aromaterapia: enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales*. 1995: Editorial Kairós.

58. Smith, M.G. and M. Snyder, *Yeast as a model for human disease*. Current protocols in human genetics, 2006. **48**(1): p. 15.6. 1-15.6. 8.
59. Mager, W.H. and J. Winderickx, *Yeast as a model for medical and medicinal research*. Trends in pharmacological sciences, 2005. **26**(5): p. 265-273.
60. Sá-Correia, I., *Yeasts in Biotechnology and Human Health: Physiological Genomic Approaches*. 2019: Springer International Publishing.
61. Feldmann, H., *Yeast: Molecular and Cell Biology*. 2012: Wiley.
62. Rose, A.H. and J.S. Harrison, *The Yeasts: Yeast Technology*. 2012: Elsevier Science.
63. Osumi, M., *The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation*. Micron, 1998. **29**(2-3): p. 207-233.
64. Karp, G., *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 2009: John Wiley & Sons.
65. Garrett, R.H. and C.M. Grisham, *Biochemistry*. 2016: Cengage Learning.
66. Alberts, B., D. Bray, and S. Cwi, *Introducción a la biología celular*. 2006: Editorial Médica Panamericana.
67. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry: 6th Edition*. 2012: Macmillan Learning.
68. Mathews, C.K., et al., *Bioquímica*. 2002: Pearson Educación.
69. Nicolson, G.L., *The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2014. **1838**(6): p. 1451-1466.
70. Campbell, N.A. and J.B. Reece, *Biología*. 2007: Editorial Médica Panamericana S.A.
71. Sadava, D. and W.H. Purves, *Vida / Life: La ciencia de la biología / The Science of Biology*. 2009: Editorial Medica Panamericana Sa de.
72. Banica, R., et al., *Two step polyol-solvothermal growth of thick silver nanowires*. Materials Letters, 2017. **194**: p. 181-184.
73. Wang, H., Y. Wang, and X. Chen, *Synthesis of uniform silver nanowires from AgCl seeds for transparent conductive films via spin-coating at variable spin-speed*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018.

74. Jeevika, A. and D. Ravi Shankaran, *Seed-free synthesis of 1D silver nanowires ink using clove oil (Syzygium Aromaticum) at room temperature*. Journal of Colloid and Interface Science, 2015. **458**: p. 155-159.
75. Taheri, M.M., et al., *Green synthesis of silver nanoneedles using shallot and apricot tree gum*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2015. **25**(10): p. 3286-3290.
76. Beyene, H.D., et al., *Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review*. Sustainable Materials and Technologies, 2017. **13**: p. 18-23.
77. Domingo, P.A.S., *La nanotecnología*. 2010: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas.
78. Langford, J.I. and A. Wilson, *Scherrer after sixty years: a survey and some new results in the determination of crystallite size*. Journal of Applied Crystallography, 1978. **11**(2): p. 102-113.
79. Suryanarayana, C. and M.G. Norton, *X-Ray Diffraction: A Practical Approach*. 2013: Springer US.
80. Lin, L., et al., *Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of Cassia fistula leaf*. Chemical Engineering Journal, 2010. **162**(2): p. 852-858.
81. Prabukumar, C. and K.U. Bhat, *Purification of Silver Nanowires Synthesised by Polyol Method*. Materials Today: Proceedings, 2018. **5**(10, Part 3): p. 22487-22493.
82. Park, M.V., et al., *The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9810-9817.
83. Souza, T.A., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines*. Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2016. **795**: p. 70-83.
84. Stoehr, L.C., et al., *Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells*. Particle and fibre toxicology, 2011. **8**(1): p. 36.
85. Shi, J., et al., *Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF- κ B pathways*. Biomaterials, 2014. **35**(24): p. 6657-6666.

86. Monge, M., *Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas*. 2018.
87. Coutiño, E.M.d.R., L. Ávila Lagunes, and O. Arroyo Helguera, *Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo*. *Revista de Educación Bioquímica*, 2017. **36**(2): p. 39-54.
88. Das, B., et al., *Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017. **10**(6): p. 862-876.
89. Tortora, G.J., B.R. Funke, and C.L. Case, *Introducción a la microbiología*. 2007: Panamericana.
90. Jang, S.J., et al., *In-vitro anticancer activity of green synthesized silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells*. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. **68**: p. 430-435.
91. Sun, X., et al., *Silver nanoparticles interact with the cell membrane and increase endothelial permeability by promoting VE-cadherin internalization*. *Journal of Hazardous Materials*, 2016. **317**: p. 570-578.
92. Brkić Ahmed, L., et al., *Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells*. *Food and Chemical Toxicology*, 2017. **107**: p. 349-361.
93. Silva, A.M., et al., *Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba (Copernicia prunifera (Mill.) H.E. Moore) fruit*. *African Journal of Food Science*, 2017. **11**(11): p. 353-361.
94. Susanto, D.F., et al., *Identification of phytochemical compounds in Calophyllum inophyllum leaves*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017. **7**(9): p. 773-781.
95. Mejía-Barajas, J.A., et al., *Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017. **48**(2): p. 326-332.
96. Mejía-Barajas, J., et al., *Fatty acid addition and thermotolerance of Kluyveromyces marxianus*. *FEMS microbiology letters*, 2018. **365**(7): p. fny043.

97. Rivas, C., M. Oranday, and M. Verde, *Investigación en plantas de importancia médica*. Universidad Autónoma de Nuevo León-México: Ediciones OmniaScience, 2016.
98. Neira Casana, C.I. and E.A. Pereda Peña, *Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida In vitro del extracto etanólico de Piper acutifolium sobre Streptococcus pyogenes, ATCC 19615*. 2018.
99. Silva, L.P., T.M. Pereira, and C.C. Bonatto, *Chapter 7 - Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles*, in *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, A.K. Shukla and S. Iravani, Editors. 2019, Elsevier. p. 137-164.
100. Dewick, P.M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2002: John Wiley & Sons.
101. Jablonský, M., et al. *Comparison of different methods for extraction from lavender: yield and chemical composition*. in *Key Engineering Materials*. 2016. Trans Tech Publ.
102. Barbieri, R., et al., *Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity*. Microbiological Research, 2017. **196**: p. 44-68.
103. Lavabre, M., *Aromaterapia libro práctico*. 1995: Lasser Press.
104. Chenarbon, H. and S. Hasheminia, *Modeling of drying of lavender (Lavandula officinalis L.) flowers*. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 2011. **11**(4): p. 462-466.
105. Kiran Babu, G.D., A. Sharma, and B. Singh, *Volatile composition of Lavandula angustifolia produced by different extraction techniques*. Journal of Essential Oil Research, 2016. **28**(6): p. 489-500.
106. Singh, J., et al., *'Green'synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation*. Journal of nanobiotechnology, 2018. **16**(1): p. 84.
107. Kuklinski, C., *Nutrición y bromatología*. 2003: Omega.
108. Cabrera, L.P., et al., *Removal of Opuntia thorns by pulsed laser ablation: Bromatological and microbiological analysis*. Journal of Food Engineering, 2016. **169**: p. 38-43.

109. Guzmán Loayza, D. and J. Chávez, *Estudio bromatológico del cladodio del nopal (Opuntia ficus-indica) para el consumo humano*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 2007. **73**(1): p. 41-45.
110. Araque¹, C., et al., *Bromatología del mataratón (Gliricidia sepium) a diferentes edades de corte en Urachiche, estado Yaracuy, Venezuela*. Zootecnia Tropical, 2006. **24**(4): p. 393-399.
111. Nelson, J.H., *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2003: Prentice Hall.
112. Jackman, L.M., et al., *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*. 2013: Elsevier Science.
113. Rodríguez-León, E., et al., *Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (Rumex hymenosepalus extracts)*. Nanoscale Research Letters, 2013. **8**(1): p. 318.
114. Cure, J.r.m., et al., *Monitoring the coordination of Amine Ligands on silver nanoparticles using NMR and SERS*. Langmuir, 2015. **31**(4): p. 1362-1367.
115. López-Naranjo, E.J., et al., *Biosynthesis of silver nanoparticles using a natural extract obtained from an agroindustrial residue of the tequila industry*. Materials Letters, 2018. **213**: p. 278-281.
116. Kumar, R., et al., *Rapid green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using (Prunus persica) plants extract: exploring its antimicrobial and catalytic activities*. J. Nanomed. Nanotechnol, 2017. **8**(4): p. 1-8.
117. Khan, R., et al., *Alocasia odora-mediated synthesis of silver nanoparticles, their cytotoxicity, and virucidal potential*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023. **107**(1): p. 111-123.
118. Ahmed, A., et al., *Nature-inspired biogenic synthesis of silver nanoparticles for antibacterial applications*. Materials Today Chemistry, 2023. **27**: p. 101339.
119. López-Miranda, J.L., et al., *Biosynthesis of silver nanoparticles using a Tamarix gallica leaf extract and their antibacterial activity*. Materials Letters, 2016. **176**: p. 285-289.
120. Villalpando, M., et al., *Ag nanoparticles synthesized using Lavandula angustifolia and their cytotoxic evaluation in yeast*. Materials Today Communications, 2022. **31**: p. 103633.

121. Alsaiari, N.S., et al., *Plant and Microbial Approaches as Green Methods for the Synthesis of Nanomaterials: Synthesis, Applications, and Future Perspectives*. *Molecules*, 2023. **28**(1): p. 463.
122. Liu, X., et al., *Plant polyphenol-derived ordered mesoporous carbon materials via metal ion cross-linking*. *Carbon*, 2023. **202**: p. 90-100.
123. Echeverria, C.A., et al., *Ag–Ga Bimetallic Nanostructures Ultrasonically Prepared from Silver–Liquid Gallium Core–Shell Systems Engineered for Catalytic Applications*. *ACS Applied Nano Materials*, 2022.
124. Ramachandran, K., et al., *Green production of self-assembled silver nanoarrays on flexible substrate for direct detection and catalytic degradation of organic water pollutants*. *Environmental Technology & Innovation*, 2022. **27**: p. 102409.
125. Ishaq, M.T., et al., *One-pot greener synthesis of zinc oxide nanoflowers using potato, cauliflower, and pea peel extract with antibacterial application*. *Chemical Physics Letters*, 2023. **810**: p. 140186.
126. Zhang, S., et al., *A large-nanosphere/small-nanosphere (cellulose/silver) antibacterial composite with prominent catalytic properties for the degradation of p-nitrophenol*. *Applied Surface Science*, 2023. **608**: p. 155192.
127. Chauhan, D., et al., *2D-Nanosheets Based Hybrid Nanomaterials Interaction with Plants*, in *Nanomaterial Interactions with Plant Cellular Mechanisms and Macromolecules and Agricultural Implications*. 2023, Springer. p. 299-316.
128. Haque, S., et al., *Green synthesis of nanostructures from rice straw food waste to improve the antimicrobial efficiency: New insight*. *International Journal of Food Microbiology*, 2023. **386**: p. 110016.
129. Gómez-Sánchez, R., et al., *Colorimetric and plasmonic detection of Hg²⁺ in water by biogenic Ag nanoparticles synthesized with Opuntia joconostle*. *Materials Letters*, 2023. **333**: p. 133614.
130. Chupradit, S., et al., *Morphological control: Properties and applications of metal nanostructures*. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2022. **2022**.
131. Gahlaut, S.K., A. Pathak, and B.D. Gupta, *Recent Advances in Silver Nanostructured Substrates for Plasmonic Sensors*. *Biosensors*, 2022. **12**(9): p. 713.

132. Orouji, A., et al., *A wide-range pH indicator based on colorimetric patterns of gold@silver nanorods*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022. **358**: p. 131479.
133. Zhuo, X., et al., *Shielded silver nanorods for bioapplications*. *Chemistry of Materials*, 2020. **32**(13): p. 5879-5889.
134. Blunder, M., et al., *Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments*. *Food chemistry*, 2017. **218**: p. 600-609.
135. Fossen, T., et al., *Em Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications: Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids*. 2006, Anderson, OM.
136. Zhao, J., et al., *Evaluation on bioactivities of total flavonoids from Lavandula angustifolia*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 2015. **28**(4).
137. Adaszyńska-Skwirzyńska, M. and M. Dziecioł, *Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (Lavandula angustifolia) derived from Poland*. *Natural product research*, 2017. **31**(21): p. 2575-2580.
138. Bindhu, M.R., et al., *Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from Moringa oleifera flower and assessment of antimicrobial and sensing properties*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2020. **205**: p. 111836.
139. Odeniyi, M.A., et al., *Green synthesis and cream formulations of silver nanoparticles of Nauclea latifolia (African peach) fruit extracts and evaluation of antimicrobial and antioxidant activities*. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2020. **15**: p. 100197.
140. Oliveira, R.N., et al., *FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing*. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 2016. **21**(3): p. 767-779.
141. Briggs, L. and L. Colebrook, *Infra-red spectra of flavanones and flavones. Carbonyl and hydroxyl stretching and CH out-of-plane bending absorption*. *Spectrochimica Acta*, 1962. **18**(7): p. 939-957.
142. Kemsley, E., et al., *Quantitative analysis of sugar solutions using infrared spectroscopy*. *Food chemistry*, 1992. **44**(4): p. 299-304.

143. Ikeda, N.E.A., et al., *Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc (II) flavonoid-metal complex*. *Chemico-biological interactions*, 2015. **239**: p. 184-191.
144. Munteanu, A.-C., et al., *Synthesis and structural investigation of new bio-relevant complexes of lanthanides with 5-hydroxyflavone: DNA binding and protein interaction studies*. *Molecules*, 2016. **21**(12): p. 1737.
145. Pereira, R., et al., *Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity*. *Molecules*, 2007. **12**(7): p. 1352-1366.
146. Ahmed, S., et al., *A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise*. *Journal of Advanced Research*, 2016. **7**(1): p. 17-28.
147. Wang, H., Y. Wang, and X. Chen, *Synthesis of uniform silver nanowires from AgCl seeds for transparent conductive films via spin-coating at variable spin-speed*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019. **565**: p. 154-161.
148. Öztürk, B.Y., B.Y. Gürsu, and İ. Dağ, *Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, 2019.
149. Horta-Piñeres, S., et al., *Silver nanoparticle-decorated silver nanowires: a nanocomposite via green synthesis*. *Applied Physics A*, 2020. **126**(1): p. 1-9.
150. Kaabipour, S. and S. Hemmati, *Green, sustainable, and room-temperature synthesis of silver nanowires using tannic acid–Kinetic and parametric study*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022. **641**: p. 128495.
151. Nam, S.-H. and Y.-J. An, *Size-and shape-dependent toxicity of silver nanomaterials in green alga Chlorococcum infusionum*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019. **168**: p. 388-393.
152. Zhao, W., et al., *An eco-friendly nitrate-free method for the synthesis of silver nanowires with reduced diameters*. *Journal of Materials Chemistry C*, 2021. **9**(6): p. 1874-1879.

153. Qin, F., et al., *Three-Step, Seed-Mediated Synthesis of Ultrathin AgNWs in Aqueous Solution*. Chemistry of Materials, 2022.
154. Fan, Z. and H. Men, *An overview on atomistic mechanisms of heterogeneous nucleation*. Metals, 2022. **12**(9): p. 1547.
155. Yakimchuk, D., et al., *Growth mechanism study of silver nanostructures in a limited volume*. Materials Chemistry and Physics, 2022. **283**: p. 126016.
156. Fahad, S., et al., *Recent progress in the synthesis of silver nanowires and their role as conducting materials*. Journal of Materials Science, 2019. **54**(2): p. 997-1035.
157. Szalkowski, M., et al., *Plasmon-induced absorption of blind chlorophylls in photosynthetic proteins assembled on silver nanowires*. Nanoscale, 2017. **9**(29): p. 10475-10486.
158. Amirjani, A., N.N. Koochak, and D.F. Haghshenas, *Investigating the shape and size-dependent optical properties of silver nanostructures using UV-vis spectroscopy*. Journal of Chemical Education, 2019. **96**(11): p. 2584-2589.
159. Wang, Y., et al., *Silver nanowires for anti-counterfeiting*. Journal of Materiomics, 2020. **6**(1): p. 152-157.
160. Sun, X. and Y. Li, *Cylindrical silver nanowires: preparation, structure, and optical properties*. Advanced Materials, 2005. **17**(21): p. 2626-2630.
161. Duan, J., et al., *Rational Synthesis of Cylindrical Silver Single-crystalline Nanowires via Poly (vinyl pyrrolidone) Reduction of AgCl*. Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed., 2020. **35**(3): p. 473-481.
162. Fahad, S., et al., *Synthesis of corrugated surface AgNWs and their applications in surface enhanced Raman spectroscopy*. CrystEngComm, 2020. **22**(12): p. 2183-2196.
163. Ebrahimzadeh, M.A., et al., *Green and facile synthesis of Ag nanoparticles using Crataegus pentagyna fruit extract (CP-AgNPs) for organic pollution dyes degradation and antibacterial application*. Bioorganic Chemistry, 2020. **94**: p. 103425.
164. An, H.J., et al., *Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, Artemia salina*. Comparative

- Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2019. **218**: p. 62-69.
165. Shah, Z., et al., *Synthesis of AgNPs coated with secondary metabolites of Acacia nilotica: An efficient antimicrobial and detoxification agent for environmental toxic organic pollutants*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **111**: p. 110829.
166. Butola, B., A. Gupta, and A. Roy, *Multifunctional finishing of cellulosic fabric via facile, rapid in-situ green synthesis of AgNPs using pomegranate peel extract biomolecules*. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2019. **12**: p. 100135.
167. Wei, H., et al., *Plasmon Waveguiding in Nanowires*. Chemical Reviews, 2018. **118**(6): p. 2882-2926.
168. Wu, C., X. Zhou, and J. Wei, *Localized surface plasmon resonance of silver nanotriangles synthesized by a versatile solution reaction*. Nanoscale research letters, 2015. **10**(1): p. 1-6.
169. Benelli, G., *Green Synthesis of Nanomaterials*. 2019: MDPI AG.
170. Chandran, R., et al., *Solid-state synthesis of silver nanowires using biopolymer thin films*. Materials Today Nano, 2018. **1**: p. 22-28.
171. Amadi, E.V., A. Venkataraman, and C. Papadopoulos, *Nanoscale self-assembly: concepts, applications and challenges*. Nanotechnology, 2022. **33**(13): p. 132001.
172. Dawson, K.A. and Y. Yan, *Current understanding of biological identity at the nanoscale and future prospects*. Nature Nanotechnology, 2021. **16**(3): p. 229-242.
173. Zhang, F., et al., *Metal–Organic–Framework–Derived Carbon Nanostructures for Site-Specific Dual-Modality Photothermal/Photodynamic Thrombus Therapy*. Advanced Science, 2019. **6**(17): p. 1901378.
174. Yang, H., et al., *One-pot rapid synthesis of high aspect ratio silver nanowires for transparent conductive electrodes*. Materials Research Bulletin, 2018. **102**: p. 79-85.
175. Chávez, K., et al., *One-step growth of silver nanodendrites and their electrochemical activity*. Applied Physics A, 2021. **127**(1): p. 1-8.
176. He, J., et al., *Silver microspheres aggregation-induced Raman enhanced scattering used for rapid detection of carbendazim in Chinese tea*. Food Chemistry, 2021. **339**: p. 128085.

177. Kang, L., et al., *Amino acid-assisted synthesis of hierarchical silver microspheres for single particle surface-enhanced Raman spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(19): p. 10007-10012.
178. Ren, H., et al., *Self-assembly of amino acids toward functional biomaterials*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2021. **12**(1): p. 1140-1150.
179. Onur, T., et al., *Self-assembly of bacterial amyloid protein nanomaterials on solid surfaces*. Journal of colloid and interface science, 2018. **520**: p. 145-154.
180. Parente, M., et al., *Simple and fast high-yield synthesis of silver nanowires*. Nano Letters, 2020. **20**(8): p. 5759-5764.
181. Lahane, T., J. Agrawal, and V. Singh, *Optimization of polyol synthesized silver nanowires for transparent conducting electrodes application*. Materials Today: Proceedings, 2022. **59**: p. 257-263.
182. Wei, J., et al., *Synthesis of high purity silver nanowires through a silver chloride-mediated polyol method*. Inorganic Chemistry Communications, 2022. **146**: p. 110164.
183. Li, M., et al., *Chemical constituents from Ginkgo biloba L. male flowers and their biological activities*. Medicinal Chemistry Research, 2019. **28**(9): p. 1557-1566.
184. Speisky, H., M.F. Arias-Santé, and J. Fuentes, *Oxidation of Quercetin and Kaempferol Markedly Amplifies Their Antioxidant, Cytoprotective, and Anti-Inflammatory Properties*. Antioxidants, 2023. **12**(1): p. 155.
185. Ulubelen, A., G. Topcu, and U. Kolak, *Labiatae flavonoids and their bioactivity*. Studies in Natural Products Chemistry, 2005. **30**: p. 233-302.
186. Speisky, H., et al., *Revisiting the oxidation of flavonoids: Loss, conservation or enhancement of their antioxidant properties*. Antioxidants, 2022. **11**(1): p. 133.
187. Takahama, U., *Oxidation products of kaempferol by superoxide anion radical*. Plant and cell physiology, 1987. **28**(5): p. 953-957.
188. Plaza, M., et al., *Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(15): p. 3321-3333.

189. Krych-Madej, J., K. Stawowska, and L. Gebicka, *Oxidation of flavonoids by hypochlorous acid: reaction kinetics and antioxidant activity studies*. Free Radical Research, 2016. **50**(8): p. 898-908.
190. Kasprzak, M.M., A. Erxleben, and J. Ochocki, *Properties and applications of flavonoid metal complexes*. Rsc Advances, 2015. **5**(57): p. 45853-45877.
191. Alexandersson, E. and G. Nestor, *Complete 1H and 13C NMR spectral assignment of D-glucofuranose*. Carbohydrate Research, 2022. **511**: p. 108477.
192. Barsukova, M., et al., *Flavonoid oxidation kinetics in aqueous and aqueous organic media in the presence of peroxidase, tyrosinase, and hemoglobin*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2017. **53**(2): p. 149-156.
193. Tarek, M. and A. El-Aziz. *Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Simple Polyol Method*. in *TMS 2019 148th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings*. 2019. Springer.
194. Suroshe, J.S., *Chemical Methods for the Synthesis of Nanomaterials*. Nanochemistry: Synthesis, Characterization and Applications, 2023: p. 77.
195. Gupta, A.D. and D. Rajput, *A Green Approach towards Nanoparticle Synthesis using Plants and Microbes*. Nanochemistry: Synthesis, Characterization and Applications, 2023: p. 88.
196. Nag, A., C.M. Nguyen, and K.M. Tibbetts, *Heterogeneous to homogeneous Cu–Ag nanoparticles by laser reduction in liquid*. Applied Surface Science, 2023. **610**: p. 155384.
197. Li, Y., et al., *Synthesis of Silver Nanowires Using a Polyvinylpyrrolidone-Free Method with an Alpinia zerumbet Leaf Based on the Oriented Attachment Mechanism*. ACS Omega, 2023.
198. Zimmermann, F.K. and K.D. Entian, *Yeast Sugar Metabolism*. 1997: Taylor & Francis.
199. Deak, T. and L.R. Beuchat, *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 1996: Taylor & Francis.
200. Walker, G.M., *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1998: Wiley.
201. Halasz, A. and R. Lasztity, *Use of Yeast Biomass in Food Production*. 1990: Taylor & Francis.

202. Imai, T. and T. Ohno, *The relationship between viability and intracellular pH in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology, 1995. **61**(10): p. 3604-3608.
203. Ramos, J., H. Sychrová, and M. Kschischo, *Yeast Membrane Transport*. 2015: Springer International Publishing.
204. Soleimani, F.F., et al., *Green synthesis of different shapes of silver nanostructures and evaluation of their antibacterial and cytotoxic activity*. Bionanoscience, 2018. **8**(1): p. 72-80.
205. Sohn, E.K., et al., *Aquatic Toxicity Comparison of Silver Nanoparticles and Silver Nanowires*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 893049.
206. Iosub, C.Ş., et al., *Chapter 29 - Toxicity of nanostructures—a general approach*, in *Nanostructures for Novel Therapy*, D. Ficai and A.M. Grumezescu, Editors. 2017, Elsevier. p. 793-809.
207. Lee, B., et al., *Silver nanoparticles induce reactive oxygen species-mediated cell cycle delay and synergistic cytotoxicity with 3-bromopyruvate in Candida albicans, but not in Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Nanomedicine, 2019. **14**: p. 4801.
208. Guerra, J.D., et al., *Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between Candida tropicalis and Saccharomyces boulardii*. Colloid and Interface Science Communications, 2020. **37**: p. 100280.
209. Landeros-Páramo, L., et al., *The effect of AgNPS bio-functionalization on the cytotoxicity of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. 3 Biotech, 2022. **12**(9): p. 1-13.
210. Panzarini, E., et al., *Glucose capped silver nanoparticles induce cell cycle arrest in HeLa cells*. Toxicology In Vitro, 2017. **41**: p. 64-74.
211. Marasini, S., et al., *Relaxometric, Optical and Cell Viability Properties of D-Glucuronic Acid Coated Cr2O3 Nanoparticles*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018. **18**(9): p. 6333-6338.
212. Vimbela, G.V., et al., *Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials*. International journal of nanomedicine, 2017. **12**: p. 3941.

213. Feng, Q.L., et al., *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Journal of biomedical materials research, 2000. **52**(4): p. 662-668.
214. Jung, W.K., et al., *Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 2008. **74**(7): p. 2171-2178.
215. Baygar, T., et al., *Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles*. Bioorganic chemistry, 2019. **86**: p. 254-258.
216. Bermejo, M.B. and P.A.S. Domingo, *Los riesgos de la Nanotecnología*. 2017: Los Libros de la Catarata.
217. Baruah, D., et al., *Alpinia nigra fruits mediated synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial and photocatalytic activities*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2019. **201**: p. 111649.

PRODUCTOS OBTENIDOS

Artículos indexados

- Villalpando, M., Saavedra-Molina, A., & Rosas, G. (2020). A facile synthesis of silver nanowires and their evaluation in the mitochondrial membrane potential. *Materials Science and Engineering: C*, 110973. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110973>.
- Villalpando, M., Gómez-Hurtado, M. A., Rosas, G., & Saavedra-Molina, A. (2022). Ag nanoparticles synthesized using *Lavandula angustifolia* and their cytotoxic evaluation in yeast. *Materials Today Communications*, 31, 103633. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103633>.

Proceedings

- Villalpando, M., & Rosas, G. (2019). Effect of Magnetic Stirring on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Lavandula angustifolia* Plant Extract. *Microscopy and Microanalysis*, 25(S2), 1976-1977.

CURRICULUM VITAE

Formación académica

Universidad:

- **Licenciatura en Ingeniería Bioquímica**
- Instituto Tecnológico de Morelia “José María Morelos y Pavón” en Morelia, Michoacán.
- Desde 2010 hasta 2014.
- Promedio Final de 87.65 en escala de 0 a 100
- Título y Cédula profesional con número 9543661.

Posgrado:

- **Maestría en Metalurgia y Ciencias de los Materiales**
 - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Michoacán.
 - Desde 2016 hasta 2018.
 - Promedio Final de 9.55 en escala de 0 a 10
 - Título y Cédula profesional con número 11492440.
-
- **Doctorado en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales**
 - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Michoacán.
 - Desde 2018 hasta 2023.
 - Promedio Final de 10 en escala de 0 a 10

Asistencia a congresos nacionales e internacionales:

- GREEN SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR CYTOTOXIC EVALUATION IN YEASTS. 1er Congreso Internacional de NanoBioingeniería, Monterrey, México. Noviembre del 2018.
- EFECTO DE LA TOXICIDAD DE NANOESTRUCTURAS DE PLATA EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL. Congreso de ingeniería y física aplicada a la biomedicina, León, México. Mayo del 2019.
- Effect of Magnetic Stirring on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Lavandula angustifolia* Plant Extract. Microscopy & Microanalysis 2019 Meeting. Portland, Oregon. Agosto del 2019.
- SILVER NANOSTRUCTURE TOXICITY EFFECT IN MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL. XXVIII International Materials Research Congress, Cancún, México. Agosto del 2019.
- A facile synthesis of silver nanowires and their evaluation in the mitochondrial membrane potential. Webinar on Nanotechnology inano 2020. Octubre del 2020.
- Síntesis fácil de nanoalambres de plata y su evaluación en el potencial de membrana mitocondrial. Congreso Internacional de la Sociedad Química de México. Septiembre del 2021.
- Efecto de la toxicidad de nanoestructuras de Ag en el potencial de membrana mitocondrial. 19 Foro de Ingeniería e Investigación en Materiales. Morelia, Michoacán. Noviembre 2022.

Idiomas:

- Español (lengua materna)
- Inglés avanzado: Constancia de terminación de estudios del departamento de Idiomas de la UMSNH.
- Se anexa también constancia de examen de inglés que certifica un nivel B2 equivalente a 550 puntos del examen Toefl.



A facile synthesis of silver nanowires and their evaluation in the mitochondrial membrane potential

M. Villalpando^a, Alfredo Saavedra-Molina^b, G. Rosas^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, UMSNH, edificio U., Ciudad Universitaria, C.P. 58000 Morelia, Michoacán, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, edificio B-3, Ciudad Universitaria, C.P. 58000 Morelia, Michoacán, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Green synthesis
Silver nanowires
Lavandula angustifolia
Nucleating agent
Mitochondria

ABSTRACT

Silver nanowires (AgNWs) with a high-aspect-ratio were successfully synthesized by a green method using *Lavandula angustifolia* plant extract. The morphology of the AgNWs was evaluated as a function of the concentration of precursor salt and nucleating agent. Furthermore, AgNWs were analyzed in a biological model using rat liver mitochondria by measuring their effect on membrane potential. The scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and transmission electron microscopy (TEM) techniques structurally characterized the nanowires obtained. Also, ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) investigated the optical properties of AgNWs. Structural studies show AgNWs fcc with lengths up to 100 μm and diameters ranging from 60 to 130 nm growing in the [110] orientation. Both the CuSO_4 nucleating agent and the centrifugation process are essential for the growth of nanowires. Furthermore, inhibition of mitochondrial membrane potential (MMP) depends on the concentration of the nanowires (NWs), suggesting dissipation of the electron transport chain. In this way, AgNWs can be used as a potential tool to verify biological reactions, such as modulation of metabolic pathways, together with the evaluation of a possible influence of biotic or abiotic factors in organisms.

1. Introduction

Silver nanowires (AgNWs) have attracted significant research interest due to their unique electronic, optical, and thermal properties and potential for application as electrode material in electronic, photonic, and sensing devices [1–3]. Several reports have described different applications of the Ag nanomaterials [4–8]. Due to their catalytic properties, Ag nanostructures are applied in water remediation processes [9–13]; for example, in the degradation of effluents produced in the textile, medical, and cosmetic industries [12,14–24]. Other applications are as a biosensor for glucose detection or SERS substrates for Raman spectroscopy [25,26]. The main application in nanomedicine is as an antimicrobial agent.

A simple example is their use in bandages to control microbial strains in surgical, fungal, or diabetic wounds [27]. The antimicrobial activity is by releasing silver ions on the surface or interior of the bacterial cell. Ag ions act directly on the cell membrane, cell wall, nucleic acids, and proteins, causing denaturation [28–30].

A diversity of approaches has been exploited to optimize the oral, ocular, or nasal delivery of nanoparticles to detect biological effects. For example, in oral nanoparticle delivery, they must overcome the

stomach and intestinal lumen to reach the final organ or tissue [31]. In this sense, mitochondrial metabolism, and functions such as respiration, production of reactive oxygen species, or membrane potential processes are vital to understanding the involvement of these organelles in the pathogenesis of chronic diseases. The membrane potential plays a central role in specific events, including the metabolism process, adenosine triphosphate synthesis (ATP), passive cation transport, and signaling. Besides, this MMP is an indicator of the healthy state of the cell because apoptosis and necrosis can be detected through its variation [32].

The AgNWs have been synthesized mainly using chemical methods assisted by temperature or microwaves [33–35]. Chandran et al. performed a single-step method for synthesizing AgNWs, within thin chitin/chitosan polysaccharide films [36]. Also, Rekha et al. have synthesized AgNWs by a chemistry method in various steps using citric acid, NaBH_4 as a reducing agent, and Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a form modifier [37]. On the other hand, Yang et al. have obtained similar nanostructures employing the citrate route through the variation in its concentration at a temperature of 130 $^\circ\text{C}$ [38]. Another example of the methods used for the growth of silver nanostructures is employing seeds of the same element. Mao et al. have

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, UMSNH, Edificio U, Ciudad Universitaria, CP 58060 Morelia, Michoacán, Mexico.

E-mail addresses: mwillalpando@umich.mx (M. Villalpando), saavedra@umich.mx (A. Saavedra-Molina), grtrejo@umich.mx (G. Rosas).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110973>

Received 10 October 2019; Received in revised form 13 April 2020; Accepted 15 April 2020

Available online 08 May 2020

0928-4931/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

prepared AgNWs through a silver nucleating agent with dendritic morphologies in the form of rice [39]. Also, the polyol process has received considerable attention for the preparation of AgNWs [2,40,41]. Moreover, different works have demonstrated the influence of the nucleating agents on the AgNWs' growth. For example, it was found that CuCl_2 , KBr, and NaCl significantly improve the growth of AgNWs [42–44].

The green synthesis methods are safe procedures with good yields, inexpensive, relatively reproducible, and compatibles with biomedicine [12,45]. Nanomaterials synthesized using microorganisms have been widely investigated due to their biocompatibility creating a meeting point between nanotechnology and biotechnology. Different types of microorganisms, such as bacteria [46], fungi [47], enzymes [48–50], and plant extracts [12,18,21,51,52], have successfully employed. However, some of them require cell culture and maintenance, being more complicated compared to plant extracts.

The *Lavandula angustifolia* plant extract can be a potential reducing agent for the green preparation of nanomaterials due to a large proportion of the flavonoid kaempferol malonyl glucoside [53]. Other antioxidant compounds present in lower concentrations also reported are ursolic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid-4-O-glucoside, rosmarinic acid, apigenin rhamnosyl glucoside, and i-vitexin kaempferol-3-coumaroyl glucoside [53]. The Mediterranean plant of *Lavandula angustifolia* is easily found throughout the world [54], including Mexico [55], where it is cultivated in different places. *Lavandula angustifolia* is a medium-sized perennial shrub with an intense aroma that belongs to the *Lamiaceae* family [54,56]. It grows in dry and sunny terrains, facilitating its cultivation and bioavailability [57,58]. This plant is used in traditional medicine to relieve pain, infections, and as a relaxation agent and sedation. Furthermore, it is used to eradicate inflammatory, degenerative, infectious diseases, and carcinogenesis [57,59,60].

Thus, in this paper, we report the preparation of AgNWs through a green method employing the *Lavandula angustifolia* plant extract as a reducing agent and CuSO_4 as a nucleating agent and its application on a biological probe, through MMP. Until now, there have been few or no reports on the preparation of AgNWs using plant extracts for their applications as a potential tool to verify biological reactions. Alterations in MMP by the presence of silver nanoparticles in Wistar rat liver mitochondria have been studied [61,62]. Nevertheless, in the case of AgNWs, there are few or no studies focused on this phenomenon [61,63].

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of silver nanowires

Silver nitrate (AgNO_3 , 98%) and cupric sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich. The *Lavandula angustifolia* plant extract was prepared by weighing 2 g in 100 ml of deionized water at 60 °C under magnetic stirring. The precursor salts were dissolved in an aqueous solution using deionized water at room temperature. For the preparation of the AgNWs, 5 ml of the plant extract (0.02 g/ml) was mixed with 5 ml of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mM). After 24 h, 8 ml of the mixture was taken and combined with 8 ml of AgNO_3 solution at 10 mM until the solution turned brown. The final solution was centrifuged twice at 12,000 rpm for 30 min using deionized water as a solvent. The UV-Vis technique (Ocean Optics USB-4000) monitored the color changes. SEM analyzed the powders' morphology evolution in a Jeol JSM-7600F microscope. The chemical composition was determined by energy dispersive spectroscopy (EDS). TEM performed a crystallographic and chemical study of the NWs on the Philips Tecnai F20 and Jeol ARM200F microscopes. TEM techniques such as bright-field images, selected area diffraction patterns (SAED), dark-field images, high-resolution micrographs (HRTEM), and high-angle annular dark-field images (HAADF) were used. XRD identified the

crystallographic phases on a Bruker LYNXEYE D8 Advance DAVINCI diffractometer.

2.2. Animals

Male Wistar rats weighing approximately 200 g were fed a standard diet of pellets for rodents LabDiet 5001 brand and water ad libitum and were adapted in acrylic boxes at a controlled temperature in light/dark cycles of 12 h. The rats were euthanized for liver extraction. All procedures with animals were carried out through the Federal Regulations for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico), and were approved by the Institutional Committee of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

2.3. Isolation of rat liver mitochondria

Mitochondria were isolated by differential centrifugation in a Percoll gradient, as previously described [64]. Briefly, rats were decapitated, and the liver was extracted and placed in a cold medium that contained 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EGTA, and 2 mM MOPS (pH 7.4). The liver was homogenized manually in a potter tube, then centrifuged at 2000 rpm. The supernatant obtained was centrifuged at 7000 rpm; then, it was suspended in a cold medium that contained 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM MOPS, and 0.2% bovine serum albumin and was centrifuged again at 7000 rpm. Finally, the pellet was centrifuged at 9000 rpm and resuspended in the medium without EGTA. Centrifugations were carried out for 10 min at 4 °C. Mitochondrial protein content was measured by the Biuret method with slight modifications [65].

2.4. Determination of mitochondrial membrane potential (MMP) depolarization

The MMP was determined by spectrofluorimetry using a Shimadzu RF-6000 equipment at 533–511 nm. The test uses a mix of 0.5 mg/ml liver mitochondria and 0.3 μM safranin. The solution was suspended in a buffer containing 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , and 3 mM MgCl_2 . The MMP traces were started by monitoring basal fluorescence for 60 s, and subsequently, the mitochondria were energized with 10 mM succinate. The change in fluorescence was translated into a time of 3 min, and then carbonyl cyanide-m chlorophenylhydrazine (CCCP), an uncoupler, was added to depolarize the MMP. Hence, we considered the fluorescence dequenching induced by CCCP as a qualitative in situ estimation of MMP. The process for AgNW's evaluation was similar.

3. Results and discussion

Fig. 1a–b illustrates low-magnification SEM images of the obtained products after the biosynthesis reaction. Many AgNWs with a high-aspect-ratio whose lengths reach up to 100 μm appear. Fig. 1c shows the AgNWs diameters distribution obtained from SEM data. The Ag nanowires have an average diameter of about 91 nm. Fig. 1d shows the EDS chemical mapping, indicating that the NWs are formed of elemental silver.

Firstly, the AgNWs formation employed 5 mM AgNO_3 and the *Lavandula angustifolia* plant extract. Secondly, a centrifugation process performed at 12000 rpm strongly influenced the growth of AgNWs. In this way, the growth is based on the centrifugal forces induced by the rotation of the solution at high-speeds, increasing the diffusion rate to obtain nanowires with a high-aspect-ratio. Previous research has also shown the influence of magnetic stirring on the growth of AgNWs [66].

Fig. 2a–b shows a couple of SEM images of nanowires surrounded by a low proportion of small silver aggregates. Fig. 2a displays nanostructures formed after the centrifugation process. The coalescence between silver nanoparticles (AgNPs) forms larger particles not adhere to

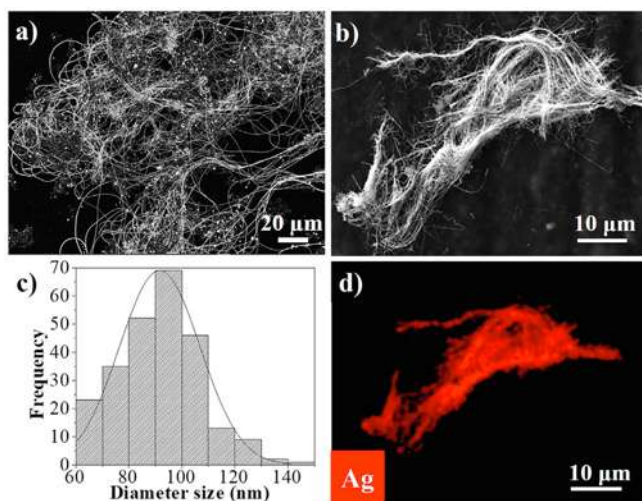


Fig. 1. SEM images of the AgNWs (a)–(b). (c) Histogram. (d) EDS chemical mapping analysis.

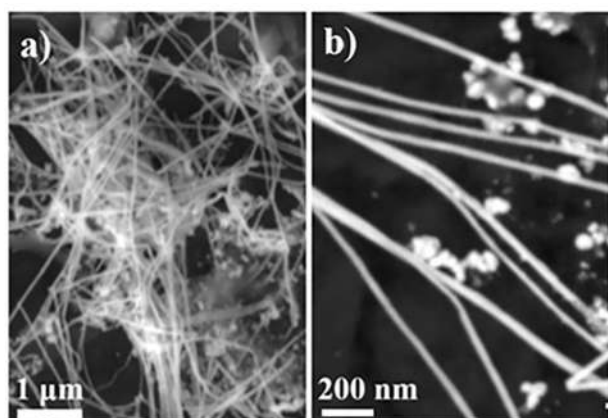


Fig. 2. SEM images of AgNWs: (a) surrounded by a small number of AgNPs and (b) showing diameters ranging from 60 to 130 nm.

NWs. Thus, the efficiency of the process was not complete, and more purification methods are required. Fig. 2b shows an enlarged SEM image that illustrates AgNWs with a diameter ranging from 60 to 130 nm. The AgNWs grow under the influence of the CuSO_4 nucleating agent. As reported [67], Cu(I) ions rapidly saturate the solution by removing the oxygen atoms from the surface of the silver seeds, preventing the oxygen atoms from blocking the growth of silver nanostructures and limiting oxidative etching.

The XRD technique characterized the crystalline lattice of the as-synthesized NWs. Fig. 3a illustrates the XRD pattern of the products. The diffraction peaks situated at (111), (200), (220), (311), and (222) corresponds to the face-centered cubic (fcc) silver structure (standard data No. JCPDS 00-004-0783) with a lattice parameter of 0.408 nm.

Fig. 3b shows the typical UV–Vis absorption spectrum of the synthesized NWs. The absorption bands situated at 350 nm and 475 nm attributes to the superficial plasmon resonance band (SPR) corresponding to the long NWs. These are similar to the bulk material and also to the transverse mode, respectively. The longitudinal SPR band shows a red-shift due to the high-aspect-ratio of the AgNWs [67]. The reaction solution shows a color change from yellow to dark brown (inset), indicating the reduction of Ag ions.

Meanwhile, the solution turns almost black by the time NWs form, which differs from other studies in which the color of the solution changes to gray [68], light brown [69], or purple [36]. These changes are attributed to the surrounding dielectric medium in which the solids

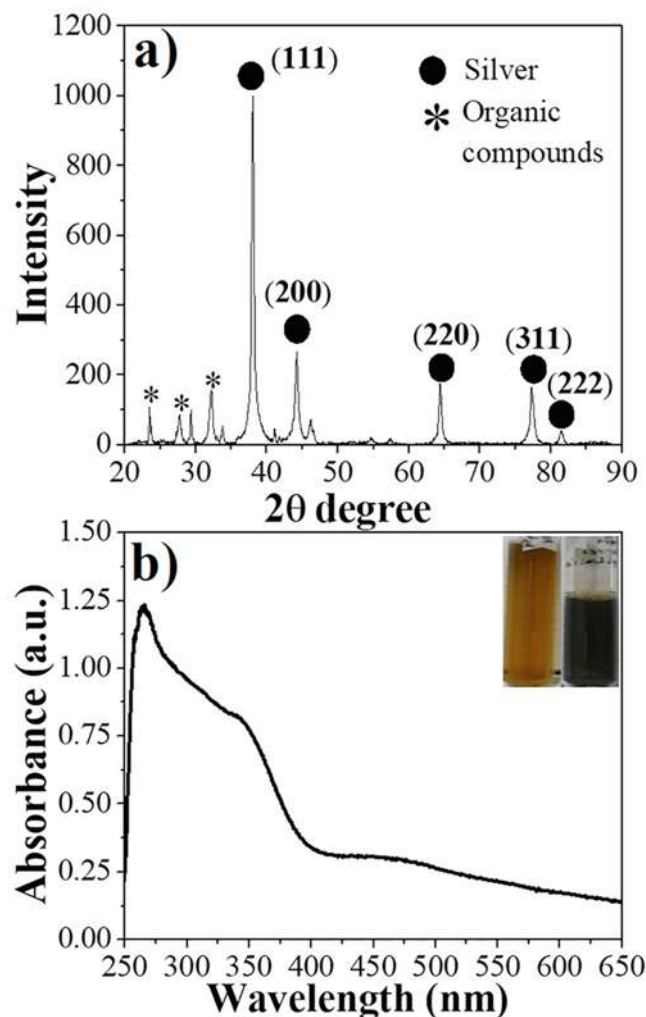


Fig. 3. XRD pattern (a) and UV–Vis spectrum of AgNWs (b).

are dispersed in different synthesis techniques. Furthermore, SPR peaks can be affected by the shapes and sizes of nanostructures [70].

The AgNWs were further analyzed by the techniques HAADF, TEM, and TEM-SAED patterns confirming the morphology, size, and crystal structure of the AgNWs, respectively. Fig. 4a illustrates a HAADF image showing nanowires with a high-aspect-ratio having diameters between 60 and 130 nm. This result agrees well with the SEM data. Previous studies reported that average AgNWs diameters range from 23 nm to almost 100 nm [69,71,72]. Fig. 4b shows a bright-field TEM image of an AgNW with its corresponding SAED pattern (Fig. 4c), where the diffraction points correspond to the [101] zone axis. The dark-field micrograph (Fig. 4d) shows that the nanowires exhibit extinction distances appreciated at the ends of the image. This result suggests that the growth of nanowires follows a coalescence and diffusion mechanism between the particles due to the secondary nucleation process, where the small nanoparticles joined to form AgNWs [73]. Other studies have shown that AgNWs can grow through a mechanism that involves the Ostwald ripening process [74].

Fig. 5a displays the EDS chemical composition of the collected X-ray signals, which only illustrates the presence of the Ag element suggesting a high purity of the products. The Cu element belongs to the copper grid support. Fig. 5b shows the HAADF-TEM image of a single crystalline AgNW with a diameter of around 100 nm. The image also illustrates the EDS chemical mapping of the AgNWs (insert) that shows their Ag composition. Fig. 5c shows an HRTEM image of a single AgNW, and its corresponding fast Fourier transform (inset). The periodic lattice

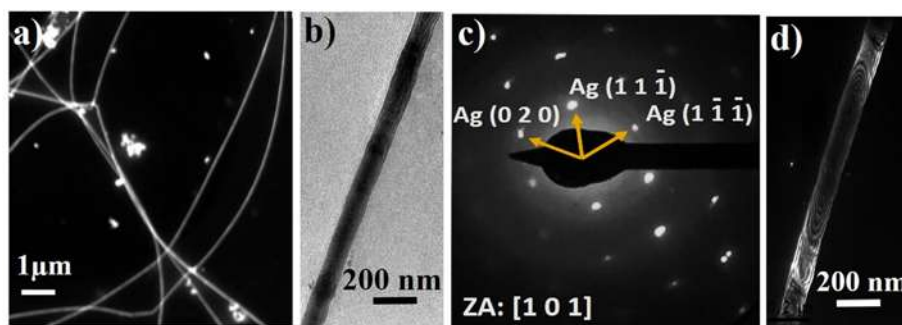


Fig. 4. Structural and morphological analysis of AgNWs obtained using different TEM techniques: (a) HAADF, (b) bright-field, (c) SAED pattern, and (d) dark-field image.

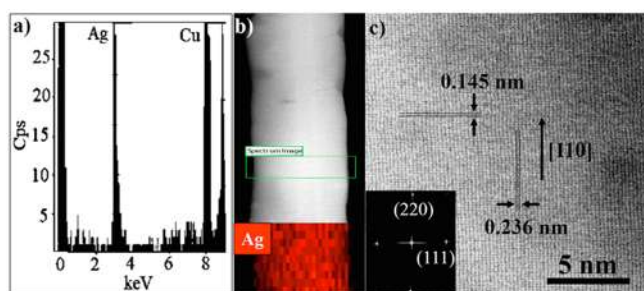


Fig. 5. Different TEM techniques applied to one AgNW. (a) EDS chemical analysis, (b) HAADF image and its corresponding chemical mapping analysis (inset), and (c) HR-TEM image and its FFT pattern.

corresponds to the 0.235 nm of the Ag planes (111). Therefore, the direction of growth was [110], illustrating that the AgNWs have a faceted pentagonal morphology, as previously reported [67,75–77].

The pentagonal growth follows the Ostwald ripening process, in which the nanoparticles integrated into NWs, where the particles are composed of monocrystals in the form of triangular prisms with the planes (100) on their sides and covered with planes (111). In this growth process, the addition of NaCl or CuCl₂ forms AgCl crystals, which results in the Ag⁺ concentration being released slowly, due to the AgCl low solubility constant. In this way, the presence of the nucleating agent is crucial for the NWs growth because the Ag ions only could be reduced to AgNPs [74].

Thus, the following experimental conditions form the AgNWs. The *Lavandula angustifolia* plant extract mixed with AgNO₃ (5 mM) causes AgNWs formation after a centrifugation process at high-speed rotations. In this way, nanowires' growth based on the centrifugal forces induced by the solution rotation to obtain high-aspect ratio NWs. Additionally, the AgNWs formation is under the influence of the CuSO₄ nucleating agent. The centrifugation process facilitated the development of the original structure and allowed a rearrangement of capping agents to form skeins of AgNWs. Where the dosage of Ag ions caused by the viscosity of the medium, together with the saturation of Cu(I) ions, allowed the removal of oxygen atoms in Ag sites, facilitating the formation of NW with a high aspect ratio growing in the crystallographic direction [110] [67].

According to typical methods for the AgNWs synthesis, PVP/ethylene glycol mixtures are used widely for 1D nanowire growth, and mechanisms for this process have been proposed [35,78]. As an analogy, our green method involves Ag reduction processes that are promoted by OH moieties of various types of compounds from the extract of *Lavandula angustifolia*, highlighting flavonoids [79], natural phenolic derivatives with higher redox potential [80]. Besides, the surfactants in the extract are saponins and glycosidic compounds, as described by Tiwari et al. [81], where these chemicals must direct the growth of the one-dimensional nanostructure supported by intermolecular sugar-Cu

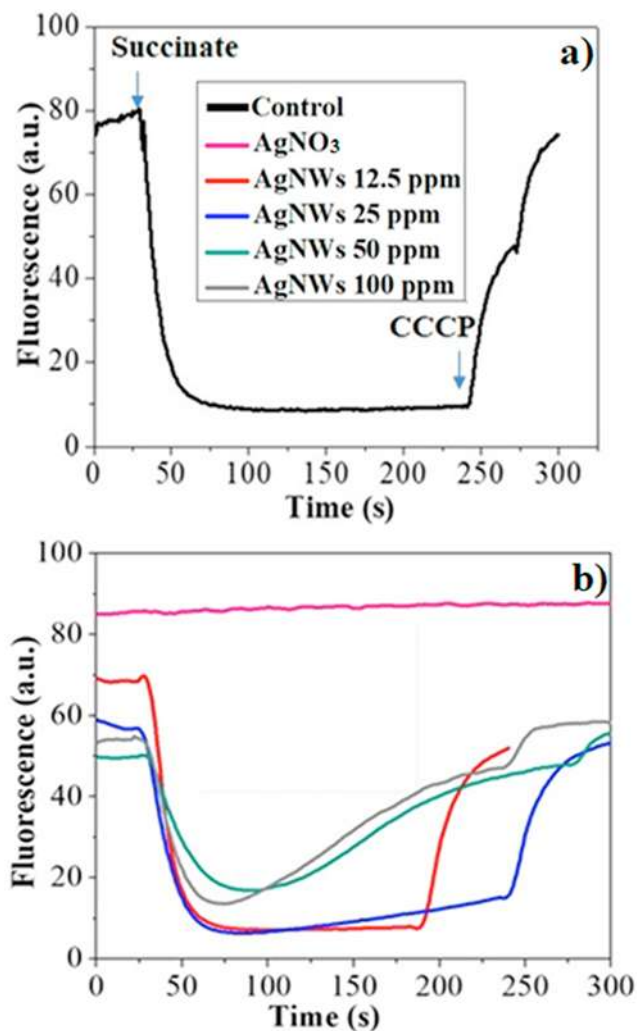


Fig. 6. Studies of MMP: (a) control and (b) silver ions and nanostructures.

(II) interactions [82,83].

Fig. 6 corresponds to the evaluation of the AgNWs and also AgNO₃ precursor salt in rat liver MMP test. Fig. 6a represents the reference sample (mitochondria without treatment). As observed, the fluorescence at 30 s is determined by the addition of safranin, a lipophilic cation whose fluorescence is a consequence of a difference between charges originated by the mitochondria electrons transfer in the respiratory chain. Subsequently, succinate was added as a substrate for the mitochondrial basal fluorescence that remains constant at about 200 s. In the last step, the uncoupler CCCP was added, diminishing the

MMP and causing an increase of fluorescence or its return to the initial starting point. Fig. 6b shows the evaluation of the MMP in rat liver containing AgNWs and silver ions. The black line represents the study of liver mitochondria exposed to 12.5 ppm AgNO₃ aqueous solution, where the fluorescence remained constant attributed to a toxicity effect that, as a consequence, decreased the mitochondrial metabolic functions.

The high contact area causes the toxicity among silver ions and the compounds that integrate the outer mitochondrial membrane. The reaction between ions and layer proteins causes damage, allowing the passage of Ag cations to the intermembrane space. These phenomena result in a definite increase in the concentration gradient and a loss in membrane functions [28]. Besides, loss in MMP demonstrated the loss in mitochondrial oxidative phosphorylation function [78]. Moreover, some silver cations may be confused as some enzymatic cofactors. Therefore, as demonstrates in this study, they can enter the interior of the membrane and interfere with the electron transport chain. The red, blue, green, and gray lines depict the evaluation of AgNWs in different concentrations of 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, and 100 ppm, respectively.

In these cases, changes in the fluorescence emission over time is noticeable as the concentration of the nanomaterial is increased. Therefore, the toxicity at levels lower than 12.5 ppm is null. However, for concentrations above 25 ppm, it has adverse effects on the concentration gradient of the cells, which leads to the loss of one of the most important functions inside the mitochondria. It is known that silver nanomaterials act by releasing ions from their surface. For this reason, damage to the mitochondria is more significant as the concentration of AgNWs increases, caused by a majority release of silver ions from their reactive surface by electronic oscillation.

4. Conclusions

In summary, the high flavonoid content in the plant *Lavandula angustifolia* Mexican grown was successfully used to obtain for the first time high-aspect-ratio AgNWs. The morphology and structure of AgNWs were examined by the SEM, XRD, UV-Vis, and TEM techniques. As observed, the presence of the CuSO₄ nucleating agent and the centrifugation process plays an essential role in the preparation of nanowires. Electron microscopy measurements show that AgNWs have lengths of approximately 100 μm and diameters ranging from 60 to 130 nm with a direction of growth [110]. Secondary nucleation favored AgNWs formation. Thus, the easy cultivation and bioavailability of the *Lavandula angustifolia* make this synthesis method available for its commercial application. Also, rat liver mitochondria were analyzed by adding AgNWs through the measurement of membrane potential. The test showed that the toxicity of the Ag ions is higher compared to the AgNWs. However, for AgNWs concentrations above 25 ppm, it has adverse effects on the concentration gradient of cells, leading to the loss of essential functions within the mitochondria, as dissipation of the electrons transport chain. In this way, AgNWs can be used at low concentrations as a tool to verify biological reactions such as modulation of metabolic pathways, evaluation of the possible influence of biotic and abiotic factors of organisms.

CRedit authorship contribution statement

M. Villalpando: Validation, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Alfredo Saavedra-Molina:** Formal analysis, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision. **G. Rosas:** Conceptualization, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Mr. Villalpando is fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

References

- [1] M.G. Kang, T. Xu, H.J. Park, X. Luo, L.J. Guo, Efficiency enhancement of organic solar cells using transparent plasmonic Ag nanowire electrodes, *Adv. Mater.* 22 (39) (2010) 4378–4383.
- [2] D. Kim, S. Jeong, J. Moon, Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection, *Nanotechnology* 17 (16) (2006) 4019.
- [3] X. Xiong, C.L. Zou, X.F. Ren, A.P. Liu, Y.X. Ye, F.W. Sun, G.C. Guo, Silver nanowires for photonics applications, *Laser Photonics Rev.* 7 (6) (2013) 901–919.
- [4] H.D. Beyene, A.A. Werkneh, H.K. Bezabh, T.G. Ambaye, Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review, *Sustain. Mater. Technol.* 13 (2017) 18–23.
- [5] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z.-S. Chen, G. Chen, Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications, *Drug Discov. Today* 20 (5) (2015) 595–601.
- [6] E.O. Ogunsona, R. Muthuraj, E. Ojogbo, O. Valerio, T.H. Mekonnen, Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: a review, *Appl. Mater. Today* 18 (2020) 100473.
- [7] T. Qing, B. Feng, P. Zhang, K. Zhang, X. He, K. Wang, Beyond native deoxyribonucleic acid, templating fluorescent nanomaterials for bioanalytical applications: a review, *Anal. Chim. Acta* 1105 (2020) 11–27.
- [8] J. Chen, T. Fan, Z. Xie, Q. Zeng, P. Xue, T. Zheng, Y. Chen, X. Luo, H. Zhang, Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: status and challenges, *Biomaterials* (2020) 119827.
- [9] T.B. Devi, S. Begum, M. Ahmaruzzaman, Photo-catalytic activity of plasmonic Ag@AgCl nanoparticles (synthesized via a green route) for the effective degradation of Victoria blue B from aqueous phase, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 160 (2016) 260–270.
- [10] B. Khodadadi, M. Bordbar, A. Yeganeh-Faal, M. Nasrollahzadeh, Green synthesis of Ag nanoparticles/clinoptilolite using Vaccinium macrocarpon fruit extract and its excellent catalytic activity for reduction of organic dyes, *J. Alloys Compd.* 719 (2017) 82–88.
- [11] M. Saad, H. Tahir, D. Ali, Green synthesis of Ag-Cr-AC nanocomposites by *Azadirachta indica* and its application for the simultaneous removal of binary mixture of dyes by ultrasonicated assisted adsorption process using response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.* 38 (2017) 197–213.
- [12] M. Nasrollahzadeh, Z. Issaabadi, S.M. Sajadi, Green synthesis of the Ag/Al₂O₃ nanoparticles using Bryonia alba leaf extract and their catalytic application for the degradation of organic pollutants, *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 30 (4) (2019) 3847–3859.
- [13] H. Ullah, C.D. Wilfred, M.S. Shaharun, Synthesis of silver nanoparticles using ionic-liquid-based microwave-assisted extraction from *Polygonum minus* and photo-degradation of methylene blue, *J. Chin. Chem. Soc.* 64 (10) (2017) 1164–1171.
- [14] T.B. Devi, M. Ahmaruzzaman, Bio-inspired facile and green fabrication of Au@Ag@AgCl core-double shells nanoparticles and their potential applications for elimination of toxic emerging pollutants: a green and efficient approach for wastewater treatment, *Chem. Eng. J.* 317 (2017) 726–741.
- [15] T.M.S. Rosbero, D.H. Camacho, Green preparation and characterization of tentacle-like silver/copper nanoparticles for catalytic degradation of toxic chlorpyrifos in water, *Journal of environmental chemical engineering* 5 (3) (2017) 2524–2532.
- [16] S. Kaviya, E. Prasad, Biogenic synthesis of ZnO-Ag nano custard apples for efficient photocatalytic degradation of methylene blue by sunlight irradiation, *RSC Adv.* 5 (22) (2015) 17179–17185.
- [17] M. Nasrollahzadeh, R. Akbari, Z. Issaabadi, S.M. Sajadi, Biosynthesis and characterization of Ag/MgO nanocomposite and its catalytic performance in the rapid treatment of environmental contaminants, *Ceram. Int.* 46 (2) (2020) 2093–2101.
- [18] A. Yeganeh-Faal, M. Bordbar, N. Negahdar, M. Nasrollahzadeh, Green synthesis of the Ag/ZnO nanocomposite using *Valeriana officinalis* L. root extract: application as a reusable catalyst for the reduction of organic dyes in a very short time, *IET Nanobiotechnology* 11 (6) (2017) 669–676.
- [19] P. Gnanaprakasam, T. Selvaraju, Green synthesis of self assembled silver nanowire decorated reduced graphene oxide for efficient nitroarene reduction, *RSC Adv.* 4 (47) (2014) 24518–24525.
- [20] M. Nasrollahzadeh, M. Sajjadi, M.R. Tahsili, M. Shokouhimehr, R.S. Varma, Synthesis of 1-substituted 1-H-1, 2, 3, 4-tetrazoles using biosynthesized Ag/sodium borosilicate nanocomposite, *ACS Omega* 4 (5) (2019) 8985–9000.
- [21] A. Rostami-Vartooni, M. Nasrollahzadeh, M. Salavati-Niasari, M. Atarod, Photocatalytic degradation of azo dyes by titanium dioxide supported silver nanoparticles prepared by a green method using *Carpobrotus acinaciformis* extract, *J. Alloys Compd.* 689 (2016) 15–20.

- [22] M. Tajbaksh, H. Alinezhad, M. Nasrollahzadeh, T.A. Kamali, Green synthesis of the Ag/HZSM-5 nanocomposite by using Euphorbia heterophylla leaf extract: a recoverable catalyst for reduction of organic dyes, *J. Alloys Compd.* 685 (2016) 258–265.
- [23] M. Nasrollahzadeh, M. Atarod, B. Jaleh, M. Gandomirouzbahani, In situ green synthesis of Ag nanoparticles on graphene oxide/TiO₂ nanocomposite and their catalytic activity for the reduction of 4-nitrophenol, Congo red and methylene blue, *Ceram. Int.* 42 (7) (2016) 8587–8596.
- [24] B. Khodadadi, Hazelnut shell as a valuable bio-waste support for green synthesis of Ag NPs using *Origanum vulgare* leaf extract: catalytic activity for reduction of methyl orange and Congo red, *Iranian Journal of Catalysis* 7 (2) (2017) 111–119.
- [25] H. Chu, Y. Huang, Y. Zhao, Silver nanorod arrays as a surface-enhanced Raman scattering substrate for foodborne pathogenic bacteria detection, *Appl. Spectrosc.* 62 (8) (2008) 922–931.
- [26] B.K. Salunke, S.S. Sawant, S.-I. Lee, B.S. Kim, Microorganisms as efficient biosystem for the synthesis of metal nanoparticles: current scenario and future possibilities, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32 (5) (2016) 88.
- [27] M. Khatami, R.S. Varma, N. Zafarnia, H. Yaghoobi, M. Sarani, V.G. Kumar, Applications of green synthesized Ag, ZnO and Ag/ZnO nanoparticles for making clinical antimicrobial wound-healing bandages, *Sustain. Chem. Pharm.* 10 (2018) 9–15.
- [28] M. Krychowiak, M. Grinholc, R. Banasiuk, M. Krauze-Baranowska, D. Głód, A. Kawiak, A. Królicka, Combination of silver nanoparticles and *Drosera binata* extract as a possible alternative for antibiotic treatment of burn wound infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*, *PLoS One* 9 (12) (2014) e115727.
- [29] M. Ahumada, S. McLaughlin, N.L. Pacioni, E.L. Alarcon, Spherical silver nanoparticles in the detection of thermally denatured collagens, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (8) (2016) 1993–1996.
- [30] S. Ferraris, M. Miola, A. Cochis, B. Azzimonti, L. Rimondini, E. Prenesti, E. Vernè, In situ reduction of antibacterial silver ions to metallic silver nanoparticles on bioactive glasses functionalized with polyphenols, *Appl. Surf. Sci.* 396 (2017) 461–470.
- [31] A. Surendiran, S. Sandhiya, S. Pradhan, C. Adithan, Novel applications of nanotechnology in medicine, *Indian J. Med. Res.* 130 (6) (2009).
- [32] M. Tian, J. Sun, B. Dong, W. Lin, Construction of mitochondria-nucleolus shuttling fluorescent probe for the reversible detection of mitochondrial membrane potential, *Sensors Actuators B Chem.* 292 (2019) 16–23.
- [33] B. Liu, H. Yan, S. Chen, Y. Guan, G. Wu, R. Jin, L. Li, Stable and controllable synthesis of silver nanowires for transparent conducting film, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (1) (2017) 212.
- [34] Q. Xue, W. Yao, J. Liu, Q. Tian, L. Liu, M. Li, Q. Lu, R. Peng, W. Wu, Facile synthesis of silver nanowires with different aspect ratios and used as high-performance flexible transparent electrodes, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (1) (2017) 480.
- [35] M.F. Meléndez, C. Medina, F. Solis-Pomar, P. Flores, M. Paulraj, E. Pérez-Tijerina, Quality and high yield synthesis of Ag nanowires by microwave-assisted hydrothermal method, *Nanoscale Res. Lett.* 10 (1) (2015) 48.
- [36] R. Chandran, H. Chevva, Z. Zeng, Y. Liu, W. Zhang, J. Wei, D. LaJeunesse, Solid-state synthesis of silver nanowires using biopolymer thin films, *Materials Today Nano* 1 (2018) 22–28.
- [37] C.R. Rekha, S. Sameera, V.U. Nayar, K.G. Gopchandran, Simultaneous detection of different probe molecules using silver nanowires as SERS substrates, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 213 (2019) 150–158.
- [38] Z. Yang, H. Qian, H. Chen, J.N. Anker, One-pot hydrothermal synthesis of silver nanowires via citrate reduction, *J. Colloid Interface Sci.* 352 (2) (2010) 285–291.
- [39] Y. Mao, C. Wang, H. Yang, Rapid and uniform synthesis of silver nanowires via rice-shaped silver nucleant, *Mater. Lett.* 142 (2015) 102–105.
- [40] Y. Sun, Y. Yin, B.T. Mayers, T. Herricks, Y. Xia, Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO₃ with ethylene glycol in the presence of seeds and poly(vinyl pyrrolidone), *Chem. Mater.* 14 (11) (2002) 4736–4745.
- [41] S. Bae, H. Han, J.G. Bae, E.Y. Lee, S.H. Im, D.H. Kim, T.S. Seo, Growth of silver nanowires from controlled silver chloride seeds and their application for fluorescence enhancement based on localized surface plasmon resonance, *Small* 13 (21) (2017) 1603392.
- [42] H. Yang, T. Chen, H. Wang, S. Bai, X. Guo, One-pot rapid synthesis of high aspect ratio silver nanowires for transparent conductive electrodes, *Mater. Res. Bull.* 102 (2018) 79–85.
- [43] Q.N. Luu, J.M. Doorn, M.T. Berry, C. Jiang, C. Lin, P.S. May, Preparation and optical properties of silver nanowires and silver-nanowire thin films, *J. Colloid Interface Sci.* 356 (1) (2011) 151–158.
- [44] J. Jiu, T. Sugahara, M. Nogi, T. Araki, K. Suganuma, H. Uchida, K. Shinozaki, High-intensity pulse light sintering of silver nanowire transparent films on polymer substrates: the effect of the thermal properties of substrates on the performance of silver films, *Nanoscale* 5 (23) (2013) 11820–11828.
- [45] M. Nasrollahzadeh, M. Maham, A. Rostami-Vartooni, M. Bagherzadeh, S.M. Sajadi, Barberry fruit extract assisted in situ green synthesis of Cu nanoparticles supported on a reduced graphene oxide-Fe₃O₄ nanocomposite as a magnetically separable and reusable catalyst for the O-arylation of phenols with aryl halides under ligand-free conditions, *RSC Adv.* 5 (79) (2015) 64769–64780.
- [46] S. Shivaji, S. Madhu, S. Singh, Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria, *Process Biochem.* 46 (9) (2011) 1800–1807.
- [47] J.M. Kobashigawa, C.A. Robles, M.L. Martínez Ricci, C.C. Carmarán, Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii*, *Saudi Journal of Biological Sciences* 26 (7) (2019) 1331–1337.
- [48] V. Smuleac, R. Varma, B. Baruwati, S. Sikdar, D. Bhattacharyya, Nanostructured membranes for enzyme catalysis and green synthesis of nanoparticles, *ChemSusChem* 4 (12) (2011) 1773–1777.
- [49] V. Smuleac, R. Varma, S. Sikdar, D. Bhattacharyya, Green synthesis of Fe and Fe/Pd bimetallic nanoparticles in membranes for reductive degradation of chlorinated organics, *J. Membr. Sci.* 379 (1–2) (2011) 131–137.
- [50] J. Virkutyte, R.S. Varma, Green synthesis of metal nanoparticles: biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization, *Chem. Sci.* 2 (5) (2011) 837–846.
- [51] P. Dauthal, M. Mukhopadhyay, Agro-industrial waste-mediated synthesis and characterization of gold and silver nanoparticles and their catalytic activity for 4-nitroaniline hydrogenation, *Korean J. Chem. Eng.* 32 (5) (2015) 837–844.
- [52] A. Rostami-Vartooni, M. Nasrollahzadeh, M. Alizadeh, Green synthesis of seashell supported silver nanoparticles using *Sesuvium portulacastrum* seeds extract: application of the particles for catalytic reduction of organic dyes, *J. Colloid Interface Sci.* 470 (2016) 268–275.
- [53] I. Spiridon, S. Colceru, N. Anghel, C.A. Teaca, R. Bodirlau, A. Armatu, Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania, *Nat. Prod. Res.* 25 (17) (2011) 1657–1661.
- [54] A. Lauren, E. Soheil, S. Mahmoud, Chapter 57-lavender (*Lavandula angustifolia*) oils, in: Victor R. Preedy (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Academic press, 2016 Department of Nutrition and Dietetics ...
- [55] C.R. Juarez Rosete, J.A. Aguilar Castillo, M.E. Juarez Rosete, R. Bugarin Montoya, P. Juarez Lopez, E. Cruz Crespo, Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación, CONACYT, 2013.
- [56] M. Lis-Balchin, *Lavender: The Genus Lavandula*, CRC Press, 2002.
- [57] S.S. Denner, *Lavandula angustifolia* miller: english lavender, *Holist. Nurs. Pract.* 23 (1) (2009) 57–64.
- [58] R. Prusinowska, K.B. Śmigielski, Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review, *Herba polonica* 60 (2) (2014) 56–66.
- [59] L. Lesage-Meessen, M. Bou, J.-C. Sigoillot, C.B. Faulds, A. Lomascolo, Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (8) (2015) 3375–3385.
- [60] A. Ciobanu, I. Mallard, D. Landy, G. Brabie, D. Nistor, S. Fourmentin, Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil, *Carbohydr. Polym.* 87 (3) (2012) 1963–1970.
- [61] L.C. Pereira, M. Pazin, M.F. Franco-Bernardes, A.d.C. Martins, G.R.M. Barcelos, M.C. Pereira, J.P. Mesquita, J.L. Rodrigues, F. Barbosa, D.J. Dorta, A perspective of mitochondrial dysfunction in rats treated with silver and titanium nanoparticles (AgNPs and TiNPs), *J. Trace Elem. Med. Biol.* 47 (2018) 63–69.
- [62] J. Skalska, B. Dąbrowska-Bouta, L. Strużyńska, Oxidative stress in rat brain but not in liver following oral administration of a low dose of nanoparticulate silver, *Food Chem. Toxicol.* 97 (2016) 307–315.
- [63] J.S. Teodoro, A.M. Simões, F.V. Duarte, A.P. Rolo, R.C. Murdoch, S.M. Hussain, C.M. Palmeira, Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: a mitochondrial perspective, *Toxicol. In Vitro* 25 (3) (2011) 664–670.
- [64] J.H. Thakar, M.N. Hassan, Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum, cortex and liver, *Life Sci.* 43 (2) (1988) 143–149.
- [65] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 177 (2) (1949) 751–766.
- [66] H.-W. Jang, B.-Y. Hwang, K.-W. Lee, Y.-M. Kim, J.-Y. Kim, Controlling the size of silver nanowires produced by a tetrabutylammonium dichlorobromide salt-based polyol process: kinetics of silver crystal growth, *AIP Adv.* 8 (2) (2018) 025303.
- [67] P. Zhang, I. Wyman, J. Hu, S. Lin, Z. Zhong, Y. Tu, Z. Huang, Y. Wei, Silver nanowires: synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications, *Mater. Sci. Eng. B* 223 (2017) 1–23.
- [68] A. Jeevika, D. Ravi Shankaran, Seed-free synthesis of 1D silver nanowires ink using clove oil (*Syzygium aromaticum*) at room temperature, *J. Colloid Interface Sci.* 458 (2015) 155–159.
- [69] H. Wang, Y. Wang, X. Chen, Synthesis of uniform silver nanowires from AgCl seeds for transparent conductive films via spin-coating at variable spin-speed, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 565 (2019) 154–161.
- [70] L. Lin, W. Wang, J. Huang, Q. Li, D. Sun, X. Yang, H. Wang, N. He, Y. Wang, Nature factory of silver nanowires: plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf, *Chem. Eng. J.* 162 (2) (2010) 852–858.
- [71] K.M.S.K. Praveen, A. Kumar, S. John, H.C. Barshilia, Synthesis of high yield silver nanowires for transparent flexible conductor applications, *Materials Today: Proceedings* 5 (4) (2018) 10883–10888 Part 3.
- [72] K. Zhang, Y. Du, S. Chen, Sub 30nm silver nanowire synthesized using KBr as cocatalyst through one-pot polyol method for optoelectronic applications, *Org. Electron.* 26 (2015) 380–385.
- [73] H. You, J. Fang, Particle-mediated nucleation and growth of solution-synthesized metal nanocrystals: a new story beyond the LaMer curve, *Nano Today* 11 (2) (2016) 145–167.
- [74] Z. Teymourli, L. Naji, Z. Fakharan, The influences of polyol process parameters on the optoelectronic characteristics of AgNWs-based flexible electrodes and their application in ITO-free polymer solar cells, *Org. Electron.* 62 (2018) 621–629.
- [75] M. Hu, J. Gao, Y. Dong, S. Yang, R.K. Li, Rapid controllable high-concentration synthesis and mutual attachment of silver nanowires, *RSC Adv.* 2 (5) (2012) 2055–2060.
- [76] T.N. Trung, V.K. Arepalli, R. Gudala, E.-T. Kim, Polyol synthesis of ultrathin and high-aspect-ratio Ag nanowires for transparent conductive films, *Mater. Lett.* 194 (2017) 66–69.
- [77] S. Ding, Y. Tian, Z. Jiang, C. Wang, Joining of silver nanowires by femtosecond laser

- irradiation method, *Mater. Trans.* MI201405 (2015).
- [78] V. Natarajan, C.L. Wilson, S.L. Hayward, S. Kidambi, Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes, *PLoS One* 10 (8) (2015) e0134541.
- [79] C. Radulescu, C. Stihl, M. Ilie, D. Lazurcă, R. Gruia, O.T. Olaru, O.C. Bute, I.D. Dulama, R.M. Stirbescu, S. Teodorescu, Characterization of phenolics in *Lavandula angustifolia*, *Anal. Lett.* 50 (17) (2017) 2839–2850.
- [80] E.S. Gil, R.O. Couto, Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications, *Rev. Bras* 23 (3) (2013) 542–558.
- [81] A.J. Purva Tiwari, B.K. Dubey, Phytochemical screening and thin layer chromatographic studies of *annona squamosa* (seeds), *azadirachta indica* (leaves) and *Lavandula angustifolia* (flower) aqueous extract, *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 6 (2) (2017) 45–53.
- [82] M. Kato, T. Tanase, Tetranuclear copper (II) complex with glucose-1-phosphate and its phosphate ester exchange with ATP, *Inorg. Chem.* 44 (1) (2005) 8–10.
- [83] H. Sigel, Ternary Cu^{2+} complexes: stability, structure, and reactivity, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14 (6) (1975) 394–402.



M. Villalpando Master in metallurgy and materials science, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Designation: Doctoral student. School: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales.



Alfredo Saavedra-Molina Doctor in Biology Sciences. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Designation: Principal Investigator. School: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Most recent publication: Donovan J. Peña-Montes, Maribel Huerta-Cervantes, Mónica Ríos-Silva, Xóchitl Trujillo, Miguel Huerta, Ruth Noriega-Cisneros, Rafael Salgado-Garciglia, Alfredo Saavedra-Molina. 2019. Protective effect of the hexanic extract of *Eryngium carlinae* inflorescences in vitro, in yeast, and in streptozotocin-induced diabetic rats. *Antioxidants*. 8(3), 73 1-12. doi:10.3390/antiox8030073.



G. Rosas Doctor in Sciences and Materials Engineering, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. Designation: Principal Investigator. School: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales. Most recent publication: Mendoza-Cachú, D., Herrero-Calvillo, R., López-Miranda, J. L., Esparza, R., & Rosas, G. (2019). FeGa₂O₄ nanowires preparation after milling and annealing of Fe doped GaN samples. *Journal of Crystal Growth*, 125220. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2019.125220>.



Ag nanoparticles synthesized using *Lavandula angustifolia* and their cytotoxic evaluation in yeast

M. Villalpando^a, Mario A. Gómez-Hurtado^b, G. Rosas^{a,*}, Alfredo Saavedra-Molina^b

^a Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, UMSNH, Ciudad Universitaria, C.P. 58000 Morelia, Michoacán, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Ciudad Universitaria, C.P. 58000 Morelia, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Silver nanoparticles
Lavandula angustifolia
 Antioxidant potential
 Cytotoxicity
Saccharomyces cerevisiae
Kluyveromyces marxianus

ABSTRACT

Since silver nanoparticles (AgNPs) are currently found in many commercial products, knowledge of their toxicity in yeast cells is essential. *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* are very similar to those of higher organisms such as mammals. Therefore, the cytotoxicity information obtained from these organisms can be related in a first approximation to human beings. In the present study, the *Lavandula angustifolia* plant extract was used as a reducing-stabilizing agent in the synthesis of silver nanoparticles. AgNPs cytotoxicity was evaluated in the yeast strains *Kluyveromyces marxianus* OFF1 and SLP1, and *Saccharomyces cerevisiae* MC4 and W303 by growth assay and colorimetric assay (MTT). The AgNPs were characterized by different techniques such as ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and X-ray diffraction (XRD). The DPPH test showed an 80% antioxidant potential in the extract of the *Lavandula angustifolia* plant and showed a decrease in free radicals attributed to the reduction reaction of Ag⁺ to AgNPs. SEM and TEM showed AgNPs obtained with an average size of 18 nm and two types of morphologies, spherical and triangular. XRD patterns showed Ag solids with the fcc crystal structure. FTIR spectroscopies in conjunction with NMR confirmed that glycosylated flavonoids were responsible for the stabilization and reduction of NPs. A significant result from this study is that AgNPs did not show cytotoxicity on cell viability and growth inhibition on *Kluyveromyces marxianus* OFF1 and SLP1 strains, and *Saccharomyces cerevisiae* MC4 and W303. However, it was verified that those of the genus *Kluyveromyces marxianus* presented greater resistance to growth and cell viability.

1. Introduction

AgNPs have novel physical and chemical properties, such as optical, thermal, electrical, and biological. The AgNPs are strongly directed towards biological applications as imaging probes, biosensors, drug delivery carriers, and killing radiation of cancer cells. In addition, due to their antibacterial properties, they are applied as a coating for surgical material, filters, and biofilms used in the food industry [1,2]. AgNPs have a toxicological impact according to their properties. Oxygen deficiency and high surface area are two crucial parameters that benefit industrial applications [3–6]. However, the fundamental properties associated with the toxicity of nanomaterials are according to their size, shape, chemical composition, surface properties, biocorona formation, agglomeration, state of aggregation, and biodegradability [7–10]. These properties affect toxicokinetics, cellular uptake, trafficking, and

responses. The main characteristic of the mechanism of toxicity in biological systems of AgNPs is their dissolution [11,12]. AgNPs in the form of Ag⁰ dissolve in the acidic lysosome and become Ag⁺, which increases the permeabilization of the lysosome membrane. Ag⁺ content damages the cytoplasm of mitochondria and results in reactive oxygen species (ROS) generation and cell apoptosis [13,14]. Upon dissolving in the lysosome, unstable Ag⁺ ions evolve to Ag–O– through binding with organic acids [15]. Once they encounter cysteine-containing proteins in the cytoplasm, Ag–O– will convert to Ag–S–, which can induce apoptosis involved in mitochondria and facilitate silver excretion [7,16]. Therefore, its applications in biological systems are wide, highlighting those of biomedicine as antibacterial agents [17], antifungal agents [18,19], improvement of chemotherapy efficacy against cancer cells [20,21], for drug delivery systems [22], modification of catheters [23], dental applications [24,25], in wound healing and bone systems [26,27], among

* Correspondence to: Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, UMSNH, Edificio U, Ciudad Universitaria, CP 58060 Morelia, Michoacán, Mexico.
 E-mail addresses: mvillalpando@umich.mx (M. Villalpando), mario.gomez@umich.mx (M.A. Gómez-Hurtado), grtrejo@umich.mx, grtrejo07@yahoo.com.mx (G. Rosas), saavedra@umich.mx (A. Saavedra-Molina).

<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103633>

Received 1 November 2021; Received in revised form 2 March 2022; Accepted 29 April 2022

Available online 2 May 2022

2352-4928/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

others.

Chemical, physical and biological methods have prepared AgNPs [28–31]. However, chemical methods are more common, including microemulsion, microwave-assisted synthesis, photoinduced reduction, synthetic electrochemical approach, and chemical reduction [32–36]. For example, Nikolopoulou et al. synthesized AgNPs with spherical and rod morphologies by modifying the polyol method using ethylene glycol (EG) as a reducing agent and polyvinylpyrrolidone (PVP) as the stabilizing agent. The mean diameter of the particles ranged between 10 and 20 nm, evaluating their antimicrobial activity in 2 strains of bacteria and their cytotoxicity in red blood cells [37]. On the other hand, Choudhury et al. used a conventional chemical method that synthesized the AgNPs from reduction with sodium citrate and stabilized with catechol in an aqueous solution. The particles presented multiple forms with high polydispersity with an average size of 51 ± 1 nm. The anti-biofilm activity of catechol functionalized AgNPs was evaluated, showing positive results for *P. aeruginosa* (gram-negative) and *B. subtilis* (gram-positive) bacteria [38].

However, it is essential to find alternative AgNPs synthesis methods that are environmentally friendly to avoid harmful waste substances [39–41]. The biological synthesis methods explored the possibility of obtaining AgNPs for biomedical applications [42–44]. Among them, aqueous plant extracts are the most technical facility. The organic waste generated after these green methods reduces the possible toxicity found for biological purposes. The aqueous plant extracts contain biological substances acting as reducing and stabilizing agents become a viable option for the AgNPs preparation and their use for biomedical applications. Also, the green methods are simple and low cost compared to other synthesized methods. This method elaborates AgNPs with different sizes and shapes, such as triangular nanoprisms, truncated triangles, nanoplates, pentagons, hexagons, rod-shaped, spherical, and semispherical [45–50]. For example, Kambale et al. prepared AgNPs with spherical shapes and sizes ranging from 45 nm to 100 nm using different species of Congolese plant extracts. The antibacterial effects of AgNPs against *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *S. aureus*, pathogens commonly involved in infectious skin diseases, were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) that showed positive results [51].

Furthermore, Hasnain et al. synthesized AgNPs using a methanolic solution of purple heart plant leaves, varying the precursor salt concentration, temperature, and agitation, obtaining AgNPs with spherical shapes and average sizes of 98 nm with a polydispersity index of 0.15. These AgNPs showed antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* at a 100 µg/ml concentration, demonstrating a high potential in biomedicine and therapeutic applications [52].

On the other hand, Jalilian et al. synthesized AgNPs using *Allium ampeloprasum* extract, where the theoretical yield of the synthesis reaction was 42%. According to TEM studies, the nanoparticles were spherical, ranging from 2.3 to 27 nm. As a complement, the cytotoxicity of AgNPs was evaluated in Hela cells, bTC-3, and normal fibroblasts by the MTT colorimetric method, obtaining a low cytotoxicity for most of the cells except for Hela [53].

It is essential to identify the antioxidant capacity of the plant extract employing the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl hydrate (DPPH) test and relate it to the metal ion reduction capacity. For example, Khorrami et al. studied the extract of black skin pomegranate through the DPPH test, obtaining 100% free radicals inhibition [54].

On the other hand, yeast has been used as a model for eukaryotic cells because it shows similarities with the cellular structure of plants and animals [55,56]. Few studies have focused on the cytotoxicity of AgNPs in yeast, although some show that, at low concentrations, they induce sublethal effects [1,57]. Kasemets et al. evaluated the AgNPs in the unicellular yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, demonstrating that the size, the coating, and the charge of the particle are essential factors of toxicity. Furthermore, Marquéz et al. demonstrated the toxicity of silver and zinc oxide nanoparticles in the eukaryotic model

Saccharomyces cerevisiae, identifying that AgNPs influence yeast growth by reducing transcription rates, cellular respiration, and endocytosis.

It has been proven that the use of infusions benefits the symbiosis between silver nanoparticles and biological models, allowing a vast potential for uses in applications involving living beings [58]. Knowledge of the toxicity of AgNPs in yeast cells, especially *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*, which closely resemble those of higher organisms such as mammals [59], is essential since they are currently found in a large number of commercial products [60,61]. The information derived from these studies can be correlated in a first approximation with the effects in humans. Thus, due to the possible direct or indirect daily contact of AgNPs with humans, it is essential to evaluate their possible cytotoxicity in yeast.

Thus, this study presents the green synthesis of AgNPs using *Lavandula angustifolia* plant extract. AgNPs cytotoxicity was evaluated in different yeast strains, such as *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. The extract of the *Lavandula angustifolia* plant can be used as a reducing agent for the synthesis of AgNPs, due to a large amount of the flavonoid kaempferol malonyl glucoside. In addition, in lower concentrations, it also presents the following antioxidant compounds, ursolic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid - 4 - O - glucoside, rosmarinic acid, apigenin rhamnosyl glucoside, and i - vitexin kaempferol - 3 - coumaroyl glucoside [62]. The *Lavandula angustifolia* plant grows in dry and sunny soils, facilitating its cultivation and bioavailability [63,64]. Since ancient times, the medicinal extract has been used as an anti-inflammatory and sedative to combat stress and insomnia, but mainly as an aromatic in perfumery, cosmetics, and cleaning products [65,66]. In addition, it is used to eradicate degenerative, infectious, and carcinogenic diseases [63,67,68]. In the past, our group synthesized silver nanowires (AgNWs) using the extract of the *Lavandula angustifolia* plant. In that work, the cytotoxicity of AgNWs in rat liver mitochondria was evaluated [69].

2. Experimental

AgNPs were prepared by a simple green method and in a single step using the aqueous extract of *Lavandula angustifolia* at room temperature.

2.1. Preparation of *Lavandula angustifolia* extract and silver nitrate solution

For the preparation of the aqueous extract, the dry plant purchased from a local market was mechanically crushed in its aerial parts. 2 g of the powder were taken and mixed with 100 ml of distilled water previously heated to a temperature of 60 °C. The infusion preparation time was 20 min, keeping the temperature and magnetic stirring constant. The extract was stored in an airtight container at room temperature. On the other hand, the precursor salt (AgNO₃) was prepared at different concentrations between 1 and 9 mM using the same solvent.

2.2. *Lavandula angustifolia* potential antioxidant assay (DPPH)

For the antioxidant-potential test, an ethanolic solution of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate, DPPH (0.2 mM) was mixed with 0.02 g/ml of the plant extract solution before and after the reduction reaction. Moreover, an aqueous solution of AgNO₃ (2.5 mM) was evaluated. UV-Vis spectrometer measured the samples at 560 nm after their incubation for 30 min Eq. (1) calculated the free radicals (%).

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 100 * \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \quad (1)$$

2.3. Synthesis of silver nanoparticles

The method was performed at room temperature by volumetrically mixing (1:1) the plant infusion at a 0.02 g/ml concentration with the

precursor salt AgNO_3 at the previously described concentrations (1–9 mM). The color change of the solution was from yellow to brown, indicative of the formation of the AgNPs. The final brown solution was centrifuged 3 times at 12,000 rpm for 20 min to obtain the nanoparticles under study. The precipitate resulting from the process was redispersed in deionized water for later use in cytotoxicity tests.

2.4. Characterization of AgNPs

The UV-Vis spectroscopy evaluated the synthesis of AgNPs at a wavelength of 200–900 nm. Measurements were made on an Ocean Optics USB-4000 at room temperature in polyethylene cells using distilled water as the blank. SEM determined the size and dispersion of the nanoparticles in Jeol JSM-7600F equipment. EDS (Philips X) confirms the chemical composition of the samples. Also, TEM analysis performs using Philips Tecnai F20 equipment. In this case, a sample drop is deposited on a 3 mm diameter copper grid covered with an amorphous carbon film. XRD studies were performed in a D8 Advance DAVINCI diffractometer using an angular range of 20–70 degrees, applying 3 s per step. With the purpose to know the substances involved in the synthesis and stabilization of AgNPs, infrared spectroscopy and (^1H NMR) studies were performed on the plant extract before and after reducing reaction. The samples were examined in both a Bruker Tensor 27 and Varian 400 types of equipment, respectively.

2.5. Cytotoxicity assays

For growth assay, 200 μl of pre-inoculum consisting in the *Kluyveromyces marxianus* OFF1, and SLP1, *Saccharomyces cerevisiae* MC4, and W303 yeasts were added in 10 ml of a YPD culture medium and 1 ml 20% glucose. Subsequently, AgNO_3 , AgNPs, and *Lavandula angustifolia* plant extract solutions were mixed for the growth assay. The mixtures were incubated at 27 °C and magnetically stirred at 110 rpm for 24 h. Finally, the optical density was determined at 625 nm. The YPD medium with yeast was used as a control. The growth results were obtained by Eq. (2).

$$\text{Increase } (\%) = \frac{OD_{\text{Treated cells}}}{OD_{\text{control}}} * 100 \quad (2)$$

The colorimetric-based test of cell viability assay was performed by the enzyme reduction of the molecule 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) to formazan. The MTT color change from yellow to purple results in molecule reduction. The strains (3 ml) were mixed with AgNPs, AgNO_3 , and *Lavandula angustifolia* plant extract and incubated for 60 min in the dark and their optical density measurement at 570 nm. MTT solution is a positive control.

3. Results and discussion

The free radicals' colorimetric assay DPPH was used to confirm the compounds' antioxidant activity in reducing and stabilizing the AgNPs. Fig. 1 shows the percentage of the free radicals' quenching of the

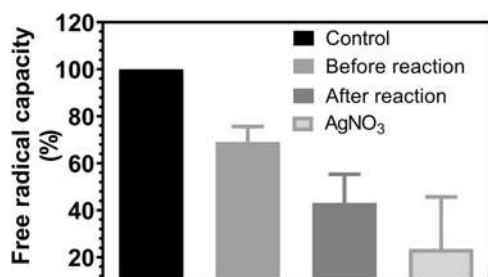


Fig. 1. DPPH assay of *Lavandula angustifolia* plant extract compared with AgNPs and AgNO_3 .

Lavandula angustifolia plant extract compared with AgNPs and precursor salt AgNO_3 . Notably, the extract plant *Lavandula angustifolia* presents a higher percentage of free radical scavengers, indicating a higher presence of antioxidant compounds available for the reduction and stabilization of the silver nanoparticle synthesis. The AgNPs solution observed a decrease in the free radicals caused by the reduction reaction in the nanoparticles' formation process. Also, the results corresponding to the aqueous solution of AgNO_3 were added to prove that it is not a reducing compound, so its free radical quenching capacity is not significant.

The solution's color change from yellow to dark brown is due to AgNPs surface plasmon resonance (SPR) [9]. UV-Vis spectroscopy evaluated the effect of the precursor (AgNO_3) on the synthesis reaction, as shown in Fig. 2. An SPR band located at 460 nm confirms AgNPs formation. The amount of AgNPs increases for the precursor concentration ranged from 1 to 7 mM, indicated by the increase in peak intensity, except for 9 mM concentration. The previous results are attributed to the antioxidant capacity of the *Lavandula angustifolia* plant extract for the bioreduction of AgNPs. The best results were found at the 5 mM concentration due to the higher intensity and the SPR band shape, which means homogeneous AgNPs sizes. However, *Lavandula angustifolia* stabilizing capacity exceeded at the 9 mM concentration, causing AgNPs coalescence due to the observed SPR peak broadening and intensity decrease, generating sizes outside the nanometric scale.

Fig. 3 shows a couple of SEM Z-contrast micrographs corroborating the AgNPs synthesis by the *Lavandula angustifolia* plant extract. The low-magnification micrograph (Fig. 3a) shows a dense population of AgNPs. While, the high-magnification image (Fig. 3b) illustrates semi-spherical NPs and triangular nanoplates, having sizes smaller than 100 nm. In the case of nanoplates, two orientations appear differing by the Z contrast variations. Also, the EDS analysis confirms the presence of reduced silver (inset Fig. 3a).

The XRD pattern was recorded after 72 h of reaction time to confirm the crystalline structure of the products, as shown in Fig. 4. The prominent diffraction peaks located at 38°, 44.5°, 64.5° and 77.6° correspond to the planes (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) and (3 1 1) of the Ag fcc, (PDF number 01-087-0720). From the (1 1 1) reflection, the FWHM, and the Scherrer equation, the measured crystallite size was 20 nm. Other peaks in the XRD pattern correspond to the organic compounds responsible for AgNPs stabilizing, which is discussed later in the FTIR analysis.

TEM analyzed the structure, morphology, and size of the AgNPs. Fig. 5a confirms the presence of AgNPs with semispherical and triangular morphologies below 100 nm. Furthermore, the histogram (Fig. 5b) achieved with 250 particles reveals AgNPs ranging from 5 to 90 nm. However, the highest frequency is between 10 and 20 nm, with an average size of 18 nm.

Fig. 5c shows a high-resolution transmission electron micrograph (HRTEM) of the AgNPs obtained. The presence of lattice planes in the image and the fast Fourier transform (FFT) confirm the crystalline nature of the nanoparticles. The interplanar distance of the lattice fringes was approximately 0.24 nm, which coincides with the (111) fcc Ag

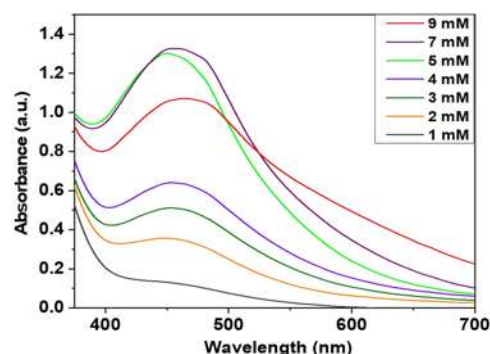


Fig. 2. UV-Vis spectra obtained from different molar concentrations.

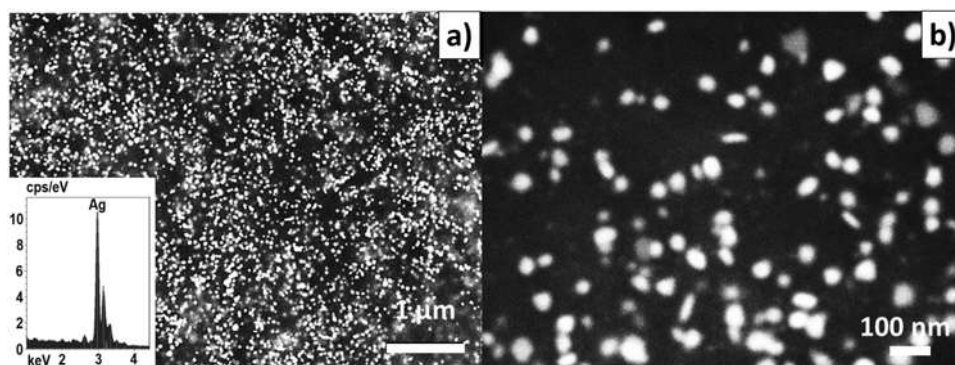


Fig. 3. SEM images of the AgNPs and EDS chemical analysis (insert).

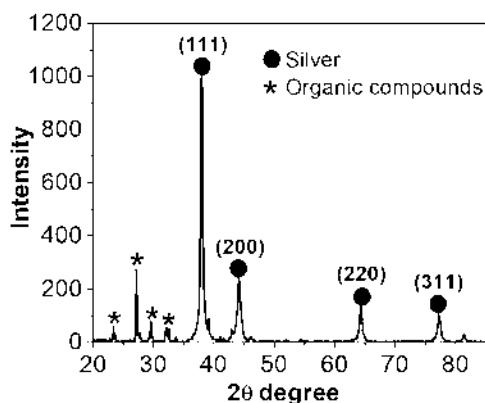


Fig. 4. X-Ray diffraction patterns of the AgNPs.

planes. These findings are in good agreement with the XRD analysis.

In the spectrum before reduction (Fig. 6a), typical hydrogen resonances of aromatic compounds were observed in the range of δ 7.50–5.95, as well as those of glycosidic residues between δ 5.50–3.02, including a doublet at δ 1.17 (6.9 Hz), typical of the methyl of the rhamnose moiety [70], suggesting the presence of glycosidic flavonoids [71] as the main constituents of the plant extract, which is consistent with the previous literature on *Lavandula angustifolia* metabolites [72, 73]. After the redox reaction (Fig. 6b), the ^1H NMR spectrum of the supernatants showed only the presence of glycosidic compounds (δ 5.50–3.02), which suggests that the flavonoids reacted with the metal source and were anchored in the reaction of the metallic product.

Therefore, phenolic compounds act as a reducing agent.

Infrared spectroscopy is an alternative to identifying functional groups of compounds involved in the synthesis of AgNPs [74,75]. Fig. 7a shows the IR spectrum of the *Lavandula angustifolia* plant extract. The following bands are in agreement with the presence of flavonoid compounds; OH stretching vibration at 3329 cm^{-1} , CH stretching at 2922 and 2852 cm^{-1} , carbonyl stretching vibrations at 1732 and 1651 cm^{-1} , sp^2 carbon stretching vibration at 1604 cm^{-1} , the CO band at 1236 cm^{-1} ; C-H out-of-plane strain vibration of aromatic rings at 850 cm^{-1} [76, 77]. The most intense band observed at 1020 cm^{-1} was defined as a characteristic glucose peak [78]. These functional groups agree well with those determined by NMR.

Fig. 7b shows the FTIR spectrum of the biosynthesized AgNPs. It conserved the band corresponding to flavonoid compounds, shifting towards smaller wavelengths observed for flavonoid-metal complexes [79–81]. O-H vibration was observed at 3000 cm^{-1} , while C-H stretching was observed at 2923 cm^{-1} , carbonyl stretching 1600 cm^{-1} (C = O). A band at 1379 cm^{-1} was associated with C-O, whose wave number increased due to oxygen-metal coordination as suggested in other works for the coordination complexes of flavonoids with transition metals [72].

It is necessary to mention that in strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*, resistance to external factors is related to more significant oxidative stress and antioxidant capacity. Consequently, the overexpression of antioxidant enzyme genes in *Saccharomyces cerevisiae* such as catalase [82]. In a previous study [83], the *Kluyveromyces marxianus* strain *SLP1* showed a higher specific growth rate, biomass yield. However, it also showed decreased doubling time, ROS production, lipid peroxidation, and increased catalase activity caused by membranes enriched in saturated fatty acids. Therefore, the

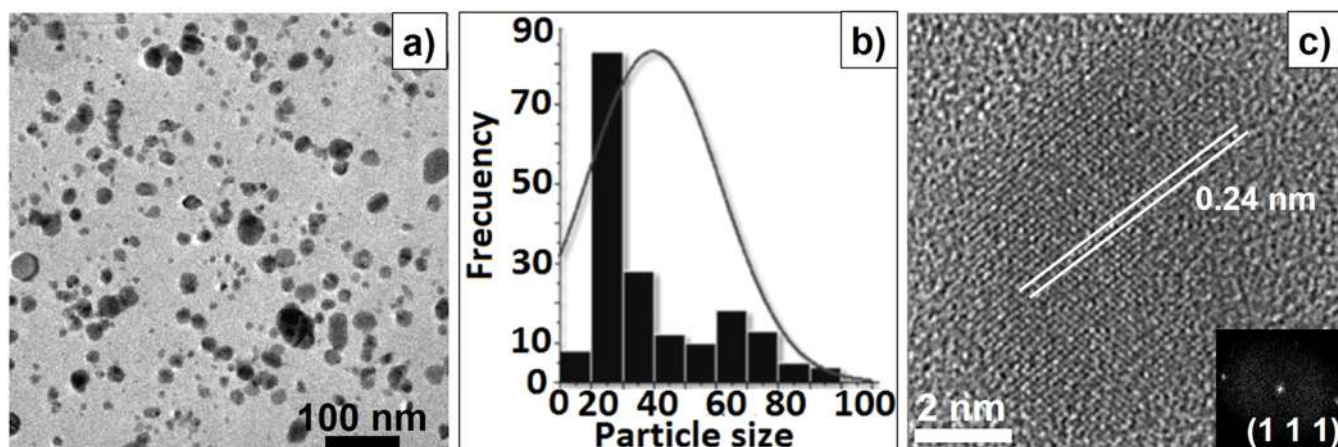


Fig. 5. a) Bright-field TEM image showing AgNPs with spherical and triangular morphologies, b) Histogram, and c) their high-resolution image (HRTEM).

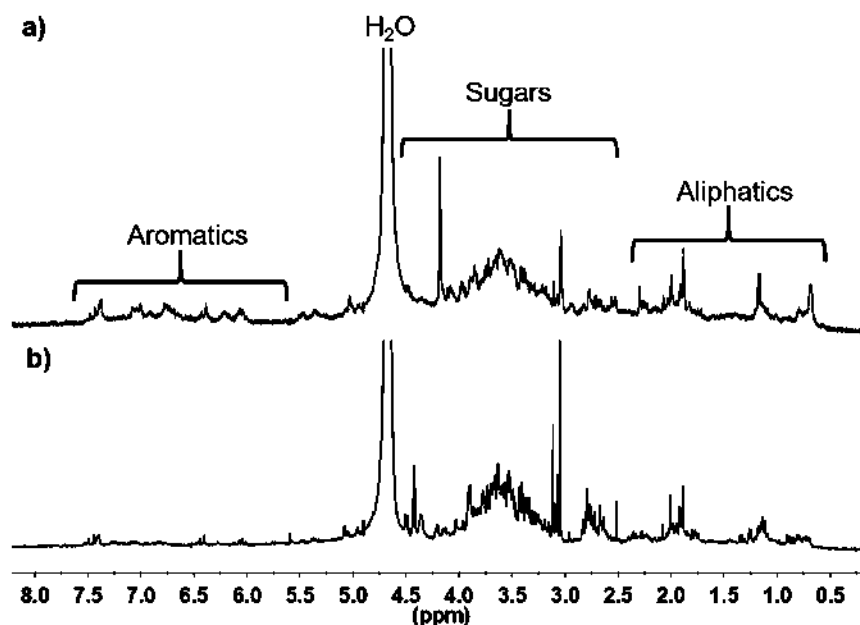


Fig. 6. Comparison of ^1H NMR spectra from (a) *Lavandula angustifolia* extract and (b) supernatant from silver nanoparticles reaction.

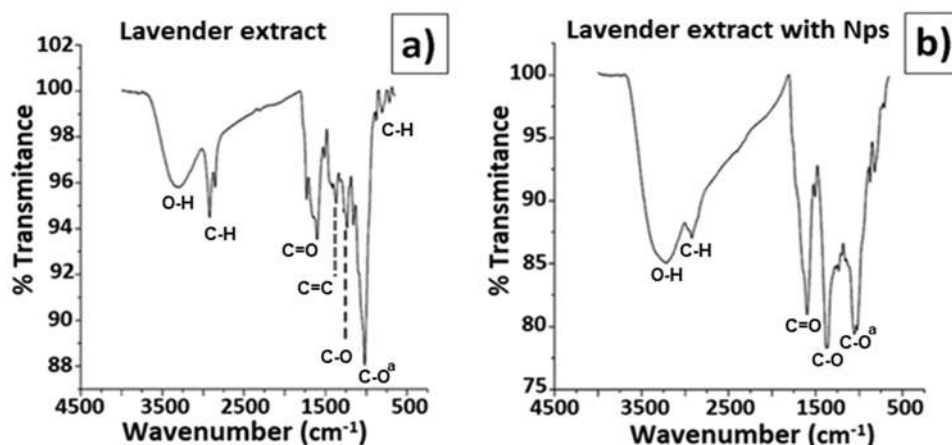


Fig. 7. FTIR images spectra obtained from the different samples (a) extract prepared from *Lavandula angustifolia* (b) AgNPs.

main difference between the yeast strains is the composition of fatty acids, where the highest concentration belongs to the *Kluyveromyces marxianus SLP1* strain, followed by *Kluyveromyces marxianus OFF1*, *Saccharomyces cerevisiae MC4* and *Saccharomyces cerevisiae W303*, respectively. The primary saturated fatty acids in yeast strains are myristic, palmitic, stearic and arachidic. On the other hand, palmitoleic acid is the unsaturated fatty acid with the highest concentration in the strain *Saccharomyces cerevisiae W303* and *Kluyveromyces marxianus OFF1*, while in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae MC4* and *Kluyveromyces marxianus SLP1*, oleic acid is present in higher concentration. It is vital because oleic acid is essential for membrane fluidity.

Fig. 8 shows the growth of 4 yeast strains exposed to *Lavandula angustifolia* plant extract, 2.5 mM AgNPs solution, and 2.5 mM AgNO_3 aqueous solution. The four strains in the YPD medium were used as controls for the assay. Fig. 8a shows the evaluation of the different solutions in 100 μl in the *Saccharomyces cerevisiae MC4* strain. The results indicate approximately a 20% decrease in the strain in the plant extract and AgNPs. On the other hand, the yeasts incubated with AgNO_3 showed a decrease of up to 50% in their growth, determining that the AgNPs have less toxicity than the ionic forms. Fig. 8b shows a similar comparison with the yeast *Kluyveromyces marxianus OFF1* without

significant growth changes for the three cases. Fig. 8c shows the results of the different solutions evaluated in the *Kluyveromyces marxianus SLP1* strain. Yeast growth in the plant extract is attributed to the sugars identified by NMR and FTIR. Finally, Fig. 8d shows the graph of the solutions evaluated in the strain *Saccharomyces cerevisiae W303*, showing a 10% decrease in AgNPs. The results did not show significant changes in growth since the treated incubated strains showed a similar effect to those without treatment. On the other hand, it is noticeable that the genus *Kluyveromyces marxianus* showed higher resistance than the *Saccharomyces cerevisiae* strains.

The MTT assay is responsible for determining the mitochondrial functionality of the treated cells. Fig. 9 shows the effect of the different solutions (AgNPs, plant extract, and AgNO_3) in the four yeast strains studied. It is noteworthy that the AgNPs did not present a significant change in the cellular viability for *Saccharomyces cerevisiae MC4* (Fig. 9a). On the contrary, the metabolic functionality of the yeasts exposed to AgNO_3 salt showed a decrease up to approximately 50%. Fig. 9b does not show significant damage in the *Kluyveromyces marxianus OFF1* strain with the AgNPs solution. The *Kluyveromyces marxianus SLP1* strain has the best resistance to cellular damage (Fig. 9c) because it does not show any significant change in the plant extract, AgNPs, and AgNO_3

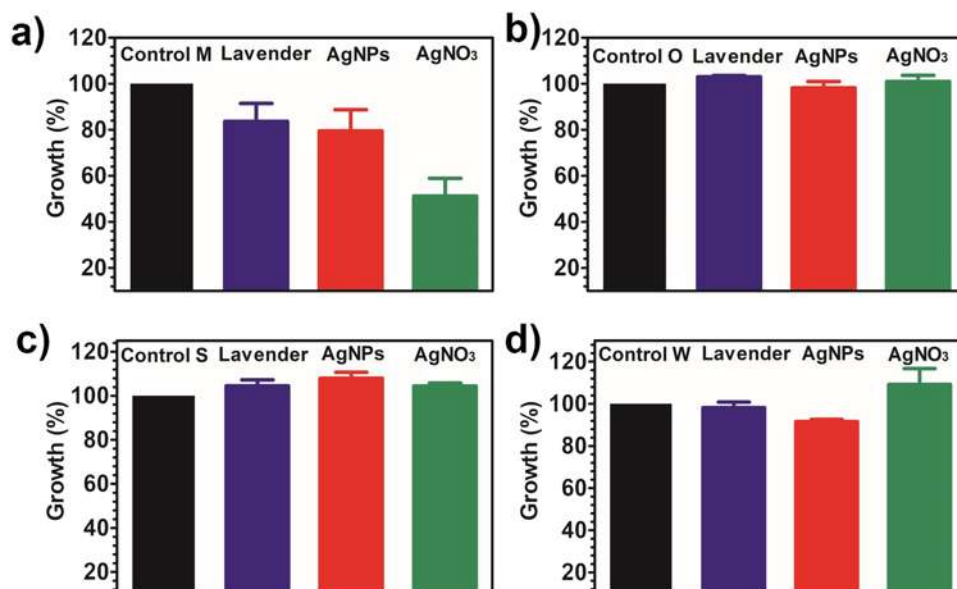


Fig. 8. Cellular growth assay of the different yeasts strains a) *S. cerevisiae* MC4 b) *K. marxianus* OFF1 c) *K. marxianus* SLP1 and d) *S. cerevisiae* W303.

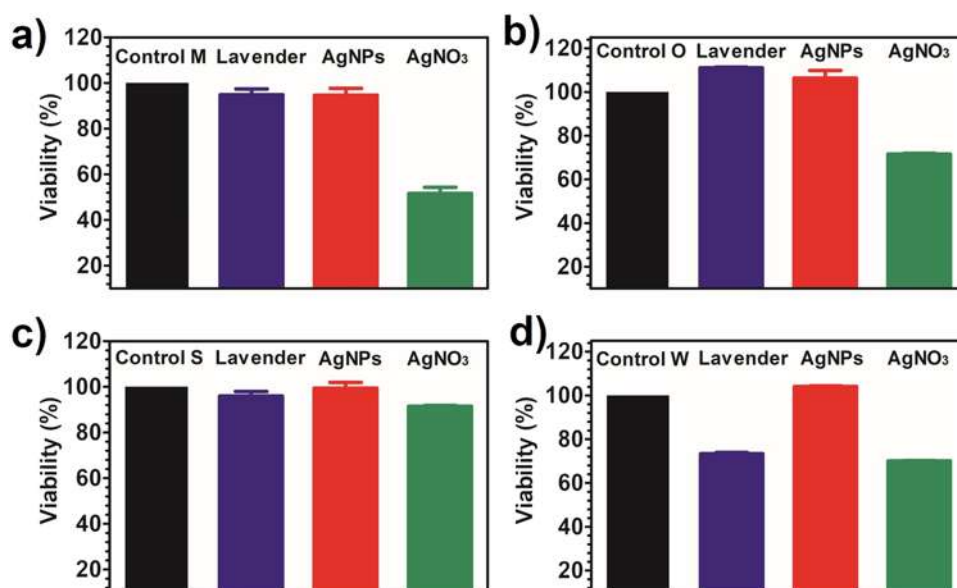


Fig. 9. Cellular viability assay of the different yeast strains a) *S. cerevisiae* MC4 b) *K. marxianus* OFF1 c) *K. marxianus* SLP1 and d) *S. cerevisiae* W303.

salt solution. Finally, Fig. 9d shows the results obtained for *Saccharomyces cerevisiae* W303 strain after the treatment. It was observed that the viability suffers a reduction of approximately 30% in the case of AgNO₃ addition. Also, a reduction in cell viability is noticeable when the *Saccharomyces cerevisiae* W303 strain is exposed to the *Lavandula angustifolia* plant extract. Some studies show that the *Saccharomyces cerevisiae* strain has the least resistance to external factors. Arellano-Plaza et al. [84] reported that *Saccharomyces cerevisiae* MC4 and *Kluyveromyces marxianus* OFF1 and SLP1 yeast strains could resist oxidative stress long time compared to *Saccharomyces cerevisiae* W303.

For this reason, we suggest that the components of the plant such as the flavonoid kaempferol malonyl, ursolic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid - 4 - O - glucoside, rosmarinic acid, apigenin rhamnosyl glucoside, and i-vitexin kaempferol - 3 - coumaroyl glucoside cause an increase in oxidative stress, favoring the accumulation of ROS. It is essential to mention that the *Saccharomyces cerevisiae* W303 strain has low viability, specific growth rate, and biomass yield since its

physiological characteristics are those of a "factory organism cell." In addition, changes in the lipid composition of the cell can influence the activity of many membrane-associated proteins and transporters, leading to growth arrest and cell death. In summary, the high concentration of secondary metabolites in the *Lavandula angustifolia* plant extract causes a significant alteration of the membrane lipids in *Saccharomyces cerevisiae* W303, affecting the function of proteins, preventing their adaptation, and reducing their viability.

The above results indicate that the nanoparticles do not cause a decrease in the cellular metabolic processes studied in the four strains. Only in the case of AgNO₃ salt addition did the cell viability present some significant change, showing that the AgNPs presents less toxicity than ionic silver. On the other hand, the plant extract can increase the viability compared with the control attributed to the presence of carbohydrates facilitating cellular metabolism.

4. Conclusions

The green synthesis of AgNPs was achieved using the extract of the *Lavandula angustifolia* plant as a reducing and stabilizing agent. The reduction potential (DPPH) of the aqueous plant extract was determined to be 80%. The concentration of the AgNO₃ precursor salt was varied, obtaining the best result at a concentration of 5 mM. The UV-Vis technique indicated an SPR band around 460 nm, corroborating the formation of AgNPs. TEM, XRD, and SEM show the FCC structure of AgNPs with a mean size of 18 nm and spherical and triangular morphologies. FTIR and ¹H NMR spectroscopies indicated that glycosylated flavonoids are associated with the reduction and stabilization of AgNPs. On the other hand, cytotoxicity tests showed that AgNPs do not exhibit significant effects on cell growth and inhibition. However, it was verified that the strains of the genus *Kluyveromyces marxianus* showed greater resistance to growth and cell viability than the genus *Saccharomyces cerevisiae*.

CRedit authorship contribution statement

M.Villalpando: Term, validation, Methodology, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Mario A. Gómez-Hurtado:** Formal analysis, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision. **Alfredo Saavedra-Molina:** Formal analysis, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision. **G. Rosas:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

M. Villalpando acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, for financial support to undertake this work.

References

- [1] X. Sun, J. Shi, X. Zou, C. Wang, Y. Yang, H. Zhang, Silver nanoparticles interact with the cell membrane and increase endothelial permeability by promoting VE-cadherin internalization, *J. Hazard. Mater.* 317 (2016) 570–578.
- [2] K.K. Hoskote Anand, B.K. Mandal, Activity study of biogenic spherical silver nanoparticles towards microbes and oxidants, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 135 (Supplement C) (2015) 639–645.
- [3] H. Gul, F.S. Khan, U. Afzal, S. Batool, S. Saddick, M. Awais, S. Irum, M.Y. Malik, M. Ijaz Khan, A. Alhazmi, S.U. Khan, Rumex hastatus derived silver nanoparticles development and their potential applications as hepatic-protection agent along with antimicrobial activity, *J. King Saud. Univ. - Sci.* 33 (7) (2021), 101587.
- [4] N. Thirumagal, A.P. Jeyakumari, Structural, optical and antibacterial properties of green synthesized silver nanoparticles (AgNPs) using *Justicia adhatoda* L. leaf extract, *J. Clust. Sci.* 31 (2) (2020) 487–497.
- [5] A. Naghizadeh, Z.M. Mizwari, S.M. Ghoreishi, S. Lashgari, S. Mortazavi-Derazkola, B. Rezaie, Biogenic and eco-benign synthesis of silver nanoparticles using *jujube core* extract and its performance in catalytic and pharmaceutical applications: removal of industrial contaminants and in-vitro antibacterial and anticancer activities, *Environ. Technol. Innov.* 23 (2021), 101560.
- [6] F. Behzad, S.M. Naghib, M.A.J. kouhbanani, S.N. Tabatabaei, Y. Zare, K.Y. Rhee, An overview of the plant-mediated green synthesis of noble metal nanoparticles for antibacterial applications, *J. Ind. Eng. Chem.* 94 (2021) 92–104.
- [7] Y. Liu, S. Zhu, Z. Gu, C. Chen, Y. Zhao, Toxicity of manufactured nanomaterials, *Particuology* 69 (2022) 31–48.
- [8] J.L. Graves, Chapter 3 - Manufacture of nanomaterials—environmental exposure, toxicity, green synthesis, and sustainability, in: J.L. Graves (Ed.), *Principles and Applications of Antimicrobial Nanomaterials*, Elsevier, 2022, pp. 31–48.
- [9] B. Pem, M. Curlin, D.D. Jurašin, V. Vrčec, R. Barbir, V. Micek, R.M. Fratila, M. Jesus, I.V. Vrčec, Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions, *Beilstein J. Nanotechnol.* 12 (1) (2021) 665–679.
- [10] S.-j Yu, Y.-g Yin, J.-f Liu, Silver nanoparticles in the environment, *Environ. Sci.: Process. Impacts* 15 (1) (2013) 78–92.
- [11] S.A. Kosa, Z. Zaheer, Biogenic fabrication of silver nanoparticles, oxidative dissolution and antimicrobial activities, *J. Saudi Chem. Soc.* (2021), 101414.
- [12] J. Zhao, X. Wang, S.A. Hoang, N.S. Bolan, M. Kirkham, J. Liu, X. Xia, Y. Li, Silver nanoparticles in aquatic sediments: occurrence, chemical transformations, toxicity, and analytical methods, *J. Hazard. Mater.* 418 (2021), 126368.
- [13] J. Zhang, S. Liu, J. Han, Z. Wang, S. Zhang, On the developmental toxicity of silver nanoparticles, *Mater. Des.* 203 (2021), 109611.
- [14] R. Rajan, P. Huo, K. Chandran, B. Manickam Dakshinamoorthi, S.-I. Yun, B. Liu, A review on the toxicity of silver nanoparticles against different biosystems, *Chemosphere* 292 (2022), 133397.
- [15] A. Malysheva, A. Ivask, C.L. Doolette, N.H. Voelcker, E. Lombi, Cellular binding, uptake and biotransformation of silver nanoparticles in human T lymphocytes, *Nat. Nanotechnol.* 16 (8) (2021) 926–932.
- [16] D. Huang, F. Dang, Y. Huang, N. Chen, D. Zhou, Uptake, translocation, and transformation of silver nanoparticles in plants, *Environ. Sci.: Nano* 9 (1) (2022) 12–39.
- [17] A. Bergal, G.H. Matar, M. Andaç, Olive and green tea leaf extracts mediated green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs): comparison investigation on characterizations and antibacterial activity, *BioNanoScience* (2022) 1–15.
- [18] Y.M.A. Mohamed, I.E. Elshahawy, Antifungal activity of photo-biosynthesized silver nanoparticles (AgNPs) from organic constituents in orange peel extract against phytopathogenic *Macrophomina phaseolina*, *Eur. J. Plant Pathol.* (2022) 1–14.
- [19] D. Elangovan, H.B.H. Rahman, R. Dhandapani, V. Palanivel, S. Thangavelu, R. Paramasivam, S. Muthupandian, Coating of wallpaper with green synthesized silver nanoparticles from *Passiflora foetida* fruit and its illustrated antifungal mechanism, *Process Biochem.* 112 (2022) 177–182.
- [20] N.T.L. Chi, G.R. Veeraragavan, K. Brindhadevi, A. Chinnathambi, S.H. Salmen, S. A. Alharbi, R. Krishnan, A. Pugazhendhi, Fungi fabrication, characterization, and anticancer activity of silver nanoparticles using metals resistant *Aspergillus niger*, *Environ. Res.* (2022), 112721.
- [21] M.E. Taghavizadeh Yazdi, M. Darroudi, M.S. Amiri, H. Zarrinfar, H.A. Hosseini, M. Mashreghi, H. Mozafarri, A. Ghorbani, S.H. Mousavi, Antimycobacterial, anticancer, antioxidant and photocatalytic activity of biosynthesized silver nanoparticles Using *Berberis Integriflora*, *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A: Sci.* 46 (1) (2022) 1–11.
- [22] A.R. Afshari, M. Sanati, H. Mollazadeh, P. Kesharwani, T.P. Johnston, A. Sahebkar, Nanoparticle-based drug delivery systems in cancer: a focus on inflammatory pathways, *Semin. Cancer Biol.* (2022).
- [23] M. Divya, G.S. Kiran, S. Hassan, J. Selvin, Biogenic synthesis and effect of silver nanoparticles (AgNPs) to combat catheter-related urinary tract infections, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18 (2019), 101037.
- [24] V. Manikandan, P. Velmurugan, J.-H. Park, W.-S. Chang, Y.-J. Park, P. Jayanthi, M. Cho, B.-T. Oh, Green synthesis of silver oxide nanoparticles and its antibacterial activity against dental pathogens, *3 Biotech* 7 (1) (2017) 1–9.
- [25] O. Ahmed, N.R.S. Sibuyi, A.O. Fadaka, M.A. Madiehe, E. Maboza, M. Meyer, G. Geerts, Plant extract-synthesized silver nanoparticles for application in dental therapy, *Pharmaceutics* 14 (2) (2022) 380.
- [26] A.A. Abdellatif, N.S. Tolba, O. Al Rugaie, F.A. Alhumaydhi, A.M. Mousa, Green synthesis of silver nanoparticles for enhancing wound healing activity in rats, *Saudi Pharm. J.* (2022).
- [27] S. Majeed, F.H.B. Aripin, N.S.B. Shueb, M. Danish, M.M. Ibrahim, R. Hashim, Bioengineered silver nanoparticles capped with bovine serum albumin and its anticancer and apoptotic activity against breast, bone and intestinal colon cancer cell lines, *Mater. Sci. Eng.: C* 102 (2019) 254–263.
- [28] M.A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A.N. Sabri, S. Riaz, S. Naseem, Size-and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes, *Nanomaterials* 6 (4) (2016) 74.
- [29] A.O. El-Gendy, A. Samir, E. Ahmed, C.S. Enwemeka, T. Mohamed, The antimicrobial effect of 400 nm femtosecond laser and silver nanoparticles on gram-positive and gram-negative bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 223 (2021), 112300.
- [30] N. Goel, R. Ahmad, R. Singh, S. Sood, S.K. Khare, Biologically synthesized silver nanoparticles by *Streptomyces* sp. EMB24 extracts used against the drug-resistant bacteria, *Bioresour. Technol. Rep.* 15 (2021), 100753.
- [31] R. Kaliammal, G. Parvathy, G. Maheshwaran, K. Velsankar, V.K. Devi, M. Krishnakumar, S. Sudhahar, Zephyranthes candida flower extract mediated green synthesis of silver nanoparticles for biological applications, *Adv. Powder Technol.* (2021).
- [32] B. Dong, N. Xue, G. Mu, M. Wang, Z. Xiao, L. Dai, Z. Wang, D. Huang, H. Qian, W. Chen, Synthesis of monodisperse spherical AgNPs by ultrasound-intensified Lee-Meisel method, and quick evaluation via machine learning, *Ultrason. Sonochem.* 73 (2021), 105485.
- [33] Ö. Kaplan, N.G. Tosun, A. Özgür, S.E. Tayhan, S. Bilgin, İ. Türkekül, İ. Gökce, Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using crude extracts of *Boletus edulis* and *Coriolus versicolor*: characterization, anticancer, antimicrobial and wound healing activities, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 64 (2021), 102641.
- [34] W. Zou, Z. Liu, R. Li, C. Jin, X. Zhang, K. Jiang, Photoinduced transformation of silver ion by molybdenum disulfide nanoflakes at environmentally relevant concentrations attenuates its toxicity to freshwater algae, *J. Hazard. Mater.* 416 (2021), 126043.
- [35] I. Ivanišević, S. Milardović, P. Kassa, M. Zlatar, Electrochemical and spectroscopic characterization of AgNP suspension stability influenced by strong inorganic acids, *Electrochim. Acta* 377 (2021), 138126.

- [36] D. Singha, D.K. Sahu, K. Sahu, Probing the interfacial transition of acetonitrile/AOT/n-heptane microemulsion through in situ silver colloid synthesis, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 574 (2019) 171–177.
- [37] N.G. Sofia, B. Nikos, S. Elias, E.K. Eleni, Synthesis of biocompatible silver nanoparticles by a modified polyol method for theranostic applications: studies on red blood cells, internalization ability and antibacterial activity, *J. Inorg. Biochem.* 211 (2020), 111177.
- [38] R. Choudhury, M. Majumdar, P. Biswas, S. Khan, T.K. Misra, Kinetic study of functionalization of citrate stabilized silver nanoparticles with catechol and its anti-biofilm activity, *Nano-Struct. Nano-Objects* 19 (2019), 100326.
- [39] Z. Shah, T. Gul, S.A. Khan, K. Shaheen, Y. Anwar, H. Suo, M. Ismail, K. M. Alghamdi, S.M. Salman, Synthesis of high surface area AgNPs from *Dodonaea viscosa* plant for the removal of pathogenic microbes and persistent organic pollutants, *Mater. Sci. Eng.: B* 263 (2021), 114770.
- [40] A.K. Murugesan, B. Pannerseelvam, A. Javee, M. Rajenderan, D. Thiyagarajan, Facile green synthesis and characterization of *Gloriosa superba* L. tuber extract-capped silver nanoparticles (GST-AgNPs) and its potential antibacterial and anticancer activities against A549 human cancer cells, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 15 (2021), 100460.
- [41] A.U. Khan, Q. Yuan, Z.U.H. Khan, A. Ahmad, F.U. Khan, K. Tahir, M. Shakeel, S. Ullah, An eco-benign synthesis of AgNPs using aqueous extract of *Longan fruit peel*: Antiproliferative response against human breast cancer cell line MCF-7, antioxidant and photocatalytic deprotection of methylene blue, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 183 (2018) 367–373.
- [42] V. Chandrakala, V. Aruna, G. Angajala, Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems, *Emergent Mater.* (2022) 1–23.
- [43] V. Ramalingam, Silver nanoparticles for biomedical applications, *Nanopart. Therap.* (2022) 359–375.
- [44] C. You, C. Han, X. Wang, Y. Zheng, Q. Li, X. Hu, H. Sun, The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity, *Mol. Biol. Rep.* 39 (9) (2012) 9193–9201.
- [45] G.T. Elakkiya, G. Balaji, H. Padhy, R. Lakshmiopathy, Synthesis of silver nanoplates using regenerated watermelon rind and their application, *Mater. Today: Proc.* (2021).
- [46] N. Ashraf, F. Ahmad, Y. Lu, D.-C. Yin, Bacterial extracellular protein interacts with silver ions to produce protein-encapsulated bactericidal AgNPs, *Process Biochem.* 106 (2021) 120–129.
- [47] L. Chatchawanwirote, P. Chuysinuan, T. Thanyacharoen, P. Ekabutr, P. Supaphol, Green synthesis of photomediated silver nanoprisms via a light-induced transformation reaction and silver nanoprism-impregnated bacteria cellulose films for use as antibacterial wound dressings, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54 (2019), 101305.
- [48] W. Zhang, G. Hu, W. Zhang, Y. Zhang, J. He, Y. Yuan, L. Zhang, J. Fei, A facile strategy for the synthesis of silver nanostructures with different morphologies, *Mater. Chem. Phys.* 235 (2019), 121629.
- [49] J. Ciesla, M. Chylińska, A. Zdunek, M. Szymańska-Chargot, Effect of different conditions of synthesis on properties of silver nanoparticles stabilized by nanocellulose from carrot pomace, *Carbohydr. Polym.* 245 (2020), 116513.
- [50] D. Karthiga, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, Comparative studies on interaction of inorganic mercury with silver nanorods and nanotriangles, *J. Mol. Liq.* 242 (2017) 987–992.
- [51] E.K. Kambale, C.I. Nkanga, B.-P.I. Mutionkole, A.M. Bapolisi, D.O. Tassa, J.-M. I. Liesse, R.W. Krause, P.B. Memvanga, Green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using aqueous leaf extracts from three Congolese plant species (*Brilliantaisia patula*, *Crossopteryx febrifuga* and *Senna siamea*), *Heliyon* 6 (8) (2020), e04493.
- [52] M.S. Hasnain, M.N. Javed, M.S. Alam, P. Rishishwar, S. Rishishwar, S. Ali, A. K. Nayak, S. Beg, Purple heart plant leaves extract-mediated silver nanoparticle synthesis: optimization by Box-Behnken design, *Mater. Sci. Eng.: C* 99 (2019) 1105–1114.
- [53] F. Jalilian, A. Chahardoli, K. Sadrajavadi, A. Fattahi, Y. Shokoohinia, Green synthesized silver nanoparticle from *Allium ampeloprasum* aqueous extract: Characterization, antioxidant activities, antibacterial and cytotoxicity effects, *Adv. Powder Technol.* 31 (3) (2020) 1323–1332.
- [54] S. Khorrami, A. Zarepour, A. Zarrabi, Green synthesis of silver nanoparticles at low temperature in a fast pace with unique DPPH radical scavenging and selective cytotoxicity against MCF-7 and BT-20 tumor cell lines, *Biotechnol. Rep.* 24 (2019), e00393.
- [55] J. Miyazaki, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Cytotoxicity and behavior of polystyrene latex nanoparticles to budding yeast, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 469 (Supplement C) (2015) 287–293.
- [56] H. Feldmann, *Yeast: Molecular and Cell Biology*, John Wiley & Sons, 2011.
- [57] N.R. Chowdhury, M. MacGregor-Ramiata, P. Zilm, P. Majewski, K. Vasilev, 'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity, *J. Colloid Interface Sci.* 482 (2016) 151–158.
- [58] M. Majeed, K.R. Hakeem, R.U. Rehman, Synergistic effect of plant extract coupled silver nanoparticles in various therapeutic applications-present insights and bottlenecks, *Chemosphere* 288 (2022), 132527.
- [59] M. Hemagiri, S. Sasidharan, In vitro antiaging activity of polyphenol rich *Polyalthia longifolia* (Annonaceae) leaf extract in *Saccharomyces cerevisiae* BY611 yeast cells, *J. Ethnopharmacol.* (2022), 115110.
- [60] A. Mackevica, M.E. Olsson, S.F. Hansen, The release of silver nanoparticles from commercial toothbrushes, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 270–275.
- [61] S. Mohan, J. Princz, B. Ormeci, M.C. DeRosa, Morphological transformation of silver nanoparticles from commercial products: modeling from product incorporation, Weathering through Use Scenarios, and Leaching into Wastewater, *Nanomaterials* 9 (9) (2019) 1258.
- [62] I. Spiridon, S. Colceru, N. Anghel, C.A. Teaca, R. Bodirlau, A. Armatu, Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania, *Nat. Prod. Res.* 25 (17) (2011) 1657–1661.
- [63] S.S. Denner, *Lavandula angustifolia miller*: english lavender, *Holist. Nurs. Pract.* 23 (1) (2009) 57–64.
- [64] R. Prusinowska, K.B. Śmigielski, Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review, *Herba Pol.* 60 (2) (2014) 56–66.
- [65] J. Ahamad, K. Jawad Hamad, S. Jihad Ahmed Al-Shaheen, R. A Kaskoos, Jameel, S. R. Mir, Essential oil composition and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* from Iraq, 2013.
- [66] M.T. Lis-Balchin, 17 - Lavender A2, in: K.V. Peter (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*, Second ed., Woodhead Publishing, 2012, pp. 329–347.
- [67] L. Lesage-Meessen, M. Bou, J.-C. Sigoillot, C.B. Faulds, A. Lomascolo, Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (8) (2015) 3375–3385.
- [68] A. Ciobanu, I. Mallard, D. Landy, G. Brabie, D. Nistor, S. Fourmentin, Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil, *Carbohydr. Polym.* 87 (3) (2012) 1963–1970.
- [69] M. Villalpando, A. Saavedra-Molina, G. Rosas, A facile synthesis of silver nanowires and their evaluation in the mitochondrial membrane potential, *Mater. Sci. Eng.: C* (2020), 110973.
- [70] M. Blunder, A. Orthaber, R. Bauer, F. Bucar, O. Kunert, Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments, *Food Chem.* 218 (2017) 600–609.
- [71] T. Fossen, O. Andersen, O. Anderson, K. Markham, *Em Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications: Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids*, Anderson, OM, 2006.
- [72] J. Zhao, F. Xu, H. Huang, T. Ji, C. Li, W. Tan, Y. Chen, L. Ma, Evaluation on bioactivities of total flavonoids from *Lavandula angustifolia*, *Pak. J. Pharm. Sci.* 28 (4) (2015).
- [73] M. Adaszyńska-Skwrzyńska, M. Dzięciel, Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland, *Nat. Prod. Res.* 31 (21) (2017) 2575–2580.
- [74] M.R. Bindhu, M. Umadevi, G.A. Esmail, N.A. Al-Dhabi, M.V. Arasu, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Moringa oleifera* flower and assessment of antimicrobial and sensing properties, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 205 (2020), 111836.
- [75] M.A. Odeniyi, V.C. Okumah, B.C. Adebayo-Tayo, O.A. Odeniyi, Green synthesis and cream formulations of silver nanoparticles of *Nauclea latifolia* (African peach) fruit extracts and evaluation of antimicrobial and antioxidant activities, *Sustain. Chem. Pharm.* 15 (2020), 100197.
- [76] R.N. Oliveira, M.C. Mancini, F.C.Sd Oliveira, T.M. Passos, B. Quilty, R.M.d.S.M. Thiré, G.B. McGuinness, FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing, *Matéria* 21 (3) (2016) 767–779.
- [77] L. Briggs, L. Colebrook, Infra-red spectra of flavanones and flavones. Carbonyl and hydroxyl stretching and CH out-of-plane bending absorption, *Spectrochim. Acta* 18 (7) (1962) 939–957.
- [78] E. Kemsley, L. Zhuo, M. Hammouri, R. Wilson, Quantitative analysis of sugar solutions using infrared spectroscopy, *Food Chem.* 44 (4) (1992) 299–304.
- [79] N.E.A. Ikeda, E.M. Novak, D.A. Maria, A.S. Velosa, R.M.S. Pereira, Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc (II) flavonoid-metal complex, *Chem.-Biol. Interact.* 239 (2015) 184–191.
- [80] A.-C. Munteanu, M. Badea, R. Olar, L. Silvestro, C. Dulea, C.-D. Negut, V. Uivarosi, Synthesis and structural investigation of new bio-relevant complexes of lanthanides with 5-hydroxyflavone: DNA binding and protein interaction studies, *Molecules* 21 (12) (2016) 1737.
- [81] R. Pereira, N.E. Andrades, N. Paulino, A.C. Sawaya, M.N. Eberlin, M.C. Marcucci, G.M. Favero, E.M. Novak, S.P. Bydlowski, Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity, *Molecules* 12 (7) (2007) 1352–1366.
- [82] L.O. Santos, P.G.P. Silva, W.J.F. Lemos Junior, V.S. de Oliveira, A. Anschau, Glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2022) 1–16.
- [83] J.A. Mejía-Barajas, R. Montoya-Pérez, R. Salgado-Garciglia, L. Aguilera-Aguirre, C. Cortés-Rojo, R. Mejía-Zepeda, M. Arellano-Plaza, A. Saavedra-Molina, Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast, *Braz. J. Microbiol.* 48 (2017) 326–332.
- [84] M. Arellano-Plaza, A. Gschaedler-Mathis, R. Noriega-Cisneros, M. Clemente-Guerrero, S. Manzo-Ávalos, J.C. González-Hernández, A. Saavedra-Molina, Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcalt process during oxidative stress, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (7) (2013) 1279–1287.

Effect of Magnetic Stirring on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Lavandula angustifolia* Plant Extract

M. Villalpando^{1*} and G. Rosas¹

¹. Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, Departamento de Metalurgia física, UMSNH, Morelia, México.

* Corresponding author: mvillalpando@umich.mx

Currently, the synthesis of silver nanostructures, especially nanoparticles (NPs) has increased considerably due to their high demand in various consumer products such as textiles, medical products, paints, cosmetics, packaging of food, among others [1]. For this reason, green synthesis is considered a viable alternative because it reduces the use and generation of toxic reagents for the environment and human health [2]. However, controlling the polydispersity of NPs is a significant challenge that can be improved with variations in the experimental parameters [3]. Thus, the present work evaluates the effect of the magnetic stirring on the formation of silver nanoparticles (AgNPs) using a green approach by the use of *Lavandula angustifolia* plant extract as a reducing and stabilizing agent.

Lavandula angustifolia was mechanically triturated in a ball mill to obtain fine powders. The infusion was done mixing 2 g in 100 ml of deionized water (0.02 g/ml). The solution was heating at 60 °C for 20 min and finally was filtered. Also, silver nitrate salt precursor (AgNO₃) was dissolved in deionized water (10 mM). The synthesis reaction consisted of mix plant extract and AgNO₃ solution at room temperature with a volumetric relation 1:1 varying magnetic stirring (0, 200 and 600 rpm) for 24 h. The first indication of silver nanostructures formation was a color change in the solution from yellow to dark brown, black and gray as the stirring magnetic increase (inset Fig. 1). The color change is due to the surface plasmon resonance (SPR) found in the AgNPs. Subsequently, AgNPs were characterized by UV-Vis spectroscopy (Ocean Optics USB-4000). Scanning Electron Microscopy was carried out in a Jeol JSM-7600F microscope. X-ray diffraction in a D8 Advance DAVINCI lynx eye. Finally, Transmission electron microscopy was performed in a Philips Tecnai F20. Fig 1 shows the UV-Vis spectra that confirms the green synthesis reaction. It is observable three spectrums with a characteristic wavelength between 400-550 nm that it is associated with AgNPs formation. Also, it is appreciated two SPR peaks related to a second size distribution that disappears with an increase in the stirring. For the solution evaluated at 600 rpm the width of the band was greater in comparison with the others, attributed to the formation of larger silver nanostructures. SEM analysis is shown in Fig. 2 demonstrates the presence of silver nanostructures in the reaction medium. Fig. 2a corresponding to the sample without magnetic agitation reaffirms the synthesis of AgNPs. In this case, is observed the aggregation of NPs in small zones forming islands. Otherwise, the sample with slow agitation (200 rpm) presented in Fig.2b illustrates the separation of the islands improving the distribution. In the case of Fig. 2c it was identified that increasing the magnetic stirring to 600 rpm, the number of collisions between nanoparticles increased causing their coalescence, for this reason, the surfactants presented a rearrangement of the initial stabilization that it was reflected in the formation of 1D silver nanostructures as rods. Also, the EDS analysis confirms the presence of reduced silver (Fig 2d). Finally, Fig. 3 display the study of structure, morphology, and size of the better sample (200 rpm) by TEM and XRD. Figure 3a shows that AgNPs obtained are below 100 nm with an average size of 20 nm and two morphologies: spherical and triangular. Fig 3b shows a high-resolution image (HR-TEM), and its corresponding FFT pattern reveals the crystalline nature of AgNPs. The lattice fringes correspond to 0.24 nm distance that belongs to (111)

crystallographic planes of silver. Fig 3c shows the XRD pattern illustrating the diffraction peaks indexed by (111), (200), (220), (311), and (222) according to the standard diffraction data of silver (No. JCPDS 04-0850) with a lattice parameter of 0.408 nm. In summary, it was evaluated the effect of magnetic stirring in the green synthesis of AgNPs using an aqueous extract of *Lavandula angustifolia*. The velocity of 200 rpm reflected control in a dispersion of them with an average size of 20 nm with spherical and triangular morphologies. TEM and XRD corroborate the crystalline structure of nanosolids synthesized.

References

[1] E McGillicuddy et al., *Science of The Total Environment* **575** (2017), p. 231.

[2] N Noah. Chapter 6 - Green synthesis: Characterization and application of silver and gold nanoparticles. (2019). Elsevier.

[3] TA Jorge de Souza, LR Rosa Souza and LP Franchi, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **171** (2019), p. 691.

[4] The authors acknowledge funding from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT), México.

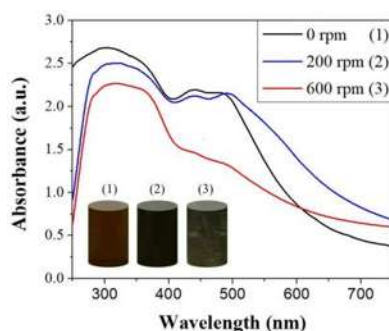


Fig. 1 UV-Vis spectra of AgNPs synthesized with different magnetic stirring.

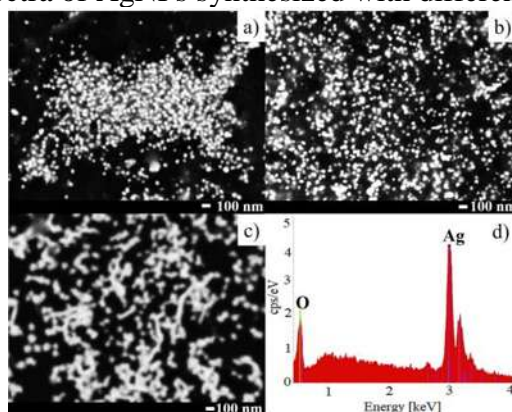


Fig.2 SEM micrographs of silver nanostructures; a) 0 rpm, b) 200 rpm, c) 600 rpm and d) EDS analysis.

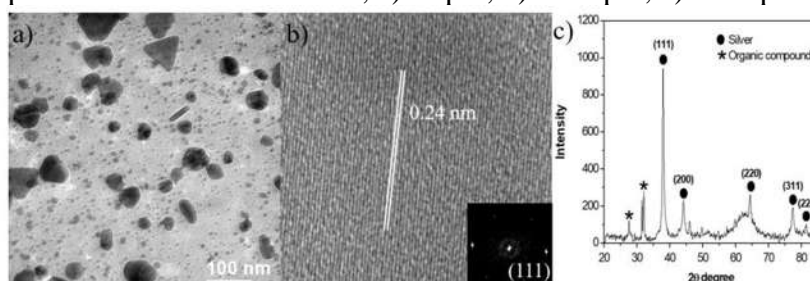


Fig.3 AgNPs synthesized at 200 rpm, a) Bright-field image, b) high-resolution image indicating their crystalline nature and c) XRD pattern.



**LA COORDINACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE IDIOMAS
DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

Certifica que

Mario Alejandro Villalpando Nieves

Obtuvo

Nivel B2.1, equivalente a 550 puntos TOEFL ITP

**MEI. Mauricio Montes Cortés
Coordinador del Depto. de
Idiomas**

Fecha de examen: **31 de julio de 2021**
Lugar de aplicación: **MORELIA, MICHOACÁN**
Número de candidato: **205**

Este nivel refiere al Marco Común Europeo de Referencia para las lenguas

Fecha de expedición: **02 de agosto de 2021**

No. FOLIO 0070



TABLA DE CORRELACIÓN DE PUNTOS TOEFL-ITP

El propósito de la presente tabla es identificar los puntajes mínimos en el examen TOEFL-ITP y su correspondiente correlación con los niveles de Marco Común Europeo de Referencia para las lenguas (A2, B1, B2, C1). La siguiente tabla presenta el puntaje mínimo para cada nivel, sin embargo, la Coordinación del Departamento de Idiomas no recomienda el uso rígido de dicha escala.

NIVELES MARCO COMÚN EUROPEO DE REFERENCIA PARA LAS LENGUAS

PUNTAJE TOEFL-ITP

<i>C1</i>	600
<i>B2</i>	550
<i>B1</i>	450
<i>A2</i>	337