

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGIA AVANZADA**

AREA ALIMENTOS

**Síntesis y caracterización de nanopartículas de
plata: Efecto sobre
*Colletotrichum gloesporioides***

T E S I S

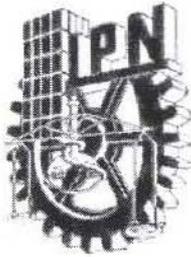
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN TECNOLOGIA AVANZADA**

PRESENTA:

M. T. A. MIGUEL ANGEL AGUILAR MENDEZ



MEXICO, D. F. JUNIO DE 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

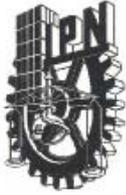
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México D. F.** el día 24 de Junio del año **2009** el que suscribe Miguel Angel Aguilar Méndez alumno del programa de **Doctorado en Tecnología Avanzada** con número de registro **A090594** adscrito a **C.I.C.A.T.A-IPN** manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del **Dr. Eduardo San Martín Martínez** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides***” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legarí 649, Col. Irrigación, 11500 D.F. México. Teléfono 015557296300 ext 67769 Fax e-mail: maguilarme@ipn.mx, esanmartin@ipn.mx.** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Miguel Ángel Aguilar Méndez

Nombre y Firma



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 24 del mes de junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA - Legaria para examinar la tesis titulada:

“Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*”.

Presentada por el alumno:

<u> Aguilar </u>	<u> Méndez </u>	<u> Miguel Angel </u>
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre(s)</small>

Con registro:

A	0	9	0	5	9	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

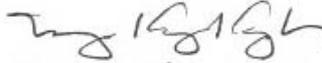
Doctorado en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis


Dra. Ruth Pedroza Islas


Dra. Patricia Rodríguez Fragosó


Dr. Geonel Rodríguez Gattorno

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. José Antonio Iran Díaz Góngora
CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DEL IPN

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos que, de alguna u otra manera, contribuyeron en la realización del presente trabajo:

Al Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora, por todo el apoyo brindado para con mi persona.

Al director de este trabajo, el Dr. Eduardo San Martín Martínez, por sus consejos y enseñanzas, por su confianza y amistad.

A los Doctores: Patricia Rodríguez Fragoso, José Luis Fernández Muñoz, Geonel Rodríguez Gattorno y Miguel Angel Aguilar Frutis, por sus valiosas aportaciones y sugerencias para el mejoramiento del presente trabajo.

Al Dr. José Guzmán, por sus consejos y apoyo en el Microscopio Electrónico de Barrido.

A la Dra. Ruth Pedroza Islas, por ser una gran persona, por sus consejos, enseñanzas y amistad.

A la Maestra María Esther Sánchez Espíndola ya que gracias a su colaboración se pudieron realizar los análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al personal del laboratorio de Pruebas Físicas: Miguel López, Juana Jaimes e Isabel Contreras, por su apoyo y amistad.

A la Doctora Cristina Garibay por su ser un ejemplo de fortaleza, sencillez, honestidad y sobretodo amistad.

Muy especialmente a mis compañeros del laboratorio: Lesli, Geo, María Eugenia, Elba, Mina, Horacio, Mati y Julia, por su compañía, apoyo y amistad.

Al personal del PTA, en especial a Lety Cardona, por toda la ayuda y apoyo brindados durante mis estudios de doctorado.

Al personal de CICATA-IPN.

A todos muchas GRACIAS.

DEDICATORIA

*Con especial cariño y gratitud a las personas que me dieron la
vida,*

Mis padres:

Cristina Méndez Hidalgo y Roberto Aguilar Beltrán

A Karina Salmerón, por su amor, apoyo y compañía

*A mis hermanos: Ricardo, Oscar, Velia, Daniel y Roberto, por ser
parte importante en mi vida*

A mis sobrinos

A toda mi familia...

A la memoria de mi gran amigo

ORLANDO BELTRAN

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
CONTENIDO	7
INDICE DE FIGURAS	10
INDICE DE TABLAS	12
RESUMEN	13
SUMMARY	15
1. INTRODUCCION	17
2. ANTECEDENTES	20
2.1. NANOPARTICULAS METALICAS	20
2.1.1. Métodos para la obtención de nanopartículas metálicas.....	20
2.1.1.1. Métodos químicos.....	20
2.1.1.2. Métodos físicos.....	22
2.1.1.3. Métodos biológicos.....	23
2.1.2. Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas.....	24
2.1.2.1. Espectroscopia UV-visible.....	24
2.1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	25
2.1.2.3. Espectroscopia Raman.....	26
2.1.2.4. Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier.....	27
2.1.3. Estabilidad de nanopartículas en sistemas coloidales.....	29
2.1.4. Factores que afectan el tamaño y la forma de nanopartículas metálicas.....	30
2.2. NANOPARTICULAS DE PLATA	32

2.2.1. Plata: efecto biocida.....	32
2.2.2. Toxicidad de la plata iónica, compuestos de plata y nanopartículas de plata.....	34
2.3. NANOEMPAQUES ALIMENTICIOS.....	36
2.4. PROBLEMÁTICA POSTCOSECHA EN FRUTOS TROPICALES...	37
2.4.1. Enfermedades postcosecha: antracnosis.....	38
3. JUSTIFICACION.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1. GENERAL.....	41
4.2. ESPECIFICOS.....	41
5. MATERIALES Y METODOS.....	42
5.1. MATERIALES.....	42
5.2. METODOS.....	42
5.2.1. Elaboración y caracterización de nanopartículas de plata....	42
5.2.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata.....	42
5.2.1.2. Evaluación de las propiedades ópticas (Espectroscopia UV-vis).....	43
5.2.1.3. Determinación del tamaño y morfología.....	43
5.2.1.4. Evaluación mediante espectroscopia Raman.....	43
5.2.1.5. Evaluación mediante espectroscopia de infrarrojo.....	43
5.2.2. Diseño Experimental.....	44
5.2.3. Análisis estadístico.....	45
5.2.4. Evaluación de la actividad antifúngica de nanopartículas de plata.....	46
5.2.4.1. Aislamiento de <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	46
5.2.4.2. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica.....	47
5.2.4.3. Recolección de esporas de <i>C. gloesporioides</i>	47
5.2.5. Evaluación in situ de la actividad antifúngica.....	48
5.3. EVALUACION DE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PAPAYA.....	48
5.3.1. Pérdida de peso.....	48

5.2.6. Firmeza de la pulpa.....	49
5.2.7. Sólidos solubles totales.....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	50
6.1. SINTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE PLATA.....	50
6.1.1. Formación de nanopartículas de plata.....	50
6.1.2. Espectroscopia UV-visible.....	50
6.1.3. Microscopía Electrónica de transmisión.....	54
6.1.4. Espectroscopia Raman.....	59
6.1.5. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).....	61
6.2. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	63
6.3. EVALUACIÓN IN SITU DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	66
6.3.1. Índice de severidad e incidencia.....	66
6.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PAPAYA.....	68
6.4.1. Pérdida de peso.....	68
6.4.2. Pérdida de firmeza.....	69
6.4.3. Sólidos solubles totales (°Brix).....	71
7. CONCLUSIONES.....	72
8. SUGERENCIAS.....	74
9. BIBLIOGRAFIA.....	75
ANEXOS.....	84

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Vibraciones de tensión: a) simétrica y b) asimétrica.....	28
Figura 2. Vibraciones de flexión: a) balanceo en el plano, b) tijereteo en el plano, c) aleteo fuera del plano y d) torsión fuera del plano.....	28
Figura 3. a) Antracnosis producida por <i>Colletotrichum gloesporioides</i> b) esporas de <i>C. gloesporioides</i>	39
Figura 4. Espectro típico de absorción UV-vis de un sistema coloidal de nanopartículas de plata.....	51
Figura 5. Estabilidad de nanopartículas de plata.....	52
Figura 6. Superficies de respuesta para la caracterización por UV-vis: a) 58°C, b) 92°C.....	53
Figura 7. Imágenes de MET de nanopartículas de plata.....	55
Figura 8. Patrón de difracción de electrones de nanopartículas de plata...	56
Figura 9. Superficies de respuesta para la caracterización por MET: a) 58°C, b) 92°C.....	58
Figura 10. Espectros Raman: a) AgNO ₃ , b) gelatina y c) nanopartículas de plata.....	60
Figura 11. Espectros FTIR de los precursores empleados (AgNO ₃ y gelatina) y de las nanopartículas de plata.....	62
Figura 12. Crecimiento de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> bajo diferentes	

concentraciones de nanopartículas de plata.....	64
Figura 13. Efecto de la adición de nanopartículas de plata en el crecimiento micelial de <i>C. gloesporioides</i>	65
Figura 14. Frutos de papaya con síntomas de antracnosis.....	67
Figura 15. Frutos de papaya con daño en el tejido superficial.....	67
Figura 16. Pérdida de peso de frutos de papaya en función del tiempo....	69
Figura 17. Firmeza de frutos de papaya al finalizar el tiempo de experimentación.....	70

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Regiones del espectro infrarrojo.....	27
Tabla 2. Variables independientes y sus niveles de variación.....	44
Tabla 3. Diseño experimental.....	45
Tabla 4. Porcentajes de inhibición de <i>C. gloesporioides</i>	65
Tabla 5. Efecto de las nanopartículas de plata en el índice de incidencia y severidad.....	67
Tabla 6. Contenido de SST en frutos de papaya.....	71

RESUMEN

En la presente investigación se sintetizaron nanopartículas de plata por reducción química y teniendo como variables de estudio las relaciones glucosa/Ag y gelatina/Ag, y la temperatura de síntesis. Los materiales obtenidos fueron caracterizados mediante Espectroscopia UV-vis, Espectroscopia Raman (FT-Raman), Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Además la información obtenida por Espectroscopia UV-vis y MET fue analizada mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), con la finalidad de observar la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de partícula. La actividad antifúngica de las nanopartículas de plata fue evaluada in vitro e in situ, empleando el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*, el cual es el hongo causante de la antracnosis en frutos como papaya. La incidencia de la enfermedad fue evaluada como índice de severidad e incidencia. La calidad postcosecha de los frutos fue también determinada a través de la pérdida de peso, firmeza y sólidos solubles totales (SST). Con los resultados de UV-vis se pudo confirmar la presencia de nanopartículas de plata al término de la reacción, y además se pudo deducir que la morfología de las nanopartículas de plata era de forma preferentemente esferoidal, y de tamaño relativamente pequeño (<20nm). La información anterior fue confirmada por MET, observando una distribución de tamaños entre 5-25nm. Además, empleando difracción de electrones, fue posible comprobar la naturaleza cristalina de las nanopartículas así como su estructura cúbica centrada en las caras (fcc). De acuerdo con las graficas de superficie de respuesta, las variables de síntesis que mayor influencia tuvieron sobre el tamaño de las nanopartículas fueron la concentración de gelatina y la temperatura. La gelatina actuó como un excelente pasivante de las nanopartículas de plata. La interacción de esta proteína con las partículas metálicas, se llevó a cabo a través de sus grupos amida (A, I, II y III). Las nanopartículas de plata presentaron una estabilidad en solución coloidal por más de tres meses. De acuerdo con las pruebas in vitro, las nanopartículas de plata tuvieron un efecto fungistático, logrando una inhibición del fitopatógeno de casi el 90% empleando una concentración de 16µL de solución coloidal/mL medio de cultivo. No se observaron diferencias en el porcentaje de inhibición por efecto de la variación del

tamaño de partícula. En general los frutos de papaya recubiertos con película de gelatina-almidón presentaron menor pérdida de peso, menor pérdida de firmeza y menor concentración de SST (°Brix), en comparación con los no recubiertos (control). Sin embargo, la incorporación de nanopartículas de plata al recubrimiento, provocó la aparición de bastas secciones oscuras sobre la superficie, afectando considerablemente la apariencia de los frutos de papaya. Con lo anterior se puede inferir que la nanopartícula de plata también reacciona con las células vegetales del tejido produciendo una alteración en el proceso fisiológico de transformación de la clorofila en otros compuestos y formando un parénquima rígido

SUMMARY

In the present work silver nanoparticles were synthesized by a chemical reduction method having as synthesis variables: glucose/Ag, gelatin/Ag and temperature of synthesis. The nanoparticles were characterized by means of UV-vis Spectroscopy, Raman Spectroscopy (FT-Raman), infrared Spectroscopy (FTIR) and Transmission Electron Microscopy (TEM). The data obtained by UV-vis Spectroscopy and MET were also analyzed using the Response Surface Methodology (RSM) in order to observe the influence of the synthesis variables in the size of the nanoparticles. The antifungal activity of silver nanoparticles was evaluated in vitro and in situ, using the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, which was previously isolated from papaya fruit with anthracnose symptoms. The incidence of the disease was evaluated as severity index and incidence. The postharvest quality of papaya fruits was also determined through weight loss, firmness and total soluble solids (TSS). The results of UV-vis confirmed the presence of silver nanoparticles at the end of the reaction time. The UV-vis spectra also indicated the formation of silver nanoparticles preferably spherical and of relatively small size (<20nm). The above-mentioned was confirmed by TEM, observing a size distribution of 5-25nm depending on the conditions of synthesis. The electron diffraction pattern corresponds to face centered cubic (fcc) structure of the Ag metallic. According to response surface graphs the gelatin concentration and temperature of synthesis were the most important factors influencing the size of the Ag particles. By means of FTIR it was determined that the gelatin, through their amide groups (A, I, II y III), interacts with the nanoparticles providing them a high stability in colloidal solution (3 months). In the in vitro evaluation of the antifungal activity only a fungistatic effect of silver nanoparticles was observed, obtaining a inhibition percentage of almost 90% with particle concentrations of 16 μ L colloidal solution/mL culture medium. Differences were not observed in the inhibition percentage by effect of the variation of the particle size. The papaya fruits covered with a gelatin-starch film showed lower loss weight, higher firmness and lower TSS contents as compared to the uncoated control. However, the fruits coated with gelatin-starch film plus silver nanoparticles,

presented dark sections onto the surface, affecting significantly the appearance of the papaya fruits.

1. INTRODUCCION

La nanotecnología involucra el diseño, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y tamaño a nivel nanométrico (IFST, 2006). En tiempos recientes esta tecnología ha experimentado gran importancia debido principalmente a sus aplicaciones potenciales en muchas áreas de la ciencia. La palabra “nano” es un término griego que se refiere a algo extremadamente pequeño, y en la actualidad este término es usado para indicar una billonésima parte de un metro (10^{-9}). Para que algo sea considerado como “nanopartícula”, los clusters de átomos que lo forman tienen que tener un tamaño de 1-100nm (Rai, et al., 2008).

Los nanomateriales pueden ser producidos de diferentes materiales y de formas diversas (esferas, tubos, alambres, entre otras). A su vez, pueden ser clasificados en base al tipo de material en: metálicos, semiconductores y poliméricos (Liu, 2006). Los metales a nivel nanométrico poseen propiedades ópticas, electrónicas, catalíticas, magnéticas, etc. que difieren significativamente de aquellas presentes a mayor escala (Luo et al., 2005; Sun y Luo, 2005; Wang et al., 2005). Dichas propiedades están fuertemente relacionadas con el tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de la partícula (Panigrahi, et al., 2006; Ullah, et al., 2006; Pal et al., 2007). Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas mediante una gran variedad de métodos, sin embargo la reducción química ha sido y es uno de los métodos más ampliamente utilizados.

Debido a su gran área superficial, varios metales a escala nanométrica presentan también propiedades biocidas (Rai et al., 2008), las cuales han impulsado el estudio de nanopartículas metálicas con la finalidad de utilizarlas como nuevos agentes antimicrobianos (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Entre los agentes antimicrobianos inorgánicos, la plata ha sido ampliamente utilizada desde tiempos remotos para combatir infecciones y controlar la contaminación microbiana (Pal et al. 2007). La plata en su estado metálico es inerte, pero ésta reacciona con el agua provocando su ionización de manera inmediata. En este estado la plata es altamente reactiva, y su efecto bactericida se debe principalmente a los cambios

estructurales que provoca en la membrana bacteriana y a su interacción con los grupos fosforilados y azufrados de varios compuestos (Rai et al., 2008). Aunque el mecanismo de acción de la plata en forma nanométrica no es bien conocido, se plantea que este puede ser similar al de la plata iónica.

Uno de los mayores logros de la nanotecnología ha sido la producción y aplicación de nanopartículas para el área biológica (Liu, 2006). En el sector alimentario, las aplicaciones de esta tecnología están enfocadas a áreas como el procesamiento de los alimentos, materiales de empaque y, seguridad y monitoreo (Chau et al., 2007; Sozer y Kokini, 2009). De acuerdo con la Comisión Europea de Nanotecnología (2006), en un futuro no lejano, la nanotecnología transformará por completo la industria alimentaria, cambiando los procesos de producción, procesamiento, empaque, transporte y consumo de los alimentos. Actualmente ya se emplea el término “nanofood”, el cual hace referencia a todo producto alimenticio en donde la nanotecnología ha intervenido en cualquiera de las etapas de su producción, procesamiento, transporte y almacenamiento (Chau et al., 2007).

El desarrollo de empaques antimicrobianos es de gran importancia debido al potencial para proveer calidad y seguridad alimentaria. El objetivo de la incorporación de antimicrobianos en los materiales de empaque es evitar el crecimiento de microorganismos en la superficie de los alimentos y por lo tanto mantener la calidad de los productos alimenticios por mucho más tiempo. Lo anterior puede reducir en gran medida la adición de grandes cantidades de químicos en el propio alimento (Sorrentino et al., 2007). Actualmente existe poca información sobre la incorporación de nanopartículas metálicas en películas o recubrimientos alimentarios y sus efectos en la vida de anaquel.

La mayoría de los frutos tropicales importantes son del tipo de los climatéricos, los cuales maduran rápidamente durante el transporte y almacenamiento, y su tasa de respiración alcanza un nivel máximo al comienzo de la fase respiratoria climatérica (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005). De acuerdo con la FAO (2005), las pérdidas postcosecha en frutos tropicales del mundo varían entre 10 y 80%, dependiendo del tipo de cultivo y región. Una de las principales causas de dichas

pérdidas es la invasión de elementos patógenos. El fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides* es un organismo económicamente importante, ya que es el causante de la enfermedad antracnosis (Zavala-León et al., 2005). En frutos como papaya y mango esta enfermedad provoca pérdidas postcosecha considerables (Gamagae et al., 2003; Kefialew y Ayalew, 2008).

En la presente investigación se sintetizaron nanopartículas de plata mediante un método de reducción química. Su caracterización se realizó mediante distintas técnicas espectroscópicas y por MET. Se utilizó también la MSR para observar la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de las partículas. Finalmente se evaluó, in vitro e in situ, la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata sobre el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*.

2. ANTECEDENTES

2.1. NANOPARTICULAS METALICAS

Debido a que poseen propiedades ópticas, catalíticas y electromagnéticas únicas, las nanopartículas metálicas han sido ampliamente estudiadas (Luo et al., 2005). Esas propiedades son producto en gran medida, de la gran área superficial que poseen. Metales como el oro, plata, paladio y cobre han sido empleados para fabricar nanopartículas de diversas formas y tamaños (Sárkány et al., 2005; Pal et al., 2007; Narayanan y Sakthivel, 2008). El procedimiento y las condiciones de síntesis de los nanomateriales influyen directamente en su forma y tamaño. A continuación se describen algunos métodos de síntesis y algunas de las principales técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas.

2.1.1. Métodos para la obtención de nanopartículas metálicas

Una gran variedad de métodos han sido desarrollados para sintetizar nanopartículas metálicas de distintas morfologías: nanotubos, nanodiscos, nanofibras y otras (Yan et al, 2003). De manera general, estos procedimientos se pueden clasificar en tres grupos: métodos químicos, métodos físicos y métodos biológicos.

2.1.1.1. Métodos químicos

Los métodos químicos son probablemente los métodos de síntesis de nanopartículas más utilizados debido a su potencial para ser escalados (Poole y Owens, 2003). La reducción química de sales metálicas en solución, destaca como el método químico más empleado. De acuerdo con Slistan-Grijalva et al (2008), la reducción química permite controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas.

En sistemas acuosos, el agente reductor es adicionado o generado in situ, mientras que en sistemas no-acuosos, el solvente puede actuar también como

agente reductor (Bradley y Schmid, 2004). Entre los agentes reductores más utilizados se encuentran el borohidruro de sodio, hidrazina y dimetilformamida, sin embargo, en los últimos años se han empleado sustancias no-tóxicas e igualmente efectivas, tales como el citrato de sodio y la glucosa (Raveendran et al., 2006; Pal et al., 2007). En sistemas no acuosos, alcoholes como el polietilenglicol, glicerol y etilenglicol han sido utilizados en la fabricación de nanopartículas coloidales (Luo et al., 2005). La ventaja de estos sistemas es que no se requiere la adición de agentes reductores, aún sintetizando a temperatura ambiente (Slistan-Grijalva et al., 2008).

Otros métodos químicos que han aparecido recientemente son la reducción radiolítica y fotoquímica. La radiólisis involucra la exposición de muestras acuosas a rayos gamma de alta energía, lo que resulta en la formación de electrones solvatados, radicales OH y átomos de H. Los radicales OH (altamente oxidantes) pueden ser convertidos en radicales reductores mediante la adición de 2-propanol a la solución (Sárkány et al., 2005). Una de las ventajas de la síntesis de nanopartículas coloidales por métodos radiolíticos es la producción homogénea e instantánea de un gran número de núcleos metálicos, lo que favorece la formación de partículas altamente dispersas (Bradley y Schmid, 2004).

La reducción fotoquímica o fotólisis es también una técnica relativamente simple, efectiva y limpia para la generación de partículas metálicas coloidales (Bradley y Schmid, 2004; Ozkaraoglu et al., 2009). En soluciones acuosas, el empleo de radiación UV induce la fotooxidación del agua por la excitación de los iones metálicos presentes, resultando en la formación de átomos metálicos y finalmente en la generación de nanopartículas coloidales. Kéki et al. (2000) obtuvieron nanopartículas de plata de tamaño pequeño (7nm) empleando la reducción fotoquímica. Por su parte Bakar et al. (2007), observaron una disminución del tamaño promedio de nanopartículas de plata al incrementar el tiempo de exposición a la radiación UV.

2.1.1.2. Métodos físicos

Entre los métodos físicos se encuentran los métodos electroquímicos, ablación láser, termólisis, irradiación con microondas y la síntesis sonoquímica (Starowicz et al., 2006).

La síntesis de nanopartículas metálicas mediante termólisis involucra la descomposición de sólidos a altas temperaturas, teniendo como resultado cationes metálicos y aniones moleculares o compuestos orgánicos metálicos. Mediante este proceso es posible obtener partículas menores a 5nm (Poole y Owens, 2003). De acuerdo con Kashiwagi et al. (2006), la termólisis presenta ventajas sobre otros métodos, ya que es una técnica que se puede adaptar a gran escala y a un bajo costo.

Un método físico novedoso que permite seleccionar y controlar el tamaño de nanopartículas en sistemas coloidales es la ablación láser (Tsuji, et al., 2003). La síntesis mediante este sistema ocurre cuando un láser de alta potencia es dirigido a un blanco sólido (en forma de disco), que se encuentra sumergido en un líquido junto con los precursores. La incidencia del láser provoca que el blanco se caliente en el punto focal y éste a su vez promueve la reacción entre los precursores, generando diminutas partículas. El tamaño de las nanopartículas es controlado por la energía del láser y la velocidad de rotación del disco. Mediante esta técnica se pueden producir de 2-3 g/min de nanopartículas de plata (Poole y Owens, 2003; Phuoc, et al., 2008).

El método sonoquímico ha sido propuesto como una vía útil para la preparación de materiales a escala nanométrica. El efecto químico de la radiación ultrasónica recae sobre el fenómeno de la cavitación, el cual crea “puntos calientes” en el micro ambiente, elevando la temperatura y presión de una manera importante (5000°K y 1800atm, respectivamente). Estas condiciones extremas pueden ser aprovechadas para la fabricación de materiales con estructuras y propiedades diferentes (Zhu et al., 2008).

En la síntesis electroquímica una hoja metálica es disuelta anódicamente en un solvente aprótico. De acuerdo con Rodríguez-Sánchez et al. (2000), este procedimiento permite obtener nanopartículas de alta pureza menores a 10nm, así como controlar su tamaño mediante el ajuste de la densidad de corriente.

La técnica de microondas resulta ser también un procedimiento ventajoso y atractivo para la preparación de nanopartículas, ya que el calentamiento homogéneo favorece la nucleación de las partículas metálicas y por lo tanto reduce en gran medida el tiempo de reacción. La irradiación con microondas conlleva a obtener nanoestructuras estables, de tamaño pequeño y distribución uniforme (Chen et al., 2008; Hu et al., 2009; Wu et al., 2009).

2.1.1.3. Métodos biológicos

La síntesis biológica ha surgido como una nueva opción para la obtención de materiales a escala nanométrica, debido principalmente a la creciente necesidad por utilizar métodos de síntesis más amigables con el medio ambiente. La biosíntesis involucra el empleo de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) o extractos de plantas para lograr la reducción de varios tipos de iones metálicos (Sastry et al., 2003).

Los organismos vivos pueden producir nanopartículas ya sea intra- o extracelularmente, siendo ésta última la técnica más utilizada por los investigadores debido a que es más adaptable y menos costosa (Basavaraja et al., 2008). Vigneshwaran et al. (2007) sintetizaron nanopartículas de plata de alrededor de 10nm, empleando el hongo *Aspergillus flavus*. Por su parte He et al. (2007), utilizaron la bacteria *Rhodopseudomonas capsulata* para producir nanopartículas de oro de diferentes formas y tamaños. Los tiempos de reacción empleando microorganismos son bastante largos, pudiendo variar desde 24 hasta 120 horas (Saifuddin et al., 2009).

En comparación con los microorganismos, el empleo de extractos de plantas como agentes reductores puede ser una vía más rápida para la preparación de nanopartículas. De acuerdo con Narayanan y Sakthivel (2008), es posible obtener

nanopartículas de oro en un tiempo de 12h, empleando extractos de hojas de cilantro.

A pesar de ser una técnica totalmente ecológica, la síntesis biológica presenta todavía desventajas importantes tales como largos tiempos de reacción y bajas escalas de producción (Saifuddin et al., 2009).

2.1.2. Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas

2.1.2.1. Espectroscopía UV-Vis

La absorción de radiación UV-visible provoca una excitación de los electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía en una molécula. La máxima absorción UV-visible ocurre en una longitud de onda característica de la estructura de la molécula (Moore, 2000).

La espectroscopía UV-vis es una técnica ampliamente utilizada en el área de los nanomateriales, ya que permite saber si el proceso de síntesis ha concluido con la formación de nanopartículas. Por ejemplo, la aparición de un pico de absorción alrededor de los 400nm es un indicativo de la presencia de nanopartículas de plata (Kapoor, 1998).

Los materiales a nivel nanométrico presentan propiedades ópticas que difieren grandemente de sus contrapartes en bulto (Zhao et al., 2006). Los espectros de absorción óptica de nanopartículas metálicas son dominados por resonancias de plasmón superficial (Pal et al., 2007). La posición y la forma del pico de absorción dependen principalmente de factores como el tamaño, la forma y la polidispersidad de las partículas, el medio circundante y las sustancias adsorbidas en sus superficies (Mitra y Bhaumik, 2007; Slistan-Grijalva et al., 2008).

El pico de absorción tiende a ubicarse hacia longitudes de onda mayores, a medida que el tamaño de la partícula aumenta. Por ejemplo, la emisión de un pico a 400nm corresponde a nanopartículas de plata de menos de 5nm de diámetro, mientras que si el pico de absorción se desplaza a 420nm, el tamaño de

predominante de las partículas es de alrededor de 20nm (An et al., 2008). Además la agregación de las nanopartículas provoca una disminución en la intensidad del pico, y la aparición de “hombros” en longitudes de onda mayores (Kapoor, 1998). Por otra parte, el número de picos de resonancia disminuye con el incremento de la simetría de la partícula (Elechiguerra et al., 2005). De acuerdo con la teoría de Mie, solo una banda simple de resonancia de plasmón superficial se presenta en espectros de absorción de nanopartículas esféricas, mientras que en partículas anisotrópicas se pueden presentar dos o más bandas, dependiendo de la forma de las partículas (Pal et al., 2007).

2.1.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Es la técnica más importante para caracterizar nanopartículas metálicas, ya que permite determinar el tamaño, forma, estructura interna y, a través de difracción de electrones, las especies químicas de las nanopartículas (Baker et al., 2004).

En un MET, un haz de electrones es dirigido hacia la superficie de una muestra. Los electrones penetran la muestra, son dispersados a medida que la atraviesan, son enfocados por la lente objetivo, son amplificados por la lente magnificadora y finalmente la imagen deseada es producida (Poole y Owens, 2003). Dos tipos de imagen pueden ser obtenidas: campo oscuro y campo claro. Las imágenes en campo claro son producidas por los electrones que se propagan a través de la muestra. Por otro lado en el campo oscuro la imagen es producto de los electrones difractados (Baker et al., 2004). En equipos de alta resolución se pueden obtener resoluciones de 0.1nm o menos. La imagen es formada de los electrones que se transmiten a través del material analizado. Los patrones de difracción de electrones permiten determinar las constantes de redes de las partículas lo que ayuda a la identificación de la especie. La preparación de las muestras para su observación en TEM, consiste en realizar una dispersión de las nanopartículas en un solvente y dejarlas secar sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono.

2.1.2.3. Espectroscopia Raman

La dispersión Raman involucra la excitación de una molécula con un fotón de luz el cual es posteriormente dispersado con un cambio en su energía, el cual se debe a que la longitud de onda de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas, difiere de la del haz incidente y además, que los desplazamientos de longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas responsables de la dispersión. Este fenómeno está relacionado con el mismo tipo de cambios vibracionales cuánticos que se producen en la absorción infrarroja (Skoog y Leary, 1994).

Aunque los mecanismos básicos dependen de los mismos modos vibracionales, corresponden a procesos muy diferentes. La absorción infrarroja requiere que un modo de vibración de la molécula experimente un cambio en el dipolo o la distribución de carga asociados y, solamente entonces, la radiación de la misma frecuencia puede interactuar con la molécula y promoverla a un estado vibracional excitado. Por lo contrario la dispersión implica una distorsión momentánea de los electrones distribuidos alrededor de un enlace de la molécula, seguida por la reemisión de la radiación cuando el enlace vuelve a su estado electrónico fundamental

Una ventaja importante de la espectroscopía Raman, con respecto a la de infrarrojo, es el hecho de que el agua no interfiere y por lo tanto es posible obtener espectros Raman de disoluciones acuosas (Skoog y Leary, 1994). Otro punto importante es que las muestras no necesitan ser ópticamente claras, y por lo tanto es posible obtener espectros Raman de muestras opacas (Ma y Phillips, 2002)

La intensidad de un pico Raman depende de la polarizabilidad de la molécula, de la intensidad de la fuente y de la concentración de grupos activos. Los grupos no polares como C=C, C-C y S-S aparecen con mayor intensidad en los espectros Raman (Ma y Phillips, 2002).

Una de las mayores limitaciones de la espectroscopía Raman convencional es la señal de fondo que proviene de la fluorescencia de la muestra o de las impurezas que contiene. La espectroscopia Raman de transformada de Fourier elimina la

fluorescencia de fondo y hace posible el uso de la fuente láser de Nd:YAG que emite radiación sólo en el infrarrojo cercano a 1064nm. Esta radiación no es suficientemente energética como para producir la excitación electrónica de las moléculas y de este modo se impide la fluorescencia.

2.1.2.4. Espectroscopía de Infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de la instrumentación, es conveniente dividir el espectro infrarrojo en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano (Skoog y Leary, 1994). La tabla 1 muestra los límites aproximados de cada una de ellas.

Tabla 1. Regiones del espectro infrarrojo

Región	Intervalo de longitud de onda (μm)	Intervalo de número de onda (cm^{-1})
Cercano	0.78 a 2.5	12800 a 4000
Medio	2.5 a 50	4000 a 200
Lejano	50 a 1000	200 a 10
La mas utilizada	2.5 a 15	4000 a 670

La FTIR utiliza la interacción de la radiación infrarroja con la materia para obtener información sobre la estructura molecular. Tanto la espectroscopía de infrarrojo como espectroscopía Raman están basadas en las transiciones vibracionales discretas que tienen lugar en el estado electrónico de las moléculas. Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de una multitud de tipos de vibraciones y rotaciones diferentes alrededor de los enlaces en la molécula. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión (figura 1) y de flexión (figura 2).

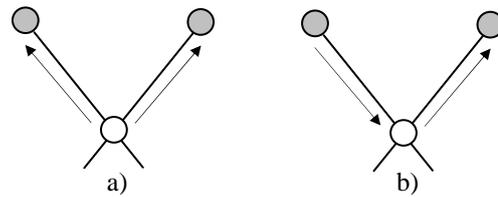


Figura 1. Vibraciones de tensión: a) simétrica y b) asimétrica

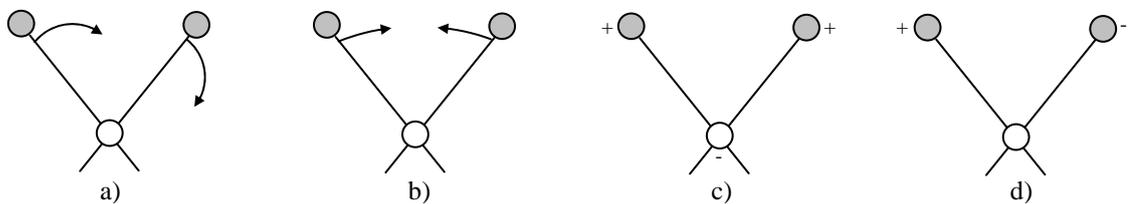


Figura 2. Vibraciones de flexión: a) balanceo en el plano, b) tijereteo en el plano, c) aleteo fuera del plano y d) torsión fuera del plano

El principal uso de la FTIR en la caracterización de nanopartículas metálicas es para detectar especies químicas enlazadas a la superficie y para monitorear reacciones también en la superficie (Baker et al., 2004). Esta técnica es esencialmente sensible a la presencia de grupos polares tales como O-H, C=O, C-O y N-H (Ma y Phillips, 2002). Mediante FTIR, Slistan-Grijalva et al. (2008) determinaron que la interacción entre nanopartículas de plata y polivinilpirrolidona (PVP) se lleva a cabo a través del oxígeno del grupo carbonilo del PVP. Por su parte Bakar et al. (2007), emplearon la técnica de FTIR para estudiar reacciones de oxidación sobre la superficie de nanopartículas de plata.

2.1.3. Estabilidad de nanopartículas en sistemas coloidales

En solución coloidal, las partículas metálicas tienden a aglomerarse debido a las fuerzas de van der Waals y a la ausencia de fuerzas repulsivas (Bradley and Schmid, 2004). En nanopartículas de plata, la oxidación de sus superficies provoca también inestabilidad, lo que conlleva a la agregación (Panigrahi et al., 2006). Una de las estrategias es proteger las partículas coloidales con un agente pasivante, el cual puede asociarse con la superficie de las partículas para mantenerlas suspendidas, y por lo tanto prevenir su agregación (Sun y Luo, 2005). Además de funcionar como estabilizantes, los agentes protectores también influyen en la solubilidad, reactividad, el tamaño y la forma de las nanopartículas (Sarkar et al., 2005; Balan et al., 2007).

Entre los agentes protectores usados para estabilizar sistemas coloidales se encuentran los polielectrolitos (Sun y Luo, 2005). Estos compuestos son moléculas que presentan varias cargas eléctricas descompensadas, es decir, presentan simultáneamente ambos signos de carga: positivo y negativo. Estas cargas se encuentran fijadas en distintas posiciones moleculares, por lo que no pueden anularse mutuamente. Normalmente se trata de grandes moléculas orgánicas, de tipo polimérico como las proteínas. Partículas coloidales pueden ser estabilizadas electrostáticamente y estéricamente (Petica et al., 2008).

Entre las sustancias utilizadas para pasivar la superficie de nanopartículas se encuentran la polivinilpirrolidona (PVP), el quitosano, almidón, celulosa y gelatina (Bakar et al., 2007; An et al., 2008; Slistan-Grijalva et al., 2008). De acuerdo con Wang et al. (2005), la utilización de PVP mejora en gran medida la dispersabilidad de nanopartículas de plata. Sin embargo Petica et al. (2008), reportan que concentraciones de más de 6g/L de PVP promueven la aglomeración de las partículas debido a un incremento en la viscosidad del sistema.

La gelatina puede ser otra opción efectiva y viable para estabilizar sistemas coloidales de nanopartículas. De acuerdo con Kapoor (1998), es posible obtener nanopartículas de plata de forma esférica y de tamaño relativamente pequeño

(6-20nm), empleando gelatina como agente protector. Por su parte Wang et al. (2006), reportaron que la gelatina puede actuar como un excelente estabilizante en la fabricación de nanopartículas de titanio. Raevskaya et al. (2008), sintetizaron nanopartículas de selenio de 10-100nm embebidas en una matriz proteica (gelatina), observando además, una mejora en las propiedades de fotoluminiscencia de las nanopartículas, con la incorporación de dicha proteína.

Otro factor importante que influye en la estabilidad de materiales nanoestructurados, es el tipo de solvente empleado durante la síntesis. De acuerdo con Ullah et al. (2006), la estabilidad de nanopartículas de plata sintetizadas en glicerol, es mucho mayor que en etilenglicol o en agua, debido a su mayor viscosidad.

2.1.4. Factores que afectan el tamaño y la forma de nanopartículas metálicas

El tamaño, la distribución de tamaño y la forma de nanopartículas metálicas dependen de algunos parámetros importantes, tales como el método de síntesis, agente protector, tipo de solvente, concentración del precursor, pH y la temperatura de síntesis (Cho y So, 2006; Slistan-Grijalva et al., 2008).

Se ha reportado que a medida que aumenta su concentración, el diámetro promedio de nanopartículas de plata, y la distribución de tamaños se incrementa de igual manera (Akamatsu et al., 2000; Bakar et al., 2007; Chen et al., 2008).

De acuerdo con Sárkány et al. (2005), el tamaño de nanopartículas de Pd fue menor al emplear 2-propanol como solvente, en comparación con etanol y metanol

Shervani et al. (2007) reportaron que agentes reductores fuertes como el NaOH generan partículas con un mayor tamaño en comparación con agentes reductores suaves o moderados. Estos autores obtuvieron nanopartículas de plata con

diámetros promedio de 43 y 15nm, empleando NaOH y D-glucosa respectivamente.

De acuerdo con Sun y Luo 2005, al aumentar la relación molar pasivante/plata se puede conseguir una disminución del tamaño de partícula. Sin embargo Wang et al. (2005) no observaron cambios significativos en el tamaño de nanopartículas de plata al incrementar la concentración del pasivante. Por su parte, Petica et al. (2008) señalan que al aumentar la concentración del polímero más allá del valor óptimo, conlleva a un incremento de la viscosidad de la solución, obstaculizando la difusión y disminuyendo las repulsiones electrostáticas, por lo tanto promoviendo la aglomeración de las partículas.

La velocidad a la que se mezclan los reactivos también puede ser un factor que determina el tamaño de las partículas. Wang et al. (2005) observaron que al mezclar los reactivos a razón de 1 gota/seg se generaron nanopartículas de plata bien dispersas y de un tamaño de 20-80nm. Por lo contrario empleando velocidades de mezclado mayores o menores a 1 gota/seg, ellos obtuvieron partículas de un mayor tamaño.

El pH de la reacción es un factor importante en el ensamblaje de nanopartículas de plata (Panigrahi et al., 2006).

De acuerdo con Luo et al. (2005), la temperatura de síntesis juega un papel preponderante en la dimensión y morfología de las partículas. Estos autores reportaron que el diámetro promedio de nanopartículas de plata se incrementó de 10 a 20nm cuando la temperatura de síntesis aumentó de 80 a 100°C. De igual manera, la forma de las nanopartículas cambió de esférica a nanoprisma poligonal al incrementar la temperatura de síntesis a 120°C

2.2. NANOPARTICULAS DE PLATA

De entre los metales nobles, la plata ha sobresalido por sus propiedades únicas. Además de presentar propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas interesantes, las nanopartículas de plata poseen también propiedades biocidas o antimicrobianas (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Éstas últimas han encontrado aplicaciones diversas en áreas como la farmacología, medicina, industria alimentaria, purificación de agua, etc. (Petica et al., 2008).

2.2.1. Plata: efecto biocida

Entre los agentes antimicrobianos inorgánicos, la plata ha sido ampliamente usada desde tiempos remotos para combatir infecciones y controlar la contaminación microbiana (Pal et al. 2007). El efecto bactericida de los iones de plata en los microorganismos es bien conocido; sin embargo el mecanismo no es aún muy claro. Algunas propuestas han sido desarrolladas para explicar los efectos inhibitorios de iones plata y plata metálica en microorganismos (Cho et al., 2005). Se plantea que los iones plata interaccionan fuertemente con los grupos tiol de enzimas vitales, provocando su inactivación (Feng et al., 2000). Es posible también que el ADN de bacterias tratadas con nanopartículas pierda su capacidad de replica, esto por la afinidad de la plata a interaccionar con grupos fosforilados y azufrados (Pal et al., 2007). En otros estudios se ha reportado que los iones plata provocan cambios estructurales irreversibles en la membrana celular de las bacterias, afectando drásticamente sus funciones propias como permeabilidad y respiración (Cho et al., 2005; Morones et al. 2005).

Aunque se ha planteado que las nanopartículas de plata pueden actuar de una manera similar a la plata iónica, hay indicios de que el efecto biocida que producen cada uno de ellos es distinto. De acuerdo con Morones et al. (2005), los iones plata producen una región de bajo peso molecular en el centro de la bacteria. Este efecto se debe a que el microorganismo agrupa y protege su ADN como mecanismo de defensa contra compuestos tóxicos. Por otro lado, al utilizar nanopartículas de plata, no se observa dicha región en las células bacterianas. De

acuerdo con Rai et al. (2008), el efecto bactericida de las nanopartículas de plata puede ser favorecido por la liberación de iones una vez que éstas han ingresado al interior de las células.

Algunas características como el tamaño y la forma de las nanopartículas de plata influyen de manera importante en la eficacia bactericida. Se ha reportado que entre más pequeña es la partícula, mayor es la superficie de contacto, y por lo tanto mayor es el poder bactericida (Pal et al., 2007). Morones et al. (2005) señalan que partículas de un tamaño de 1-10nm presentan una mayor interacción con la membrana celular bacteriana. A su vez Rai et al. (2008) indican que nanopartículas de plata de forma triangular tienen un mayor efecto bactericida en comparación con aquellas de formas esférica y cilíndrica. Lo anterior puede encontrar explicación en que las nanopartículas triangulares presentan planos cristalinos preferentemente {111} (Chen y Carrol, 2002). Se ha demostrado que en este tipo de planos existe una mayor densidad atómica lo que favorece la reactividad (Pal et al., 2007).

De acuerdo con Sondi y Salopek-Sondi (2004), la inhibición bacteriana depende también de la concentración de nanopartículas de plata y de la cantidad de microorganismos presentes. Estos autores reportaron una inhibición del 70% en el crecimiento de la bacteria *E. Coli*, al aplicar $10\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de nanopartículas, mientras que al aplicar una concentración de $60\mu\text{g}/\text{cm}^3$ la inhibición fue del 100%. Por su parte Cho et al. (2005) reportaron una inhibición total de *S. aureus* y *E. Coli* al emplear 50 y 100 ppm de nanopartículas de plata (10nm) respectivamente.

El efecto de nanopartículas de plata sobre hongos ha sido poco estudiado. Petica et al. (2008) evaluaron la actividad antifúngica de nanopartículas de plata (10-30nm) sobre especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. En todos los casos estos autores reportaron una actividad fungistática ya que solamente se observó una disminución en el crecimiento micelial. Por su parte Kim et al. (2009) observaron que nanopartículas de plata pueden retrasar el crecimiento del hongo *Raffaelea* sp. (in vitro) y que además la velocidad de crecimiento se reduce al aumentar la concentración de las partículas.

Es indudable que el interés por seguir adquiriendo conocimiento acerca de las propiedades biocidas de los nanomateriales metálicos, se justifica por la aparición de nuevas y más agresivas enfermedades, así como por la resistencia a los antibióticos que presentan muchos microorganismos patógenos.

2.2.2. Toxicidad de la plata iónica, compuestos de plata y nanopartículas de plata

La plata en su estado metálico es inerte pero ésta reacciona con el agua provocando su ionización de manera inmediata. En forma iónica la plata es altamente reactiva (Rai et al., 2008).

El nitrato de plata (AgNO_3) al 0.5% es la solución a base de plata más usada para tratar tópicamente heridas por quemaduras, sin embargo en concentraciones por arriba del 1%, esta se vuelve tóxica para los tejidos. Pruebas in vitro con AgNO_3 han demostrado la presencia de daños en fibroblastos, hepatocitos y linfocitos (Atiyeh et al., 2007).

Otra sustancia a base de plata que también es utilizada en tratamientos tópicos es la sulfadiazina de plata (AgSD). Una de las ventajas de ésta sustancia es que sólo se aplica en forma de crema dos veces al día, mientras que empleando AgNO_3 son necesarias más de 12 aplicaciones diarias. Sin embargo algunos estudios han demostrado que la AgSD también es citotóxica. Se ha observado que tratamientos prolongados con AgSD pueden provocar argiria y leucopenia. La argiria es un desorden permanente causado por una deposición de plata en los micro-vasos sanguíneos de la piel. Por su parte la leucopenia es definida como una disminución en los niveles normales de leucocitos en el organismo.

Aunque existe muy poca información sobre la toxicidad de las nanopartículas en general, su tamaño pequeño y propiedades específicas hacen que puedan representar un riesgo serio para organismos mayores. Chau et al. (2007), señalan que nanomateriales de 50 y 70nm pueden penetrar en las células y pulmones

respectivamente, mientras que aquellas de 30nm pueden incluso llegar a la sangre y cerebro.

En lo que respecta a la plata, se ha reportado que el uso de agentes antimicrobianos a base de nano-plata, puede generar efectos citotóxicos en fibroblastos de ratas (Ziegler et al., 2006). Por su parte Hussain et al. (2005) reportaron que después de la exposición por 24 h a nanopartículas de plata, la función mitocondrial de células de hígado de rata, disminuyó significativamente empleando concentraciones de 5-50 μ g/mL. De igual manera observaron un agotamiento en los niveles de glutatión, una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial y un incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno. Morfológicamente las células presentaron tamaños anormales, encogimiento y formas irregulares.

Se ha observado que la toxicidad de los nanomateriales depende también de factores como el tamaño y la forma, concentración, composición química, propiedades superficiales y hasta en la manera en cómo se agregan (Ziegler et al., 2006; Chau et al., 2007; Choi et al., 2008). Hussain et al. (2005) observaron que al aplicar nanopartículas de plata con un tamaño promedio de 15 y 100nm, en células de hígado de rata, el efecto tóxico fue mayor al utilizar las de mayor tamaño.

A pesar de las controversias por los posibles daños que se puedan presentar por el uso de la plata en cualquiera de sus formas, este material se sigue utilizando ampliamente en la vida cotidiana del ser humano. Por tal motivo es necesario continuar con la investigación con la finalidad de discernir sobre los posibles efectos negativos al ser humano y al medio ambiente (Hussain et al., 2005).

2.3. “NANO-EMPAQUES” ALIMENTICIOS

El uso de cubiertas protectoras y empaques en la industria alimentaria es un asunto de gran importancia debido a su capacidad de incrementar la vida de anaquel de muchos productos alimenticios. Hoy en día, la gran mayoría de los materiales empleados para fabricar empaques son derivados del petróleo y por lo tanto son prácticamente no-degradables. Esto representa serios problemas de contaminación ambiental a nivel global. Con la finalidad de extender la vida de anaquel de los alimentos y al mismo tiempo reducir el uso de materiales plásticos sintéticos, la investigación en el área de materiales biodegradables se ha visto favorecida. El objetivo es que estos materiales actúen de la misma manera que los empaques convencionales, proveyendo protección y manteniendo las cualidades propias del alimento. Desafortunadamente el uso de materiales biodegradables en el área alimentaria se ha visto muy limitado ya que sus propiedades son todavía pobres si se comparan con aquellas de los plásticos sintéticos. La intervención de la nanotecnología en el área de los materiales biodegradables puede ser la solución para mejorar no sólo sus propiedades, sino también la relación costo/eficiencia. El uso de aditivos, ya sea orgánicos o inorgánicos, a escala nanométrica conlleva al desarrollo de polímeros nano-compuestos. La razón de incorporar nanopartículas inorgánicas es mejorar las propiedades fisicoquímicas del material, sin embargo los alcances están en función del tamaño, morfología y propiedades propias de los nanomateriales (Sorrentino et al., 2007).

El desarrollo de empaques antimicrobianos es de gran importancia debido al potencial para proveer calidad y seguridad. El objetivo de la incorporación de antimicrobianos en los materiales de empaque es evitar el crecimiento de microorganismos en la superficie de los alimentos y por lo tanto mantener la calidad de los productos alimenticios por mucho más tiempo. Lo anterior puede reducir en gran medida la adición de grandes cantidades de químicos en el propio alimento (Sorrentino et al., 2007).

En la actualidad existe poca información reportada sobre la incorporación de nanopartículas metálicas en empaques alimenticios y su efecto en la vida de

anaquel de los productos. A continuación se citan algunos trabajos que han sido desarrollados y reportados:

An et al. (2008) evaluaron el efecto de la aplicación de recubrimientos con nanopartículas de plata, en la vida postcosecha de espárragos. De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de dicha película redujo la pérdida de peso y mantuvo la firmeza; redujo la pérdida de ácido ascórbico y clorofila; retardó los cambios relacionados con el color de la piel y se logró inhibir el crecimiento de microorganismos en la superficie del alimento. La vida postcosecha de los vegetales aumentó 10 días más a temperatura de 2°C.

Por su parte Li et al. (2008), emplearon un material de empaque con incorporaciones de nanopartículas de plata, dióxido de titanio y kaolin, para la preservación de dátiles chinos. Además de presentar mejores propiedades de barrera y mecánicas, los materiales de empaque con nanomateriales mantuvieron la calidad de los frutos por más tiempo en comparación con el material de empaque normal.

2.4. PROBLEMATICA POSTCOSECHA EN FRUTOS TROPICALES

La mayoría de los frutos tropicales son del tipo de los climatéricos, los cuales maduran rápidamente durante el transporte y almacenamiento, y su tasa de respiración alcanza un nivel máximo al comienzo de la fase respiratoria climatérica (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005).

De acuerdo con la FAO (2005), las pérdidas postcosecha en frutos tropicales del mundo varían entre 10 y 80%, dependiendo del tipo de cultivo y región. Entre las principales causas se encuentran:

- Daños mecánicos causados por una mala manipulación a lo largo de la cadena del suministro.
- Pérdida de humedad por evaporación y transpiración.

- Envejecimiento prematuro y muerte del tejido por interrupción de la tasa metabólica en un almacenamiento a temperaturas no óptimas.
- Corta vida en almacén debido a la biosíntesis de etileno.
- Podredumbre a causa de la invasión de elementos patógenos.

Del total de los frutos y vegetales cosechados en el mundo, entre el 20-25% sufren deterioro debido a la invasión de patógenos durante el manejo poscosecha (Sharma et al, 2009).

2.4.1. Enfermedades poscosecha: antracnosis

Las enfermedades poscosecha causan considerables pérdidas en frutas y vegetales durante su transporte y almacenamiento (Sharma et al., 2009). Varias de esas enfermedades son producidas por hongos que no solo atacan al fruto, sino que también pueden afectar hojas, flores y tallos de plantas. Los hongos son pequeños organismos, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos, que carecen de clorofila y presentan además paredes celulares que contienen quitina, celulosa o ambos componentes. Estos organismos se reproducen principalmente mediante esporas (Agrios, 2005).

En frutos como papaya y mango, la antracnosis es una enfermedad comúnmente producida por *Colletotrichum gloeosporioides* (figura 3). Este hongo es capaz de penetrar la piel y mantenerse latente hasta la maduración del fruto. Los síntomas de la enfermedad llegan a ser evidentes solo durante el periodo poscosecha (Gamagae et al., 2003; Kefialew y Ayalew, 2008).

El combate de la antracnosis se realiza principalmente con la aplicación poscosecha de prochloraz y propiconazol o tratamientos con agua caliente en combinación con fungicidas. Sin embargo en frutos como papaya, el agua caliente afecta el proceso de maduración (Gamagae et al., 2003). Por otro lado, el uso indiscriminado de fungicidas puede provocar la aparición de cepas resistentes a ellos. Además los residuos tóxicos presentes en las frutas pueden representar un riesgo para la salud de los consumidores (Muñoz et al., 2009).

En México, *C. gloesporioides* representa un serio problema para los productores de papaya debido a las condiciones ambientales favorables y a la resistencia que desarrolla a los fungicidas sintéticos (Bautista-Baños et al., 2003).



Figura 3. a) Antracnosis producida por *Colletotrichum gloesporioides* b) esporas de *C. gloesporioides*

3. JUSTIFICACION

El interés por seguir adquiriendo conocimiento acerca de las propiedades biocidas de los nanomateriales metálicos, se justifica por la aparición de nuevas y más agresivas enfermedades, así como por la resistencia a los antibióticos que presentan muchos microorganismos patógenos.

Aunado a esto, hoy en día los materiales biodegradables están cobrando más fuerza debido a la crisis medioambiental en la cual nuestro planeta se encuentra inmerso. La incorporación de materiales nanoestructurados con actividad biocida, a materiales biodegradables, podría fortalecer más las propiedades de éstos, y por lo tanto fomentar aún más su uso. Todo esto con el objetivo de reducir la producción y consumo de plásticos sintéticos. Además con la utilización de materiales biodegradables antimicrobianos como empaques o recubrimientos alimentarios, se podría reducir en gran medida la incorporación directa de agentes químicos al producto.

Por lo mencionado anteriormente, se justifica el planteamiento y desarrollo del presente trabajo. Teniendo siempre presente todas las precauciones necesarias sobre los posibles riesgos en el ser humano.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

- Sintetizar nanopartículas de plata y determinar su actividad antifúngica.

4.2. ESPECIFICOS

- Elaborar nanopartículas de plata mediante reducción química.
- Evaluar las propiedades ópticas de las soluciones coloidales de nanopartículas.
- Realizar una caracterización morfológica y estructural de los nanomateriales obtenidos.
- Evaluar la actividad antifúngica de las nanopartículas, empleando el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides* (in vitro e in situ).
- Determinar la posible incorporación de nanopartículas de plata a películas biodegradables para el recubrimiento de frutos de papaya.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. MATERIALES

Las nanopartículas de plata fueron preparadas utilizando nitrato de plata (Sigma-Aldrich, USA) como precursor, glucosa (Mallinckrodt Baker, S. A. de C. V., México) como agente reductor y gelatina comercial (Gardhal, S. A., México) como agente pasivante o protector. En todos los experimentos se empleó agua desionizada ($18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$, Easypure, EU). Para el ajuste de pH se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) de la marca JTBaker (Mallinckrodt Baker, S. A. de C. V., México). Para las pruebas in vitro se empleó como medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) de la marca Bioxon (Becton Dickinson de México, S. A. de C. V., México). Los frutos de papaya, variedad Maradol, fueron adquiridos en la Central de Abastos de la Ciudad de México con un grado de madurez uniforme.

5.2. METODOS

5.2.1. Elaboración y caracterización de nanopartículas de plata

5.2.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata fueron elaboradas de acuerdo con la siguiente metodología: Una solución acuosa de gelatina-glucosa fue preparada de acuerdo a las concentraciones establecidas en el diseño de experimentos. Posteriormente el pH de la solución fue ajustado a 10, el cual fue constante para todos los ensayos. Empleando una parrilla de calentamiento (Barnsted-Thermolyne, USA) y bajo agitación constante, la solución fue sometida a un tratamiento térmico. Al alcanzar la temperatura adecuada, se procedió a agregar, gota a gota, 10 mL de una solución 0.1M de AgNO_3 . La solución final fue mantenida por 30 minutos más bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación.

5.2.1.2. Evaluación de las propiedades ópticas (Espectroscopia UV-vis)

Los espectros de absorción óptica de las soluciones coloidales de nanopartículas fueron obtenidos en un rango de longitud de onda de 300-800nm, empleando un espectrofotómetro Cary 50 (Varian, USA). Las soluciones coloidales fueron diluidas 1:5 con agua desionizada previo al análisis.

5.2.1.3. Determinación del tamaño y morfología

El tamaño y la morfología de las nanopartículas de plata fueron examinados empleando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL-JEM1010, Japón). Las muestras fueron preparadas colocando una gota de las soluciones coloidales de nanopartículas sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono de 200 mesh. Las imágenes se obtuvieron a distintas magnificaciones utilizando una potencia de 60kV. El tamaño promedio y la distribución de tamaño se obtuvo al analizar 150 partículas aprox. por cada experimento, empleando el software Photo Impact ()

5.2.1.4. Evaluación mediante Espectroscopia Raman

Mediante esta técnica se evaluó la posible interacción entre las nanopartículas de plata y el agente protector (gelatina). Un espectrofotómetro de Raman (Dilor-Jobin Yvon-Spex), con un láser de He-Ne con una longitud de onda de 632.8 nm. Las muestras coloidales fueron secadas y depositadas en porta objetos. El barrido se hizo desde 250 hasta 5000 cm^{-1} empleando un filtro con 0.2 de apertura el barrido.

5.2.1.5. Evaluación mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un equipo Spectrum One (Perkin Elmer, EUA). Previo al análisis, las nanopartículas de plata fueron separadas por centrifugación a 13,000 rpm (Centrífuga Sigma 2-16, Sigma Laborzentrifugen GMBH, Alemania) y secadas. Pequeñas cantidades de gelatina, AgNO_3 nanopartículas, fueron molidas y mezcladas con KBr para formar una

pastilla compacta y transparente. Los espectros de IR fueron registrados en un rango de frecuencia de 4000-400cm⁻¹.

5.2.2. Diseño experimental

Después de una serie de estudios preliminares, las variables independientes fueron definidas y sus niveles establecidos para la determinación de los niveles máximos y mínimos para cada variable (tabla 2). Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de plata se utilizó un diseño experimental central compuesto conformado de un factorial 2^K (donde K=3), una serie de corridas axiales y 5 puntos centrales, teniendo en total 20 experimentos (tabla 3). Las variables de estudio fueron las relaciones glucosa/plata, gelatina/plata y la temperatura de síntesis. Todos los experimentos se realizaron aleatoriamente

Tabla 2. Variables independientes y sus niveles de variación

Variables codificadas	-1.682	-1	0	1	1.682
X ₁	1.2	1.5	2.0	2.5	2.8
X ₂	0.7	1.0	1.5	2.0	2.3
X ₃	58	65	75	85	92

X₁: Glucosa/Ag
 X₂: Gelatina/Ag
 X₃: Temperatura (°C)

Tabla 3. Diseño experimental

Corrida	X₁	X₂	X₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	1.682	0	0
10	0	1.682	0
11	0	0	1.682
12	-1.682	0	0
13	0	-1.682	0
14	0	0	-1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

X₁: Glucosa/Ag
X₂: Gelatina/Ag
X₃: Temperatura (°C)

5.2.3. Análisis estadístico

Los datos de Espectroscopia UV-vis y MET fueron analizados a través de la metodología de superficie de respuesta (Design-Expert 5, Stat-Ease Inc., EUA), para obtener los modelos matemáticos que describen las interacciones entre las variables independientes y las variables de respuesta. La significancia de los modelos fue probada a través del análisis de varianza.

De acuerdo con la metodología de superficie de respuesta, los datos experimentales fueron utilizados para determinar los coeficientes β_i y β_{ij} de la ecuación de expansión de la serie de Taylor (polinomial cuadrática), cuya expresión general se establece en la ecuación (1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad \text{Ec. (1)}$$

Siendo Y la función respuesta genérica y X_1 , X_2 y X_3 las variables independientes. Los coeficientes β_i y β_{ij} fueron estimados por el método de mínimos cuadrados y ε es el residuo que mide el error experimental, representado por una distribución normal, con media cero y variación igual a σ^2 . La influencia de las variables fue observada a través de los gráficos de superficie de respuesta.

5.2.4. Evaluación de la actividad antifúngica de nanopartículas de plata

5.2.4.1. Aislamiento de *Colletotrichum gloesporioides*

El hongo fue aislado de frutos de papaya con síntomas de antracnósis. Primeramente se procedió a limpiar el tejido vegetal enfermo con un algodón embebido en alcohol, al 70%. Se realizaron pequeños cortes de la zona enferma, los cuales fueron esterilizados sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min. y lavados con agua destilada estéril. Mediante la técnica por picadura, el hongo fue sembrado en placas de petri con medio PDA. Las placas fueron incubadas a 25°C hasta observar el crecimiento micelial. Finalmente se realizaron resiembras utilizando el mismo medio hasta obtener un cultivo puro. La identificación del hongo se realizó en la Dirección General de Sanidad Vegetal (Senasica) por el Biol. David Bonilla López.

5.2.4.2. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica se utilizó la metodología propuesta por Guo et al. 2007. Se emplearon nanopartículas de 5, 13 y 24nm de diámetro promedio, a diferentes concentraciones. Las nanopartículas de plata fueron incorporadas al medio de cultivo (PDA) previo al vaciado en placas petri. Un disco de 5mm de agar+micelio fue tomado del cultivo puro y colocado en el centro de la placa con los distintos tratamientos de nanopartículas. Las placas fueron incubadas a 25°C y se realizaron mediciones del diámetro de la zona de crecimiento cada 24 horas, hasta que el micelio del hongo alcanzó los bordes de la placa control (sin nanopartículas). El índice antifúngico (IA) fue calculado mediante la ecuación 2.

$$IA = \left(1 - \frac{D_1}{D_2}\right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

D₁: diámetro del micelio en los tratamientos con nanopartículas

D₂: diámetro del micelio en el control

5.2.4.3. Recolección de esporas de *C. gloesporioides*.

Para las pruebas in situ de la actividad antifúngica, se utilizó una cepa de *C. gloesporioides* proporcionada por la Dra. Silvia Bautista Baños del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI-IPN). Previo al análisis, primeramente fue necesario preparar una solución de esporas con una concentración de 1x10⁶ esporas/mL. La obtención de las esporas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Bautista-Baños et al. (2003). El micelio y las esporas fueron recolectadas de las cajas petri empleando una varilla de vidrio y agua destilada. La mezcla resultante fue filtrada a través de una doble gasa estéril. El filtrado resultante fue ajustado a 25mL con agua destilada. El número de esporas/mL de solución fue determinado utilizando una cámara de Neubauer (Hauser Scientific, EUA).

5.2.5. Evaluación in situ de la actividad antifúngica

El efecto de las nanopartículas de plata (10nm) en el crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* fue evaluado mediante la siguiente metodología: Frutos de papaya fueron previamente lavados con una solución de hipoclorito de sodio (1%) y secados a temperatura ambiente. Los frutos fueron divididos en 5 grupos de 5 unidades y asperjados con una solución de esporas de *C. gloesporioides* (1×10^6 esporas/mL). Una vez que los frutos secaron, a 4 de los grupos se les aplicó una película de gelatina-almidón (Aguilar-Méndez et al., 2008) con distintas concentraciones de nanopartículas (0, 1, 2 y 4 μ L de solución de nanopartículas/mL de solución formadora de película). El tratamiento control permaneció sin recubrimiento. Los frutos fueron mantenidos a temperatura ambiente por 7 días. Al final del experimento, los síntomas de antracnosis fueron evaluados como incidencia y severidad de la enfermedad (Bautista-Baños et al., 2003). La incidencia fue determinada como el porcentaje de frutos dañados por cada tratamiento. Para determinar el índice de severidad se asignaron valores del 1-5, donde 1=0% de daño sobre la superficie de la fruta, 2=1-25%, 3=26-50%, 4=51-75% y 5=76-100%. Además se evaluó también la calidad de las frutas mediante pérdida de peso, sólidos solubles totales (SST) y firmeza.

5.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PAPAYA

5.3.1. Pérdida de peso

Se determinó por diferencia de peso en los diferentes periodos de evaluación. Los datos se expresaron en porcentaje, respecto al peso inicial. La Ec. (3) se utilizó para calcular la pérdida.

$$\text{Pérdida de peso} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

5.3.2. Firmeza de la pulpa

La firmeza de la pulpa de papaya se determinó siguiendo la metodología de Aguilar-Méndez et al. (2008), empleando un texturómetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK). La penetración de los frutos se realizó con una celda en forma de aguja (Fig. 6), de 2mm de diámetro. La distancia recorrida por la celda a través de la pulpa fue de 10mm, a una razón de 5mm/s. La fuerza máxima fue tomada como valor resultante.

5.3.3. Sólidos solubles totales (SST)

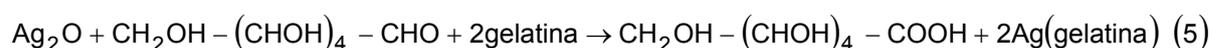
Los SST se evaluaron como °Brix empleando un refractómetro Master T (Atago Co., Japón). Una gota del jugo de la fruta fue colocada sobre el refractómetro y se tomó la lectura señalada. El análisis se realizó por triplicado.

6. RESULTADOS

6.1. SINTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE PLATA

6.1.1. Formación de nanopartículas de plata

Empleando los agentes precursores anteriormente listados y bajo condiciones alcalinas (pH 10), es posible que la formación de las nanopartículas de plata sigan el mecanismo planteado por las ecuaciones 4 y 5



La ecuación 4 plantea primeramente que los iones plata en solución acuosa, reaccionan con los grupos hidroxilo formando óxido de plata. Posteriormente el óxido de plata es reducido por la glucosa generando finalmente nanopartículas de plata (Wang et al., 2005). La función de la gelatina es formar una capa protectora sobre la superficie de las nanopartículas con la finalidad de prevenir su agregación y por lo tanto mantener su estabilidad en solución coloidal.

6.1.2. Espectroscopia de UV-visible

Cuando una molécula determinada absorbe radiación UV-visible, la energía absorbida excita electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía en la molécula. La máxima absorción UV-visible ocurre en una longitud de onda característica de la estructura molecular y se puede determinar a partir de una gráfica de intensidad de absorción (absorbancia) contra longitud de onda de la radiación absorbida (Moore et al., 2000).

La figura 4. muestra un espectro típico de absorción UV-vis obtenido para un sistema coloidal de nanopartículas de plata. Los espectros UV-vis analizados presentaron una sola banda simétrica de resonancia de plasmón superficial. La

máxima absorbancia UV-vis se ubicó en un rango de longitud de onda de 420-430nm en todos los experimentos. De acuerdo Zhang y Fang (2007) y Pal et al. (2007), la aparición de espectros de absorción simétricos con absorbancia máxima a 420nm es debido a la resonancia bipolar de partículas de plata esferoidales relativamente pequeñas. El color de las soluciones coloidales fue en todos los casos café oscuro. El color de los metales nobles en solución es el resultado de la reflexión y transmitancia de la luz incidente. Estas propiedades están en función de los cambios de la banda de plasmón superficial (Baker et al., 2004).

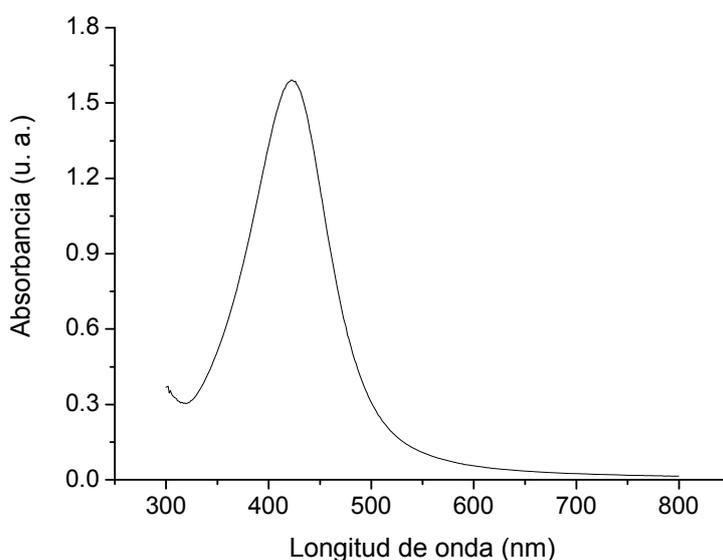


Figura 4. Espectro típico de absorción UV-vis de un sistema coloidal de nanopartículas de plata

Con la figura 5, se pretende mostrar la estabilidad de los sistemas coloidales de nanopartículas de plata obtenidas en esta investigación. Se puede observar que el espectro de absorción óptica, después de 3 meses, permanece prácticamente igual al espectro obtenido inmediatamente después de elaboradas las nanopartículas, lo que sugiere que no hubo un crecimiento importante en el tamaño de las partículas. Otro punto que cabe resaltar es que al intentar separar las nanopartículas del solvente, mediante centrifugación a alta velocidad (13,000rpm), las cantidades de precipitado fueron mínimas. Con lo señalado anteriormente, se puede decir que los nanomateriales sintetizados tienen una buena estabilidad debido posiblemente a su tamaño relativamente pequeño

(<25nm), su forma esferoidal (lo cual se confirmará por la técnica de MET) y a la eficacia de la gelatina como agente protector.

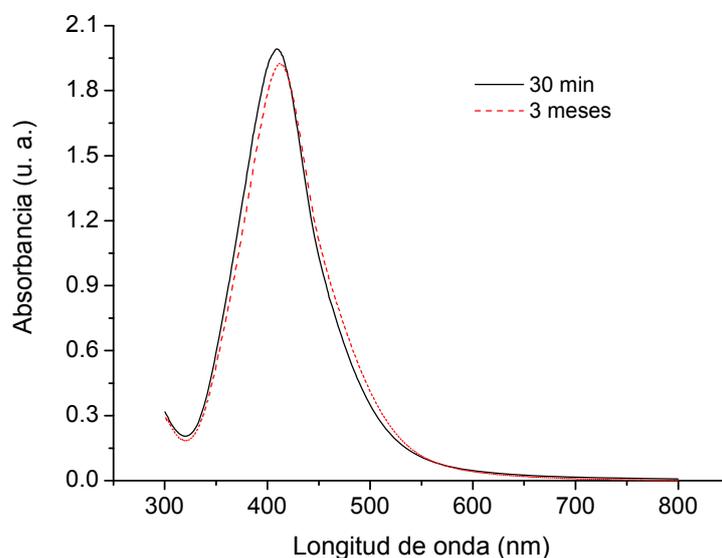


Figura 5. Estabilidad de nanopartículas de plata

Se ha reportado que las resonancias de plasmón superficial de nanopartículas metálicas se ubican a longitudes de onda mayores a medida que el tamaño de partícula aumenta (Mitra y Bhaumik, 2007). Por tal motivo se consideraron los valores de longitud de onda para las absorbancias máximas, con la finalidad de analizarlos mediante la MSR. De esta manera se pudo determinar la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de nanopartículas de plata (Figura 6). De acuerdo con la Figura 6a (58°C), los picos máximos de absorbancia se ubicarían en longitudes de onda mayores al emplear una relación Gel/Ag alta (2.34) y una relación Glu/Ag baja (1.2). Lo anterior se traduciría en nanopartículas de plata con un mayor tamaño. Por otro lado, se podrían obtener nanopartículas de un tamaño menor al utilizar una relación Gel/Ag baja (0.66) y una relación Glu/Ag alta (2.8), ya que bajo estas condiciones de síntesis las bandas espectrales se ubicarían en longitudes de onda menores. Al emplear una temperatura de síntesis de 92°C (Figura 6b), los efectos de las concentraciones del reductor y del agente pasivante, en las propiedades ópticas de los sistemas coloidales, fueron inversos a aquellos observados a una temperatura de síntesis de 58°C. Al observar la figura 2b, sería posible obtener valores de longitud de onda mayores al emplear

un baja relación Gel/Ag (0.66) y una alta relación Glu/Ag (2.8), es decir nanopartículas de mayor tamaño. Caso contrario si se emplean altas relaciones Gel/Ag (2.34) y bajas relaciones Glu/Ag (1.2), ya que bajo estas condiciones se obtendrían nanopartículas más pequeñas. Cabe mencionar que la temperatura de síntesis influyó de manera significativa en las propiedades ópticas. Se puede observar que al aumentar la temperatura, las bandas espectrales se ubicarían en longitudes de onda menores; por ende se podría asumir que las nanopartículas tendrían un menor tamaño al emplear temperaturas de proceso altas.

La ecuación 4 representa el modelo matemático para la absorbancia máxima. Este modelo muestra una $P < 0.0001$ y una $R^2 = 0.96$, lo que indica un buen ajuste a los datos experimentales.

$$\begin{aligned} \text{Longitud de onda} = & 497.02 - 27.85 * X_1 + 50.63 * X_2 - 1.89 * X_3 + 1.10 * X_1^2 + 3.22 * X_2^2 \\ & + 9.81 \times 10^{-3} * X_3^2 - 8.0 * X_1 X_2 + 0.45 * X_1 X_3 - 0.55 * X_2 X_3 \end{aligned} \quad (6)$$

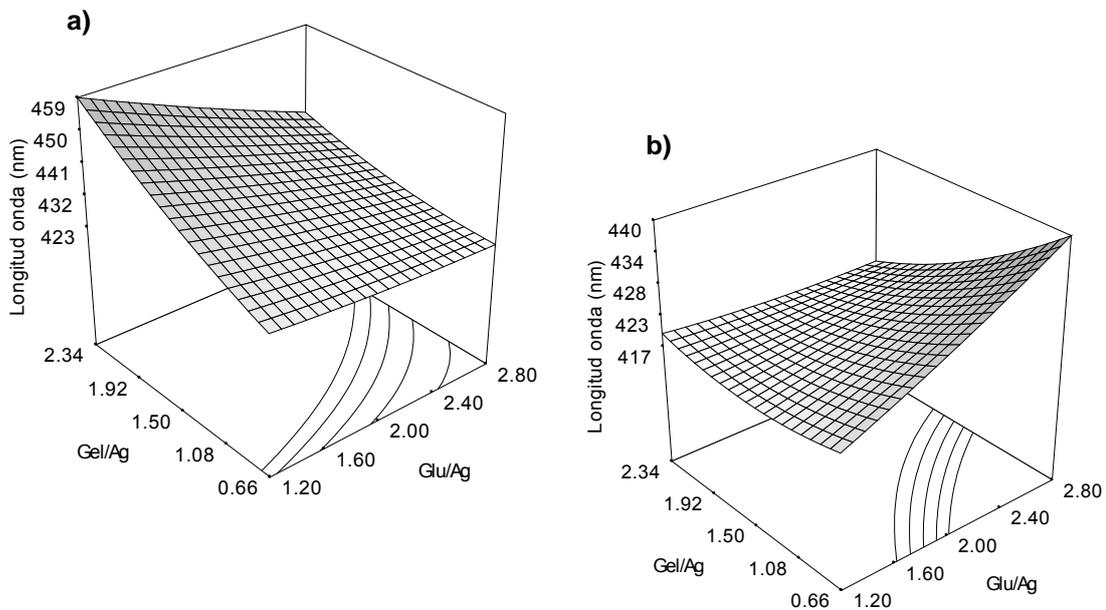


Figura 6. Superficies de respuesta para la caracterización por UV-vis: a) 58°C, b) 92°C.

6.1.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

A través de esta técnica de caracterización se obtuvieron imágenes de las nanopartículas de plata, las cuales fueron analizadas con el propósito de determinar el tamaño promedio para cada experimento. De igual manera se pudo observar la morfología de las partículas y evaluar algún efecto de las variables de síntesis en la forma predominante.

Los resultados determinaron que mediante el método de reducción química y bajo las condiciones de síntesis establecidas en el diseño experimental, es posible obtener nanopartículas de plata en un rango de diámetro promedio de 5-25nm. Asimismo se pudo observar una prevalencia de nanopartículas de forma esferoidal bajo todas las condiciones de síntesis. Lo anterior se puede correlacionar con los resultados de espectroscopia UV-vis, ya que los espectros obtenidos para cada una de las corridas, presentaron una sola banda simétrica de resonancia de plásmón superficial, ubicándose en un rango de longitud de onda de 420-430nm.

La figura 7 muestra imágenes de MET, con sus respectivos histogramas, de nanopartículas de plata obtenidas bajo las condiciones de las corridas 10, 12 y 6. Las nanopartículas de mayor tamaño sintetizadas en esta investigación, tuvieron un diámetro promedio de 23.8nm (figura 7a) y fueron obtenidas bajo condiciones de síntesis de glu/Ag: 2.5, gel/Ag: 1 y temperatura: 85°C. De acuerdo con su histograma, esta corrida experimental presentó también la mayor distribución de tamaño. Por lo contrario, bajo condiciones de glu/Ag: 2.8, gel/Ag: 1.5 y temperatura: 75°C se obtuvieron las nanopartículas de menor tamaño (5nm) y con la menor distribución (figura 7c). La figura 7b muestra una imagen de MET y su histograma para nanopartículas de un tamaño medio (13.8nm), obtenidas bajo condiciones de glu/Ag: 2.0, gel/Ag: 2.3 y temperatura: 75°C.

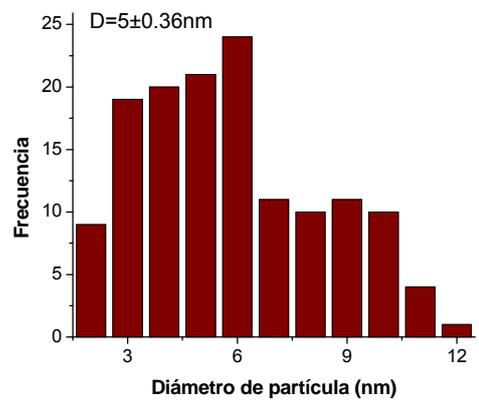
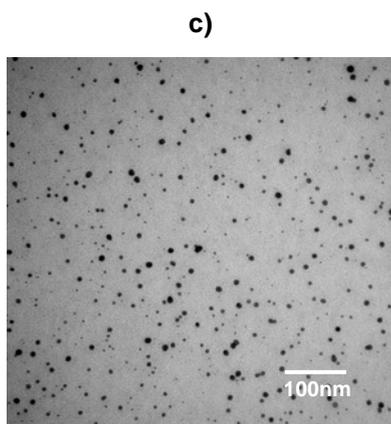
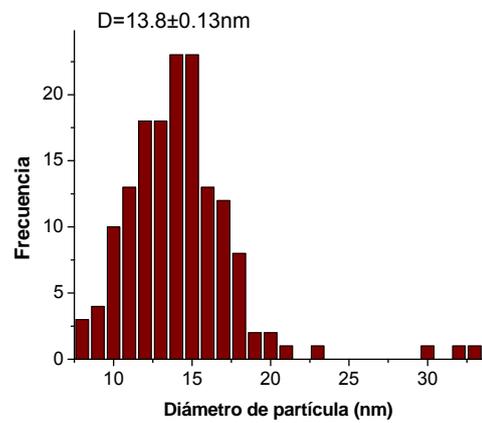
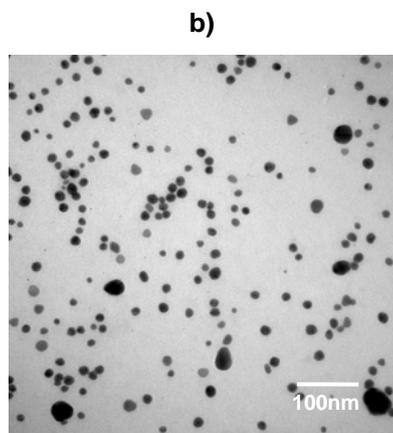
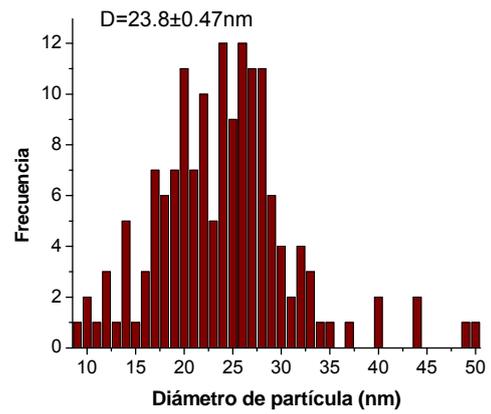
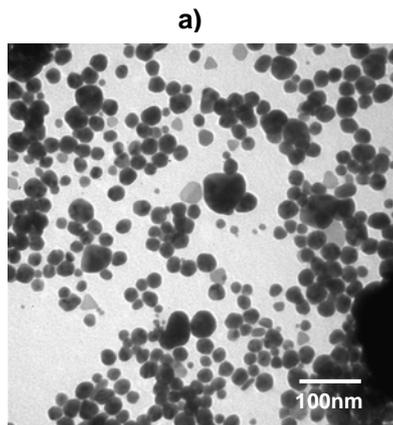


Figura 7. Imágenes de MET de nanopartículas de plata

Mediante el patrón de difracción de electrones (figura 8), fue posible confirmar la naturaleza cristalina de las nanopartículas de plata. Las distancias interplanares de los anillos de difracción, pueden ser indexadas de acuerdo con la estructura cúbica centrada en las caras (fcc) de la plata metálica.

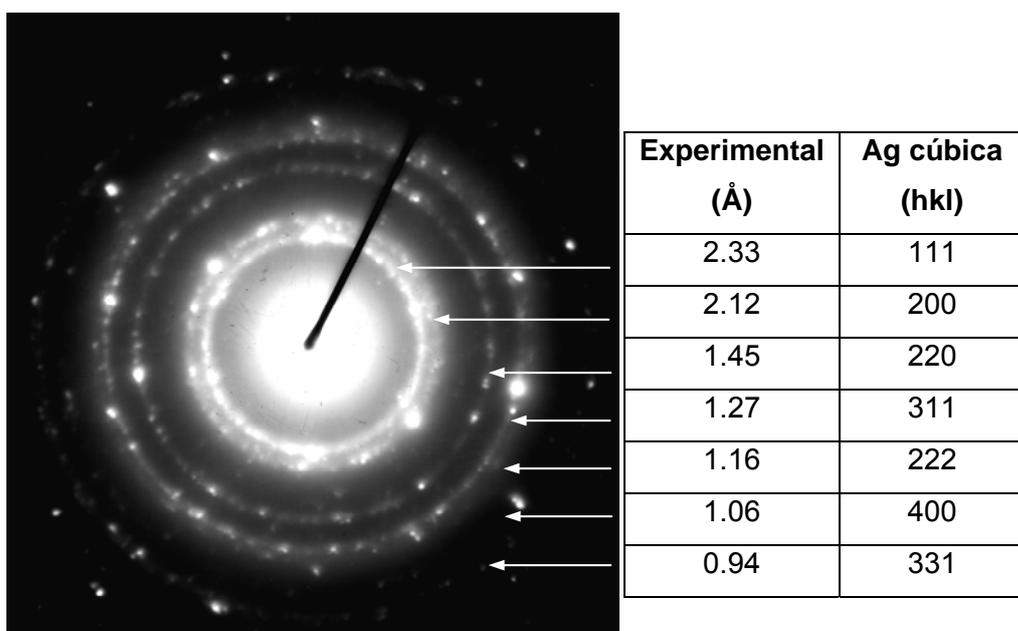


Figura 8. Patrón de difracción de electrones de nanopartículas de plata

Con la finalidad de establecer la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de las nanopartículas de plata, los valores de tamaño promedio fueron analizados mediante la MSR (figura 9). De acuerdo con la figura 9a, nanopartículas de tamaño pequeño (3.5nm) pueden ser obtenidas al aumentar proporcionalmente las relaciones Gel/Ag (desde 0.66 hasta 2.34) y Glu/Ag (desde 1.20 hasta 2.80), esto bajo condiciones de temperatura de síntesis de 58°C. La superficie de respuesta también muestra que partículas de un tamaño mayor (28.5nm) podrían ser sintetizadas bajo una concentración alta de proteína (Gel/Ag: 2.34) y concentración mínima del agente reductor (Glu/Ag: 1.20). Al aumentar la temperatura de síntesis hasta 92°C la tendencia de la superficie de respuesta se modifica (figura 9b), lo que nos indica una influencia de la temperatura en el tamaño de las nanopartículas de plata. Es posible observar que nanopartículas de tamaño relativamente pequeño (7.2) podrían ser obtenidas en

rangos de Gel/Ag: 1.08-1.5 y Glu/Ag: 1.6-2.0. Por otro lado, partículas de mayor tamaño se sintetizarían bajo condiciones de Glu/Ag: 2.8 y Gel/Ag: 0.66. Como puede observarse este hecho es totalmente contrario al trabajar a temperatura de 52°C. De acuerdo con Sun y Luo (2005), al aumentar la relación pasivante/plata se puede conseguir una disminución del tamaño de partícula. Sin embargo en esta investigación, este suceso solo se observa si se utilizan temperaturas de síntesis de 92°C, ya que a bajas temperaturas (58°C), el aumento en la relación gel/Ag favorece la formación de partículas de mayor tamaño. Bajo este respecto, Petica et al. (2008) señalan que al aumentar la concentración del polímero conlleva a un incremento de la viscosidad de la solución, obstaculizando la difusión y disminuyendo las repulsiones electrostáticas, por lo tanto promoviendo la aglomeración de las partículas. Tomando en cuenta solo la temperatura de síntesis se puede notar que al aumentar la temperatura se favorece el crecimiento de las partículas. Resultados similares fueron reportados por Luo et al. (2005).

Se puede observar que las graficas de superficie de respuesta para este análisis presentan tendencias similares a aquellas superficies obtenidas para espectroscopia UV-vis, lo que nos indica una concordancia entre los resultados de ambas técnicas.

La ecuación 7 representa el modelo matemático para este análisis. El modelo mostró un ajuste moderado ($R^2=0.6$) a los datos experimentales.

$$\begin{aligned} \text{Tamaño} = & 53.18 - 14.35 * X_1 + 28.21 * X_2 - 1.63 * X_3 + 3.3 * X_1^2 + 7.19 * X_2^2 \\ & + 0.011 * X_3^2 - 12.27 * X_1 X_2 + 0.29 * X_1 X_3 - 0.36 * X_2 X_3 \end{aligned} \quad (7)$$

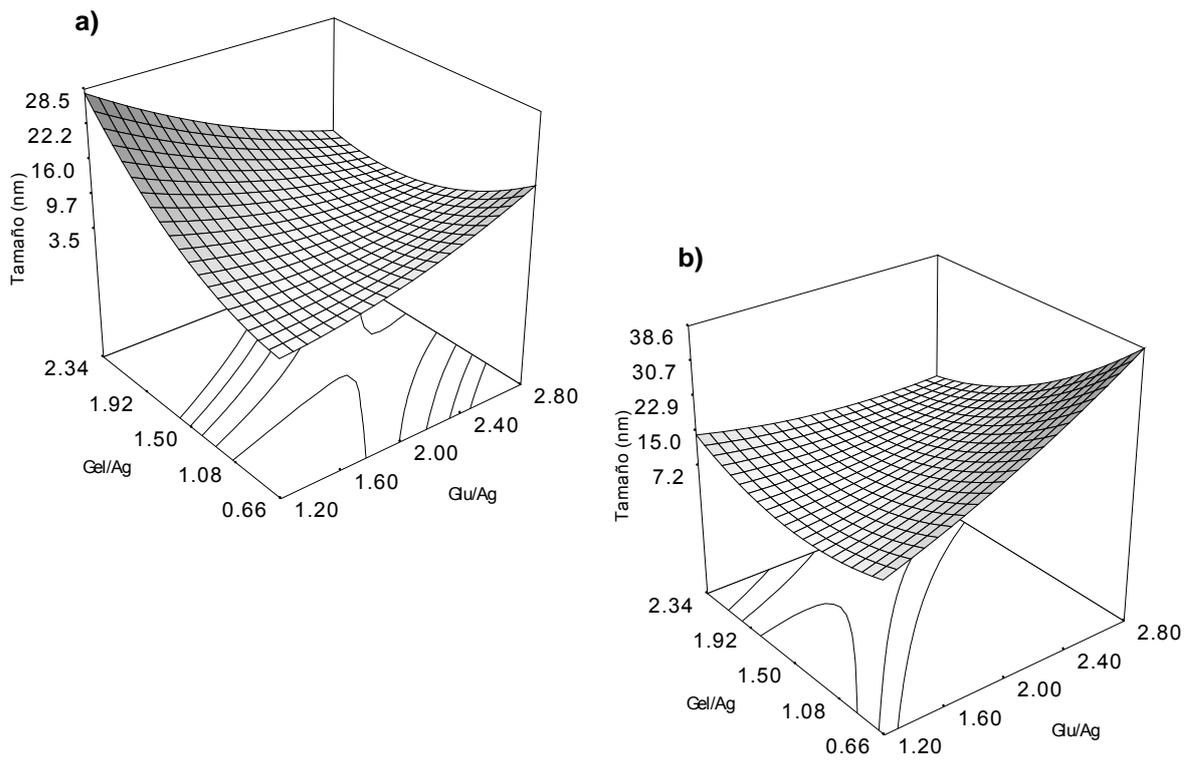


Figura 9. Superficies de respuesta para la caracterización por MET: a) 58°C, b) 92°C.

6.1.4. Espectroscopia Raman

Esta técnica se empleó para evaluar las posibles interacciones existentes entre las nanopartículas de plata y el polímero gelatina (agente pasivante). La figura 10a muestra un espectro Raman del AgNO_3 (precursor) evidenciando tres picos importantes a números de onda de 685, 1011 y 1300 cm^{-1} . El pico más intenso ubicado a un número de onda de 1011 cm^{-1} corresponde al ion nitrato (NO_3^-). Los dos picos más débiles ubicados a 1041 y 1300 cm^{-1} , corresponden al par ión $\text{Ag}^+ \text{NO}_3^-$, teniendo un modo de tensión simétrica (Oliver and Janz). En lo que respecta a la gelatina (figura 10b) Raman evidenció picos a 1668, 1450, 1315 y 1250 cm^{-1} , los cuales corresponden a la Amida I (vibraciones de tensión del enlace C=O), grupos alifáticos (vibraciones de tensión del enlace C-H), Amida II (vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N) y Amida III (vibraciones de flexión del enlace N-H). En el espectro Raman de las nanopartículas de plata (figura 10c) solo es posible observar dos picos ensanchados ubicados 1590 y 1300 cm^{-1} los cuales pueden atribuirse a las amidas I, II y III. Es posible inferir que los desplazamientos en los valores de longitud de onda, así como el ensanchamiento de los picos sean atribuidos a interacciones con nanopartículas de plata. Se puede observar también que el pico correspondiente al ion NO_3^- en el espectro Raman del AgNO_3 prácticamente desaparece en el espectro Raman de las nanopartículas. Sin embargo este espectro da muy poca información para discutir y es necesario realizar o emplear otra técnica como FTIR para corroborar y obtener más información sobre las posibles interacciones gelatina-nanopartículas.

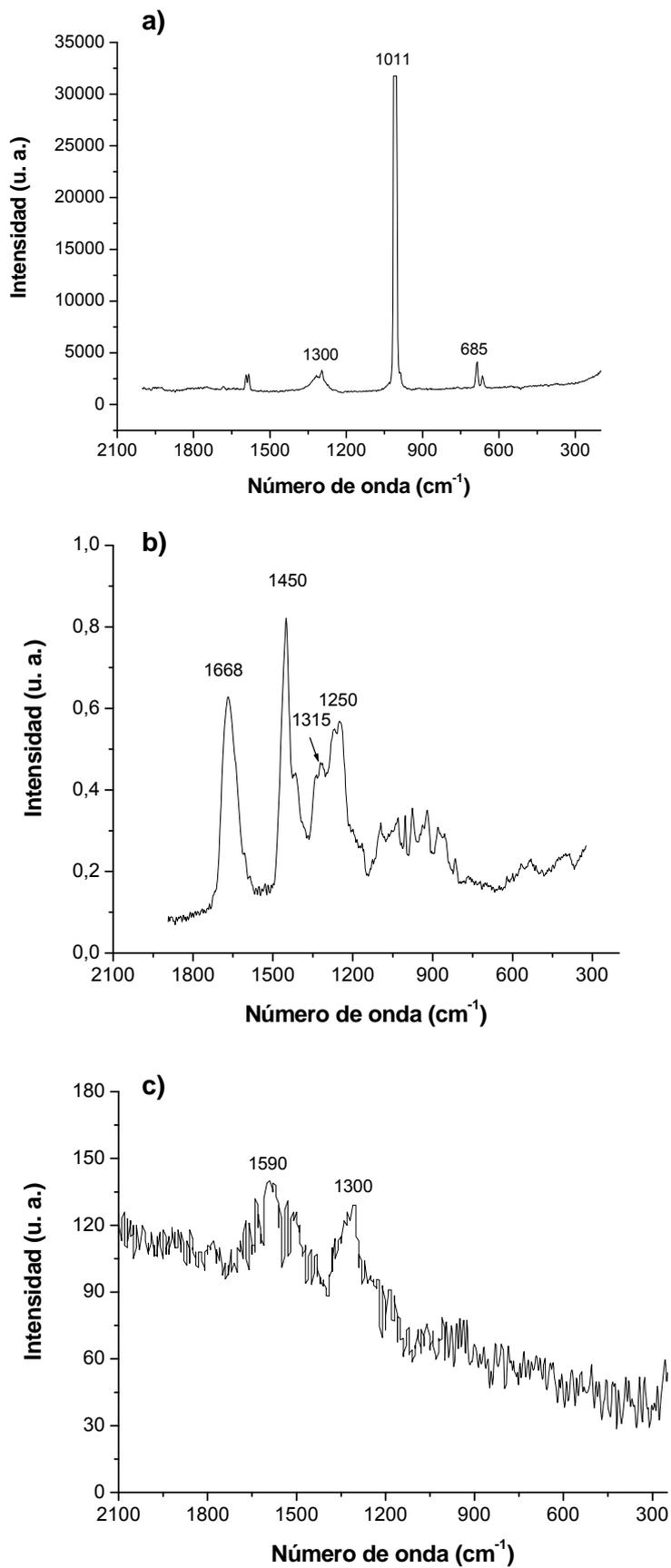


Figura 10. Espectros Raman de: a) AgNO₃ b) gelatina y c) nanopartículas de plata

6.1.5. Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

La principal utilidad de la FTIR en la caracterización de nanopartículas metálicas, es para detectar especies químicas que interaccionan con la superficie de la partícula (Baker et al., 2004). Esta técnica es esencialmente sensible a la presencia de grupos polares tales como O-H, C=O, C-O y N-H (Ma y Phillips, 2002).

Los espectros FTIR de los precursores empleados (AgNO_3 y gelatina) y de las nanopartículas sintetizadas en esta investigación fueron obtenidos (Figura 11). El espectro de la gelatina reveló bandas de absorción características a 3417cm^{-1} correspondiente a la Amida A (vibraciones de tensión del enlace N-H), 1648cm^{-1} perteneciente a la amida I (vibraciones de tensión del enlace C=O), 1535cm^{-1} correspondiente a la amida II (vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N) y finalmente a 1240cm^{-1} , la cual es característica de la amida III (vibraciones de flexión del enlace N-H). De acuerdo con Pranoto et al. (2007), la banda correspondiente a la amida I es el pico más útil para el análisis de la estructura secundaria de proteínas como la gelatina. El espectro del AgNO_3 muestra una banda de absorción muy intensa a 1376cm^{-1} , la cual es propia del par ión $\text{Ag}^+ \text{NO}_3^-$. Por otro lado, al analizar el espectro de las nanopartículas de plata, se pueden observar ligeros corrimientos de las distintas bandas de absorción anteriormente descritas. Las bandas correspondientes a las amidas A y I, se desplazaron a menores valores de número de onda (3400 y 1640cm^{-1} , respectivamente). Por otra parte, el pico perteneciente a la amida II se ubicó a un mayor valor de número de onda (1539cm^{-1}), siendo evidente también una disminución en su intensidad. La banda ubicada a 1240cm^{-1} (amida III) prácticamente desapareció del espectro de las nanopartículas. En el espectro del AgNO_3 , la banda antes localizada a 1376cm^{-1} (correspondiente al par ión $\text{Ag}^+ \text{NO}_3^-$), aparece ahora a un mayor valor de número de onda (1385cm^{-1}) y con una disminución en su intensidad. Este pico, ubicado a 1385cm^{-1} , es característico del ión NO_3^- en forma libre, y el desplazamiento es provocado por un cambio en el entorno electrónico del anión como resultado de la separación de su contraparte Ag^+ (Cho y So, 2006).

Con estos resultados se puede deducir que las nanopartículas de plata se encuentran interaccionando con los distintos grupos amida de la gelatina. Se puede asumir que estas interacciones favorecen en gran medida la estabilidad presentada por las soluciones coloidales. De acuerdo con Basavaraja et al. (2008) los grupos carbonilo de aminoácidos y proteínas tienen la habilidad de ligar partículas metálicas y de esta manera prevenir su aglomeración.

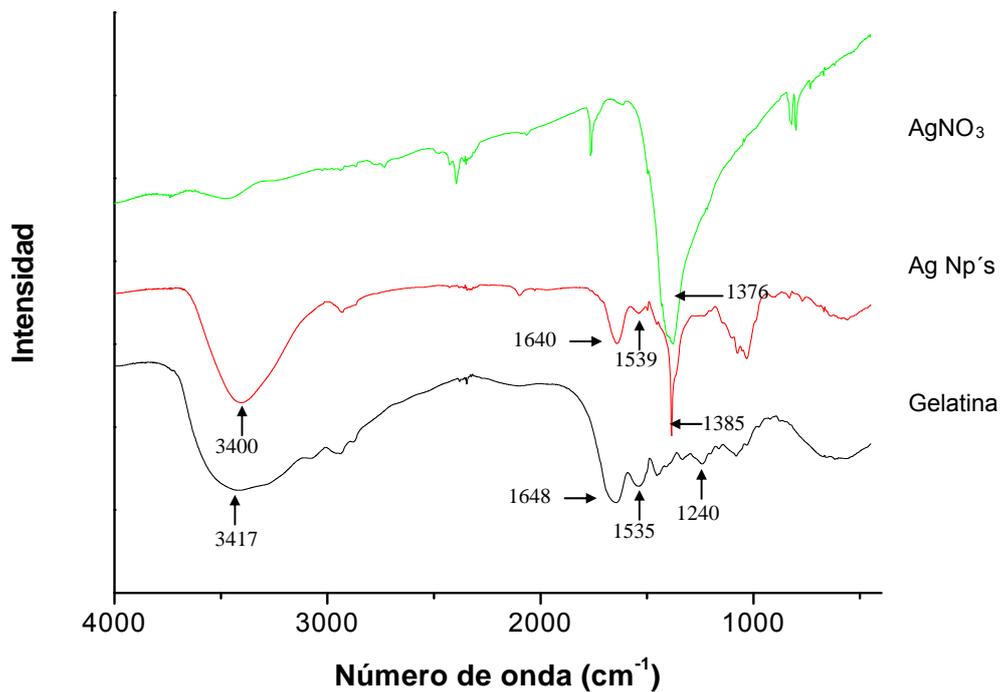


Figura 11. Espectros FTIR de los precursores empleados (AgNO₃ y gelatina) y de las nanopartículas de plata

6.2. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La figura 12, muestra el efecto del tamaño y concentración de nanopartículas de plata en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloesporioides*. Es evidente que la adición de nanopartículas de plata al medio de cultivo, provocó una disminución importante en la velocidad de crecimiento micelial, en comparación con el control. Además esta reducción en el crecimiento del hongo fue menor a medida que se aumentó la concentración de nanopartículas de plata en el medio de cultivo. En cuanto al efecto del tamaño de partícula (5, 13.8 y 23.8nm) sobre la reducción del crecimiento micelial, no se observaron diferencias (figura 12a-12c). Lo anterior pudo ser debido a la corta distribución de tamaño de partícula utilizada (5-23.8nm). A diferencia de algunos reportes sobre la inactivación total de varios tipos de bacterias como consecuencia de la aplicación de nanopartículas de plata (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Cho et al., 2005; Pal et al., 2007), en esta investigación, la aplicación de este tipo de nanomateriales solo encontró un efecto fungistático sobre el crecimiento del hongo *Colletotrichum gloesporioides* (figura 13). Petica et al. (2008) reportaron también efectos fungistáticos de nanopartículas de plata en solución coloidal, sobre varias especies de hongos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*). La tabla 4, muestra los porcentajes de inhibición que tuvieron cada uno de los tratamientos aplicados, alcanzando casi un 90% de inhibición con la concentración C₃ para cada uno de los tamaños de partícula evaluado.

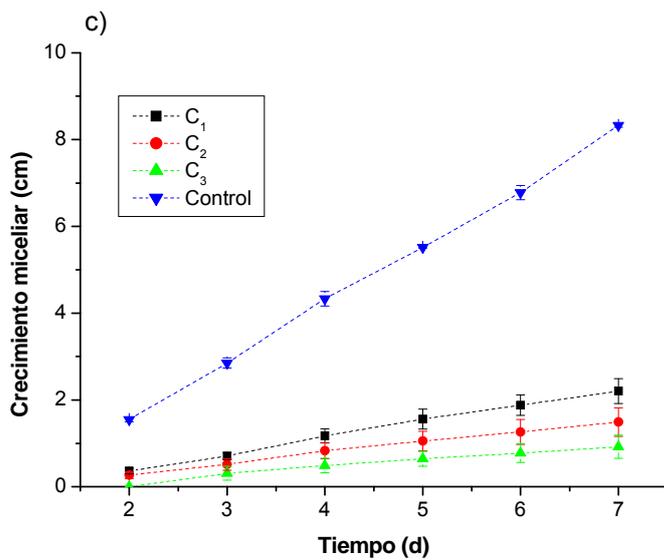
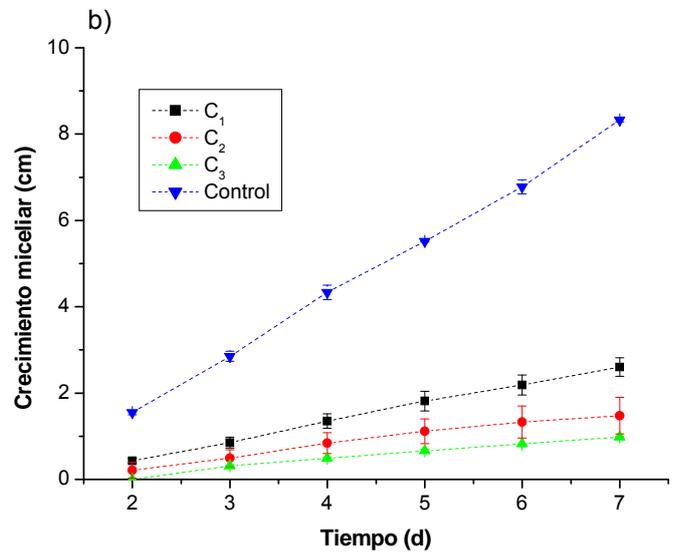
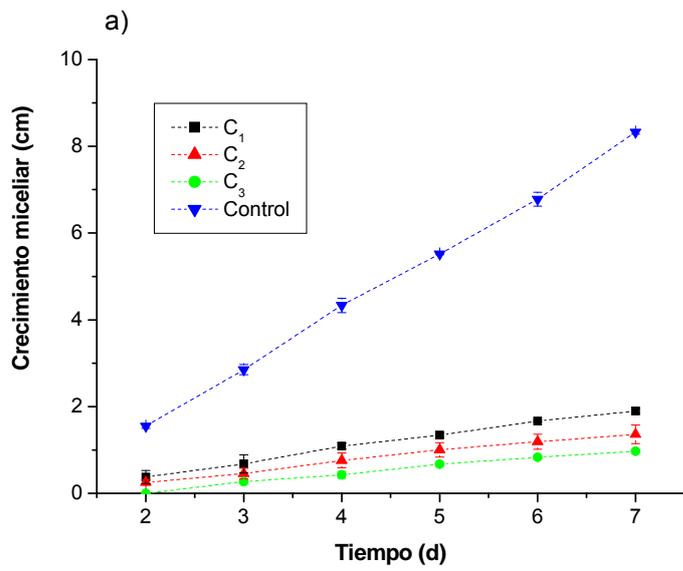


Figura 12. Crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* bajo diferentes concentraciones de nanopartículas de plata

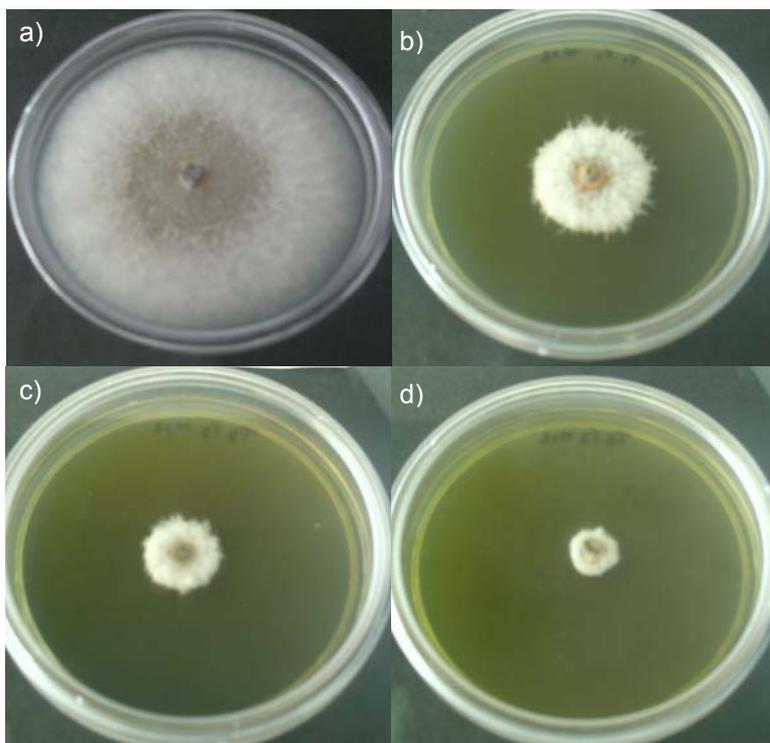


Figura 13. Efecto de la adición de nanopartículas de plata en el crecimiento micelial de *C. gloesporioides*

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de *C. gloesporioides*

Concentración	Inhibición (%)		
	5nm	13.8nm	23.8nm
C ₁	73	69	74
C ₂	82	82	82
C ₃	89	88	89

6.3. EVALUACIÓN IN SITU DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

6.3.1. Índice de severidad e incidencia

Al finalizar el periodo de experimentación los síntomas de antracnosis fueron evidentes en todos los tratamientos (figura 14), sin embargo en los frutos control la manifestación de la enfermedad fue mayor. En estos frutos, la incidencia de la antracnosis fue del 100% y el índice de severidad de 2.6 (tabla x). Para los frutos recubiertos con película+nanopartículas de plata (T_1 , T_2 y T_3) los índices de severidad variaron de 1.2 a 1.8 y los porcentajes de incidencia de 20-80%. Por otro lado, se presentaron índices de 2.0 e incidencia de 80% en los frutos recubiertos solo con película (P). Con lo establecido anteriormente se puede observar el efecto de las nanopartículas en la actividad de *Colletotrichum gloesporioides*. Con la concentración de nanopartículas utilizada en el tratamiento T_2 se obtuvieron el menor índice de severidad y la menor incidencia. Podría suponerse que al aumentar la cantidad de nanopartículas en el recubrimiento (T_3) la incidencia de antracnosis sería menor, sin embargo los resultados mostraron lo contrario ya que el índice de severidad en el tratamiento T_3 fue mayor que aquellos obtenidos en los tratamientos T_1 y T_2 y la incidencia fue similar a la presentada en los frutos del tratamiento P (solo película). Los resultados obtenidos en esta evaluación son acordes a los encontrados en las pruebas in vitro, en el sentido del efecto fungistático que presentan las nanopartículas de plata. Es importante resaltar también que al finalizar el experimento, los frutos tratados con nanopartículas de plata presentaron zonas oscuras en el tejido superficial (figura 15), siendo más evidentes a medida que aumentó la concentración de los nanomateriales. Es probable que la plata al entrar en contacto con las células vegetales, provoque daño estructural evidenciado por los cambios en el color.

Tabla 5. Efecto de las nanopartículas de plata en el índice de incidencia y severidad

Tratamiento	Índice de severidad	Incidencia (%)
Control	2.6	100
P	2.0	80
T ₁	1.4	40
T ₂	1.2	20
T ₃	1.8	80



Figura 14. Frutos de papaya con síntomas de antracnosis



Figura 15. Frutos de papaya con daño en el tejido superficial

6.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PAPAYA

6.4.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso en frutos de papaya, como en la mayoría de los frutos y vegetales frescos, es consecuencia directa de la disminución en su contenido de humedad (Kader, 1986). Uno de los propósitos de la aplicación de cubiertas sobre la superficie de frutos, es retardar la migración de humedad y la pérdida de compuestos volátiles (Del-Valle et al., 2005).

La figura 16 muestra la pérdida de peso en función del tiempo para los distintos tratamientos con frutos de papaya. Se puede observar que los tratamientos control (C) y T₃ tuvieron una mayor pérdida de peso (8.5-9%) en comparación con los tratamientos P, T₁ y T₂, los cuales presentaron pérdidas de 7.5% en promedio, al finalizar el experimento. Lo anterior se puede explicar ya que los recubrimientos aplicados a los frutos (a excepción de T₃), actuaron como una barrera semipermeable a la transferencia de vapor de agua, lo que a su vez se tradujo en una menor pérdida de peso. En el caso del tratamiento T₃, es posible que al aumentar la concentración de nanopartículas en el recubrimiento, éstas afectaron de manera importante los tejidos superficiales de los frutos, provocando un mayor daño celular y por lo tanto favoreciendo la pérdida de humedad. Li et al. (2008) reportaron menores pérdidas de peso en dátiles chinos almacenados en empaques con incorporaciones de nanopartículas de plata, dióxido de titanio y kaolin, en comparación con aquellos almacenados en empaques sin nanomateriales. Por su parte, An et al. (2008) observaron efectos benéficos en la disminución de la pérdida de peso de espárragos recubiertos con una película de PVP-nanopartículas de plata.

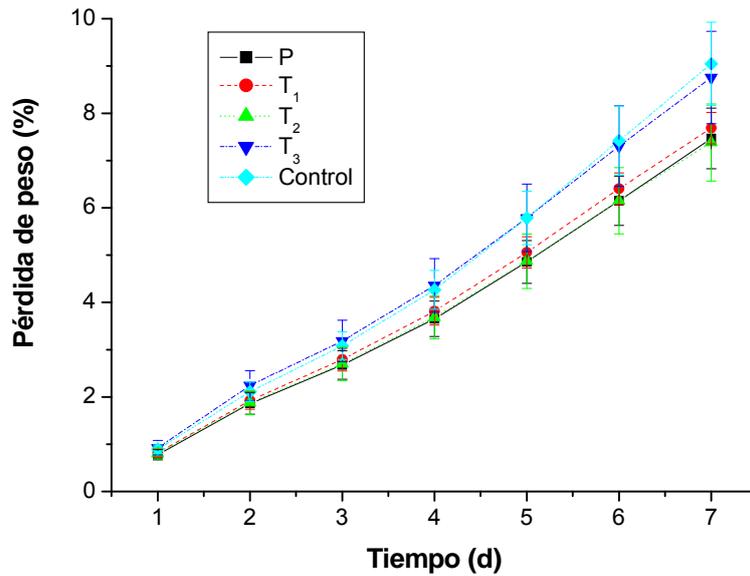


Figura 16. Pérdida de peso de frutos de papaya en función del tiempo

6.4.2. Pérdida de firmeza

La textura es considerada como el principal atributo de calidad de las frutas que influye en la aceptabilidad por parte de los consumidores. El ablandamiento o pérdida de firmeza es el resultado de modificaciones texturales que tienen lugar durante el periodo postcosecha, para prácticamente todas las especies de frutas (Manrique y Lajolo, 2004). Estos cambios en la textura son atribuidos a la degradación de los componentes de la pared celular, por la acción de algunas enzimas como la pectinesterasa y poligalacturonasa (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005).

Al inicio de la experimentación los frutos de papaya presentaron valores de firmeza promedio de 7.89 ± 0.33 N. Al séptimo día de almacenamiento, se pudo observar una disminución en los valores para todos los tratamientos (figura 17), producto de la maduración de los frutos. Sin embargo, el tratamiento sin recubrimiento (control) tuvo una mayor pérdida de firmeza en comparación con aquellos con recubrimiento (P, T₁, T₂ y T₃). Por otro lado entre los tratamientos con película se puede observar que el tratamiento T₁ fue el que presentó mayores

valores de firmeza al finalizar la experimentación. La aplicación de una cubierta biopolimérica en la superficie de un fruto tiene como objetivo regular la permeabilidad a gases (O_2 y CO_2), y por ende establecer una atmósfera modificada (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005). De acuerdo con Yaman y Bayoindirli (2002), estas condiciones de atmósfera modificada, pueden reducir la actividad enzimática causante de la degradación de los tejidos celulares.

Li et al. (2009) fabricaron materiales de empaque con incorporaciones de nanopartículas de plata, dióxido de titanio y kaolin, para la preservación de dátiles chinos. Estos autores reportaron que la incorporación de los nanomateriales mejoró las propiedades de barrera y mecánicas de los materiales de empaque. Por lo tanto, los frutos almacenados en este tipo de materiales retuvieron mejor la firmeza en comparación con los frutos control.

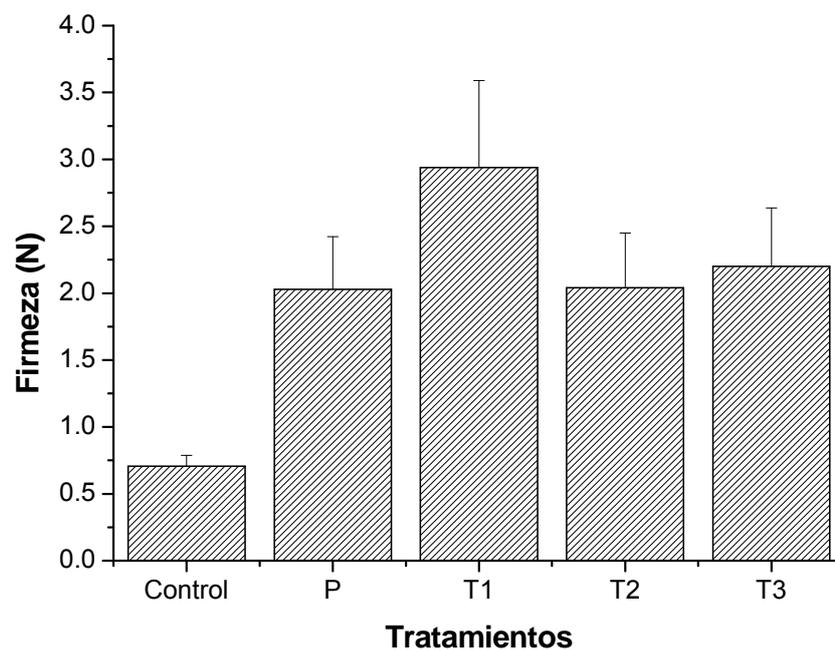


Figura 17. Firmeza de frutos de papaya al finalizar el tiempo de experimentación

6.4.3. Sólidos solubles totales (°Brix)

Los sólidos solubles totales son compuestos solubles en agua y son importantes en la determinación de la calidad de la fruta. Este parámetro es un indicativo de la cantidad de azúcares existentes en la fruta (Detoni et al., 2005). Los valores de SST usualmente se incrementan en el periodo de maduración poscosecha en los frutos climatéricos.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla z, los mayores valores de SST al finalizar el experimento, se presentaron en los frutos control en comparación con los tratamientos con película. Los frutos del tratamiento T₁, fueron los que presentaron los menores valores de SST (10.62±0.75 °Brix). Lo anterior indica que en los frutos control hubo una mayor conversión de carbohidratos a azúcares, lo que evidencia el efecto de la película sobre el retraso en el proceso de maduración de los frutos de papaya. Sin embargo estadísticamente, no existen diferencias entre los distintos tratamientos.

Tabla 6. Contenido de SST en frutos de papaya

Tratamiento	SST (°Brix)
Control	12.75±0.50
P	11.25±1.84
T1	10.62±0.75
T2	10.82±0.92

7. CONCLUSIONES

- Mediante el proceso de síntesis empleado en esta investigación (reducción química) fue posible obtener nanopartículas de plata de forma esférica, de tamaño relativamente pequeño (5-25nm en promedio), distribución uniforme y altamente estables en solución coloidal.
- Los resultados obtenidos por espectroscopia UV-vis y microscopía electrónica de transmisión pudieron correlacionarse adecuadamente en relación al tamaño y morfología de las partículas.
- Los patrones de difracción de electrones permitieron confirmar la naturaleza cristalina de las nanopartículas de plata, teniendo una estructura cúbica centrada en las caras.
- La metodología de superficie de respuesta reveló que las variables de síntesis que mayor influencia tuvieron sobre el tamaño de las nanopartículas de plata fueron la concentración de gelatina y la temperatura de síntesis.
- La gelatina actuó como un excelente pasivante de las nanopartículas de plata. La interacción de esta proteína con las partículas metálicas, se llevó a cabo a través de sus grupos amida (A, I, II y III).
- A través de las pruebas in vitro e in situ de la actividad antifúngica, se pudo determinar que las nanopartículas de plata tuvieron solo un efecto fungistático sobre el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*. Además no se observaron diferencias en el porcentaje de inhibición del hongo a causa de la variación del tamaño de partícula (5, 13.8 y 23.8nm).

- En general los frutos recubiertos con película de gelatina-almidón presentaron menor pérdida de peso, menor pérdida de firmeza y menor concentración de SST (°Brix), en comparación con los no recubiertos (control). Sin embargo, la incorporación de nanopartículas de plata al recubrimiento, provocó daños al tejido superficial de los frutos, afectando de manera directa la calidad postcosecha. Con lo anterior se confirma también la toxicidad que presentan las nanopartículas de plata sobre las células vivas.

8. SUGERENCIAS

- Realizar estudios de citotoxicidad en células vegetales para comprender mejor las alteraciones y daños que provocan las nanopartículas de plata.
- Profundizar los estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión con la finalidad de entender mejor el efecto fungistático de las nanopartículas de plata sobre *C. gloesporioides*.
- Evaluar el efecto antifúngico de compuestos biológicos (extractos de plantas) sobre *C. gloesporioides*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, George N. Fitopatología. Editorial Limusa, 2ª Edición. México, D. F.. 2005.
2. Aguilar-Méndez, M. A.; San Martín-Martínez, E.; Tomás, S. A.; Cruz-Orea, A. and Jaime-Fonseca, M. R. Gelatine-starch films: Physicochemical properties and their application in extending the post-harvest shelf life of avocado (*Persea americana*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 185-193 (2008).
3. Akamatsu, K.; Takei, S.; Minzuhata, M.; Kajinami, A.; Deki, S.; Takeoka, S.; Fujii, M.; Hayashi, S. and Yamamoto, K. Preparation and characterization of polymer thin films containing silver and silver sulfide nanoparticles. Thin Solid Films, 359, 55-60 (2000).
4. An, J.; Zhang, M.; Wang, S. y Tang, J. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 41 (6), 1100-1107 (2008).
5. Atiyeh, B. S.; Costagliola, M.; Hayek, S. N. y Dibo, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and Ealing: Review of the literature. Burns, 33, 139-148 (2007).
6. Baker, C. C.; Pradhan, A. and Shah, S. I. Metal nanoparticles. In Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology. American Scientific Publishers, USA. 449-473 (2004).
7. Balan, L.; Malval, J. P.; Schneider, R. and Burget, D. Silver nanoparticles: New synthesis, characterization and photophysical properties. Materials Chemistry and Physics, 104, 417-421 (2007).

8. Basavaraja, S.; Balaji, S. D.; Lagashetty, A.; Rajasab, A. H. y Venkataraman, A. Extracellular biosíntesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Materials Research Bulletin*, 43, 1164-1170 (2008).
9. Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloesporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087-1092 (2003).
10. Bradley, J. S. and Schmid, G. *Nanoparticles*. Ed. Wiley-Vch, Germany (2004).
11. Chau, C. F.; Wu, S. H. and Yen, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 269-280 (2007).
12. Chen, J.; Wang, J.; Zhang, X. y Jin, Y. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate. *Materials Chemistry and Physics*, 108 (2-3) 421-424 (2008).
13. Cho, K.; Park, J.; Osaka, T. y Park, S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 51, 956-960 (2005).
14. Choi, O.; Deng, K.; Kim, N.; Ross, L.; Surampalli, R. Y. y Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth. *Water research*, 42 (12), 3066-3074 (2008).
15. Del-Valle, V.; Hernández-Muñoz, P.; Guarda, A. and Galotto, M. J. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia Picus indica*) and its application to extend strawberry (*fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, 91, 751-756 (2005).

16. Detoni, A. M.; Clemente, E.; Braga, G. C. and Herzog, N. Variations in the tenor of total soluble solids in grape cultivated under organic system and stored in different temperatures. *Journal of Food Technology*, 3 (4), 491-494 (2005).
17. FAO. Agricultural data. FAOSTAT, FAO. Rome, Italy, 2005.
18. Feng, Q. L. ; Wu, J. ; Chen, G. Q.; Cui, F. Z. ; Kim, T. N. and Kim, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 (4), 662-668 (2000).
19. Gamagae, S. U.; Sivakumar, D.; Wilson Wijeratnam, R. S. and Wijesundera, R. L. C. Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protection*, 22, 775-779 (2003).
20. Guilbert, S.; Gontard, N. and Gorris, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 10-17 (1996).
21. He, S.; Guo, Z.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Wang, J. y Gu, N. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61, 3984-3987 (2007).
22. Hu, Y.; Liu, C.; Zhang, Y.; Ren, N. y Tang Y. Microwave-assisted hydrothermal synthesis of nanozeolites with controllable size. *Microporous and Mesoporous Materials*, 119, 306-314 (2009).
23. Hussain, S.; Hess, K.; Gearhart, J.; Geiss, K. y Schlager, J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicology In Vitro*, 19, 975-983 (2005).
24. IFST. Nanotechnology. (2006) www.ifst.org.

25. Kader, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology*, 40, 99-100, 102-104 (1986).
26. Kapoor, S. Preparation, characterization, and surface modification of silver nanoparticles. *Langmuir*, 14, 1021-1025 (1998).
27. Kashiwagi, K.; Yamamoto, M. y Nakamoto, M. Facile size-regulated synthesis of silver nanoparticles by controlled thermolysis of silver alkylcarboxylates in the presence of alkylamines with different chain lengths. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300, 196-175 (2006).
28. Kefialew, Y. and Ayalew A. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50, 8-11 (2008).
29. Kéki, S.; Török, J.; Deák, G.; Daróczi, L. y Zsuga, M. Silver nanoparticles by PAMAM-assisted photochemical reduction of Ag⁺. *Journal of Colloid and Interface Science*, 229, 550-553 (2000).
30. Kim, S. W.; Kim, K. S.; Lamsal, K.; Kim, Y.; Kim, S. B.; Jung, M.; Sim, S.; Kim, H.; Chang, S.; Kim, J. K.; Lee, Y. S. An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-5 (2009).
31. Li, H.; Li, F.; Wang, L.; Sheng, J.; Xin, Z.; Zhao, L.; Xiao, H.; Zheng, Y. y Hu, Q. Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill. var. *inermis* (Bunge) Rehd). *Food chemistry*, 114 (2), 547-542 (2009).
32. Li, Z.; Tao, X.; Cheng, Y.; Wu, Z.; Zhang, Z. and Dang, H. A facile way for preparing tin nanoparticles from bulk tin via ultrasound dispersion. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 89-92 (2007).

33. Liu, W. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and bioengineering*, 102 (1), 1-7 (2006).
34. Luo, C.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Zeng, Y. and Wang, Y. The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288, 444-448 (2005).
35. Ma, C. Y. y Phillips, D. L. FT-Raman spectroscopy and its applications in cereal science. *Cereal Chemistry*, 79 (2), 171-177 (2002).
36. Maftoonazad, N. and Ramaswamy, H. S. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 617-624 (2005).
37. Manrique, G. D. and Lajolo, F. M. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 11-26 (2004).
38. Moore, J. W.; Stanitski, C. L.; Wood, J. L. and Kotz, J. C. *El mundo de la química*. Editorial Addison Wesley Longman de México, 2ª Edición. México D. F., 2000.
39. Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Tapia-Ramirez, J. y Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346-2353 (2005).
40. Muñoz, Z.; Moret, A. and Garcés S. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection*, 28, 36-40 (2009).
41. Narayanan, K. B. y Sakthivel, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Materials Letters*, 62, 4588-4590 (2008).

42. Ozkaraoglu, E.; Tunc, I and Suzer, S. Preparation of Au and Au-Pt nanoparticles within PMMA matrix using UV and X-ray irradiation. *Polymer*, 50, 462-466 (2009).
43. Pal, S.; Tak, Y. K. y Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6), 1712-1720 (2007).
44. Panigrahi, S.; Praharaj, S.; Basu, S.; Ghosh, S. K.; Jana, S.; Pande, S.; Vo-Dinh, T.; Jiang, H. and Pal, T. Self-assembly of silver nanoparticles: synthesis, stabilization, optical properties and application in surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physical Chemistry*, 110, 13436-13444 (2006).
45. Petica, A.; Graviliu, S.; Lungu, M.; Buruntea, N. and Panzaru C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B*, 152, 22-27 (2008).
46. Phuoc, T. X.; Howard, B. H.; Martello, D. V.; Soong, Y. and Chyu, M. K. Synthesis of $Mg(OH)_2$, MgO, and Mg nanoparticles using laser ablation of magnesium in water and solvents. *Optics and Lasers in Engineering*, 46, 829– 834 (2008).
47. Poole, C. P. y Owens, F. J. *Introduction to nanotechnology*. Wiley Interscience, USA. (2003).
48. Pranoto, Y.; Lee, C. M. y Park, H. J. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ -carrageenan. *LWT*, 40, 766-774 (2007).
49. Rai, M.; Yadav, A. y Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27 (1), 76-83 (2008).

50. Raveendran, P.; Fu, J. and Wallen, S. L. A simple and green method for the synthesis of Au, Ag, and Au-Ag alloy nanoparticles. *Green Chemistry*, 8, 34-38 (2006).
51. Rhim, J.; Hong, S.; Park, H. and Perry, K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5814-5822 (2006).
52. Saifuddin, N.; Wong, C. W. y Nur-Yasumira, A. A. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *E-journal of Chemistry*, 6 (1), 61-70 (2009).
53. Sárkány A.; Papp, Z. Sajó, I. y Schay, Z. Unsupported Pd nanoparticles prepared by γ -radiolysis of PdCl₂. *Solid State Ionics*, 176, 209-215 (2005).
54. Sarkar, A.; Kapoor, S. and Mukherjee, T. Synthesis of silver nanoprisms in formamide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 287, 496-500 (2005).
55. Sastry, M.; Ahmad, A.; Khan, M. I. y Kumar, R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science*, 85 (2), 162-170 (2003).
56. Shao, K. and Yao, J. Preparation of silver nanoparticles via a non-template method. *Materials Letters*, 60, 3826-3829 (2006).
57. Sharma, R. R.; Singh, D. and Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 2009, doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.001.
58. Skoog, Douglas A. y Leary, James J. *Análisis instrumental*. Cuarta Edición. McGraw Hill. Madrid 1994.
59. Slistan-Grijalva, A.; Herrera-Urbina, R.; Rivas-Silva, J. F.; Ávalos-Borja, M.; Castellón-Barraza, F. F. y Posada-Amarillas, A. Synthesis of silver

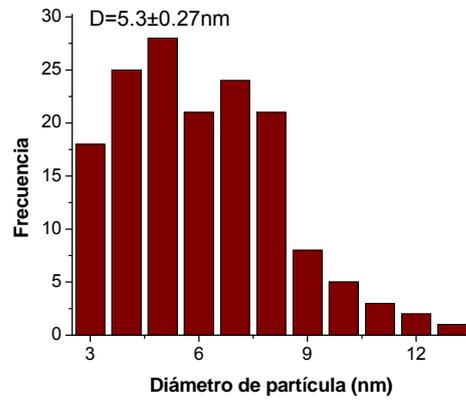
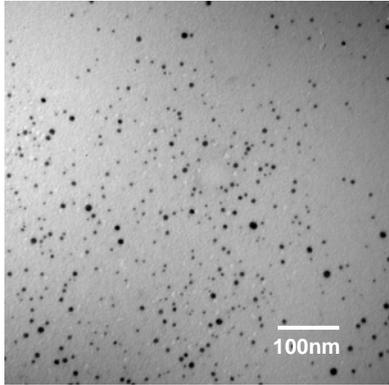
- nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol. *Materials Research Bulletin*, 43, 90-96 (2008).
60. Sondi, S. y Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 177-182 (2004).
61. Sorrentino, A.; Gorrasi, G. and Vittoria V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 84-95 (2007).
62. Sozer, N. and Kokini, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in biotechnology*, 27 (2), 82-89 (2009).
63. Sun, X. y Luo, Y. Preparation and size control of silver nanoparticles by a thermal method. *Materials Letters*, 59, 3847-3850 (2005).
64. Tharanathan, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 71-78 (2003).
65. Tsuji, T.; Kakita, T. y Tsuji M. Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water. *Applied Surface Science*, 206, 314-320 (2003).
66. Ullah, M. H.; Il, K. y Ha, C. Preparation and optical properties of colloidal silver nanoparticles at a high Ag^+ concentration. *Materials Letters*, 60, 1496-1501 (2006).
67. Vigneshwaran, N.; Ashtaputre, N. M.; Varadarajan, P. V.; Nachane, R. P.; Paralikar, K. M. y Balasubramanya, R. H. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*, 61 (6), 1413-1418 (2007).

68. Wang, H.; Qiao, X.; Chen, J. and Ding, S. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 256, 111-115 (2005).
69. Wang, H.; Liu, X.; Wang, X.; Yang, X. and Lu, L. Air-water interfacial titania film self-assembled by CTAB in the presence of gelatin. *Materials Science and Engineering A*, 435-436, 193-197 (2006).
70. Weiss, J.; Takhistov, P. y McClements, D. J. Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71 (9), 107-116 (2006).
71. Wu, H.; Wang, Q.; Yao, Y.; Qian, C.; Cao, P.; Zhang, X. and Wei X. Microwave-assisted synthesis and highly photocatalytic activity of MWCNT/ZnSe heterostructures. *Materials Chemistry and Physics*, 113, 539-543 (2009).
72. Yaman, O. and Bayoindirli, L. Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35, 146-150 (2002).
73. Zhao, Y.; Jiang, Y. y Fang, Y. Spectroscopy property of Ag nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A*, 65, 1003-1006 (2006).
74. Ziegler, K.; Gorl, R.; Effing, J.; Ellermann, J.; Mappes, M. y Otten, S. Reduced cellular toxicity of a new silver-containing antimicrobial dressing and clinical performance in non-healing wounds. *Skin Pharmacology Physiology*, 19 (3), 140-146 (2006).

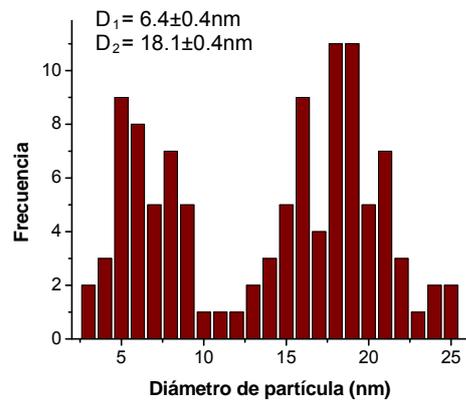
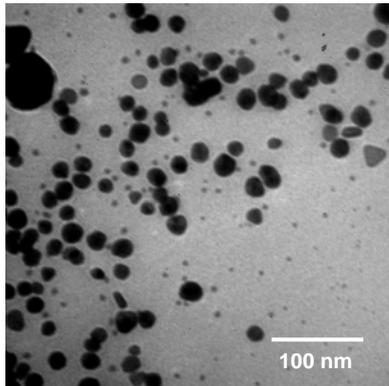
ANEXOS

Microscopía Electrónica de Transmisión

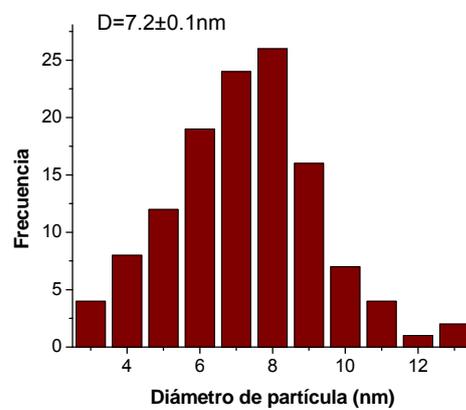
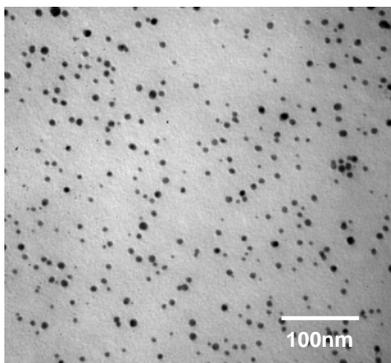
Experimento 1



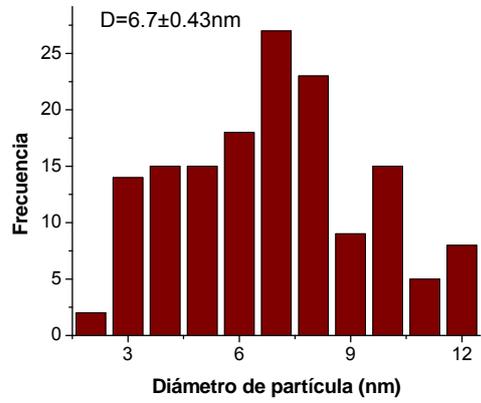
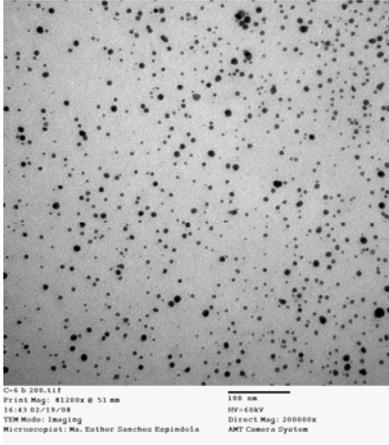
Experimento 2



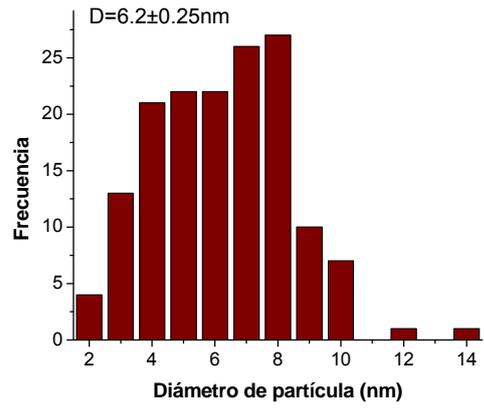
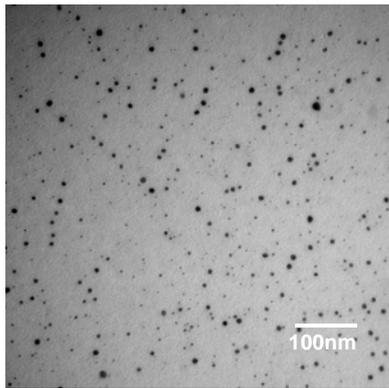
Experimento 3



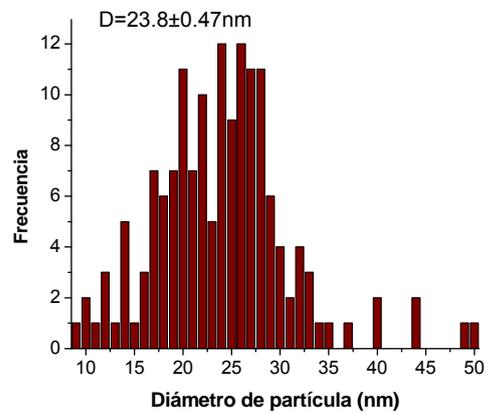
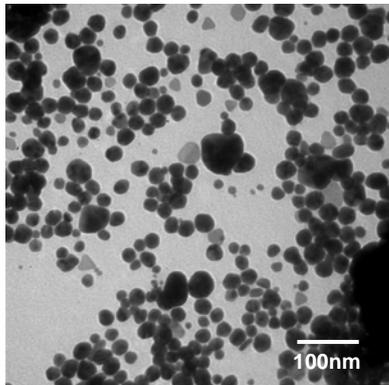
Experimento 4



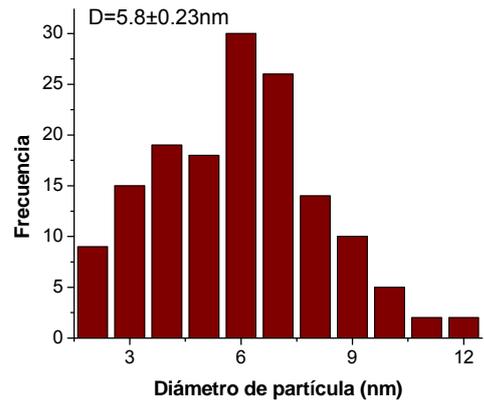
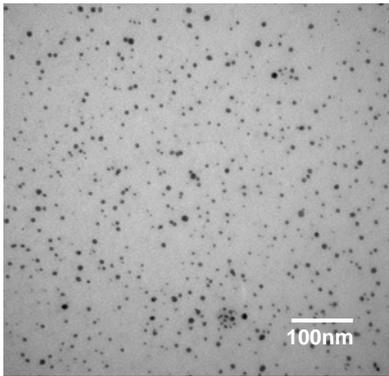
Experimento 5



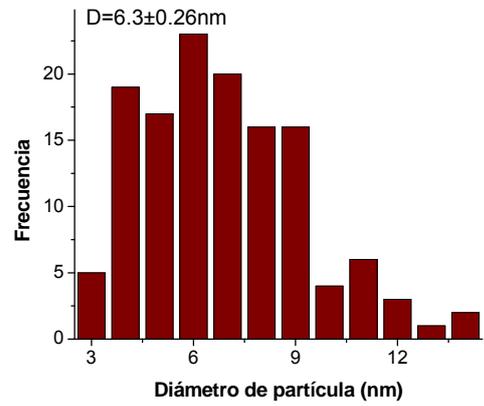
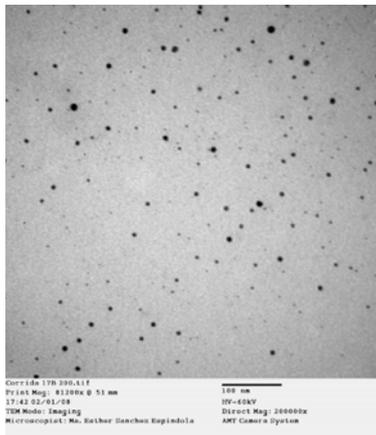
Experimento 6



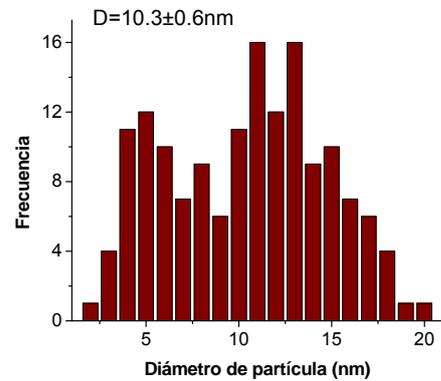
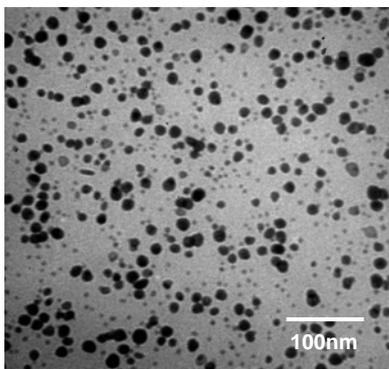
Experimento 7



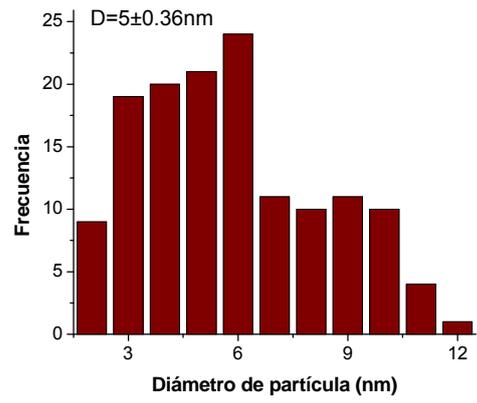
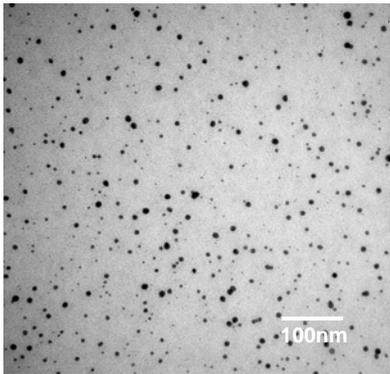
Experimento 8



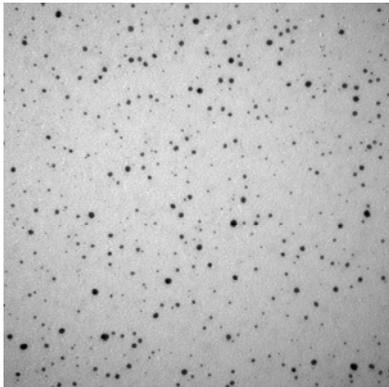
Experimento 9



Experimento 10

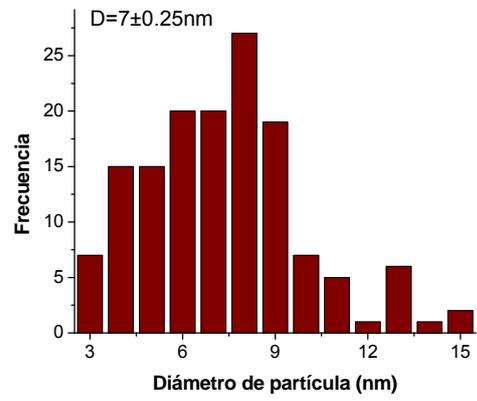


Experimento 11

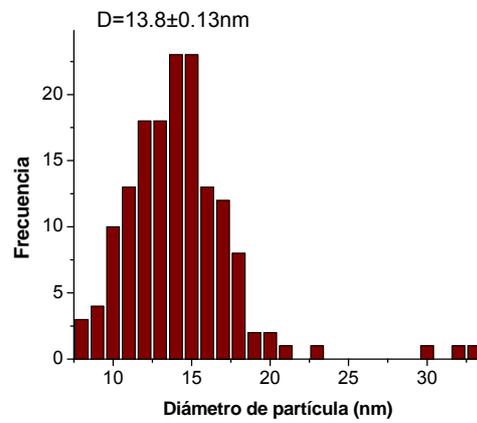
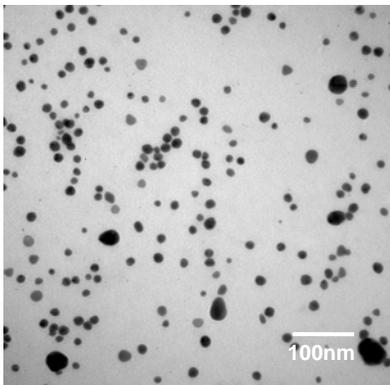


C-14 b 200.tif
Print Mag: 8120x @ 51 mm
14/05/02 15:08
TEM Mode: Imaging
Microscopist: Ms. Esther Sanchez Espindola

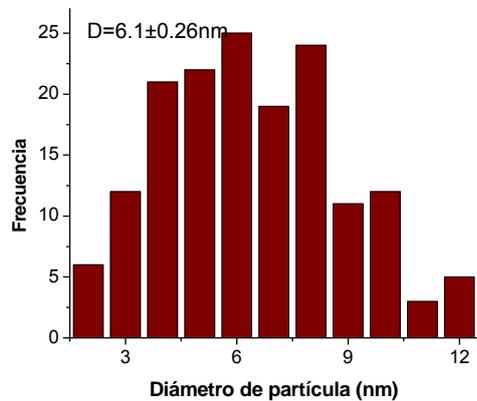
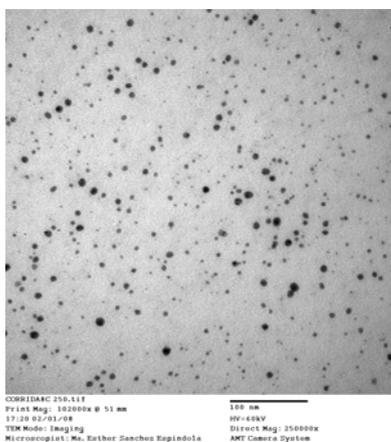
100 nm
HV: 48kV
Direct Mag: 200000x
AMT Camera System



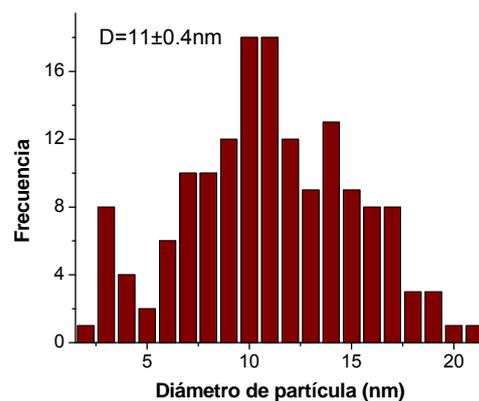
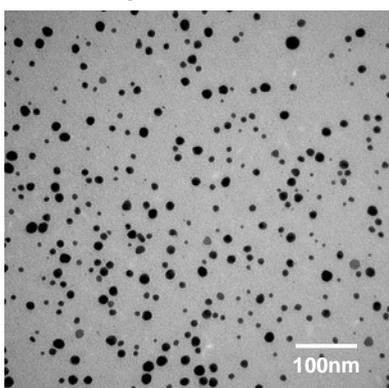
Experimento 12



Experimento 13



Experimento 14



Experimento 15

