FORMULACIÓN ANTIMICROBIANA QUE COMPRENDE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS O DE ÓXIDOS METÁLICOS SINTETIZADOS A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra en el campo de la biotecnología y nanotecnología, específicamente en el campo de las metodologías de síntesis de nanopartículas que sean amigables con el medio ambiente. Además, la utilización de esas nanopartículas en composiciones con actividad biocida, por lo que la presente invención también se encuentra en el campo técnico de control de microorganismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En la industria de la nanotecnología se han descrito algunas rutas para la preparación de nanopartículas metálicas, una de ellas es conocida como descendente o *top-down* que consiste en la disminución de materiales de gran tamaño, y otra consiste en la construcción de las nanopartículas metálicas a partir de átomos y moléculas, denominada ascendente o *bottom-up*.

Las rutas *top-down* presentan desventajas en términos de homogeneidad en la forma y tamaño de las partículas, así como el uso de equipos de gran tamaño que generalmente requieren alto consumo de energía. Por otro lado, las rutas *bottom-up* resultan ser la opción más viable para obtener nanopartículas homogéneas y de tamaños pequeños (Campo Becerra, 2018). Dichas rutas permiten la síntesis química de nanopartículas con base en la reducción de especies iónicas a partir de una sal metálica o precursor y un agente reductor y/o agente estabilizante, en donde la sal metálica, considerada como precursor de la reacción, se va reduciendo por acción del agente reductor para formar átomos del mismo metal, pero con menor valencia. Estos átomos actúan como pequeños núcleos que se van aglomerando para formar moléculas de mayor tamaño, los cuales continúan su crecimiento a medida que se siguen agregando otros átomos y se detiene este crecimiento hasta que la aglomeración de átomos llegue a un nivel nanométrico.

En este sentido, el control de variables y condiciones de reacción durante el proceso de síntesis de nanopartículas tales como temperatura, pH, disolventes y/o reactivos, entre otros, constituye un conjunto de parámetros críticos que pueden afectar la toxicidad derivada del uso de reactivos peligrosos, impacto medioambiental, costos de producción, escalabilidad, forma final, tamaño, distribución de tamaño de partícula y con ello las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas (Valdez Aguilar, J. 2015).

Se han estudiado entonces estrategias alternativas dirigidas a la síntesis verde de nanopartículas empleando agentes fitoquímicos como extractos de plantas y/o enzimas microbianas, los cuales tienen propiedades o compuestos que exhiben actividad antioxidante, reductora y/o estabilizante. Entre los diferentes métodos verdes que existen, se encuentran el biológico, polisacárido, Tollens de irradiación y polioxometalatos de valencia mixta (M. Ramya & M. Sylvia Subapriya. 2012).

Dichos métodos de síntesis proporcionan ventajas sobre las metodologías químicas y físicas en términos de rentabilidad, escalabilidad, uso de agentes químicos no tóxicos y uso de presiones, temperaturas y energías de reacción bajas. Adicionalmente, la matriz de los extractos empleados en las metodologías de síntesis verde actúa en ocasiones como estabilizante, la cual disminuye la agregación de partículas metálicas sin necesidad de añadir agentes dispersantes. Además, el uso de diferentes partes de la planta permite la valorización de la biomasa en tanto puede ser considerada material de desecho proveniente de otros procesos o sub-procesos agroindustriales (Nadagouda, M.N.; et al., 2010).

Adicionalmente, para el control de microorganismos generalmente se emplean desinfectantes de amplio espectro, fungicidas y antibióticos; sin embargo, el uso no adecuado de los mismos, así como la propia capacidad de los microorganismos para desarrollar resistencia a los agentes químicos ha disminuido su eficiencia (Desselberger, U, 2000). En este sentido, el desarrollo de agentes antimicrobianos novedosos y eficientes basados en nanotecnología contra bacterias y hongos resistentes a múltiples

fármacos y desinfectantes, es una de las áreas prioritarias en la investigación actual (Rai et al., 2012).

Por ejemplo, el documento US20070218555 divulga una formulación con efecto antimicrobiano que contiene nanopartículas de plata estabilizadas con una solución acuosa de tejido vegetal, junto con excipientes adicionales como tensioactivos, conservantes, agentes reológicos, polímeros, entre otros. Adicionalmente, este documento divulga el método para obtener dicha formulación antimicrobiana.

De igual modo, el documento KR20190072716 divulga un método biológico para preparar nanopartículas de cobre o de aleación cobre-plata en estado coloidal, usando un extracto vegetal acuoso de hoja de maíz, grosella, magnolia y/o cúrcuma como agente reductor.

La patente JP2017025383 enseña una composición de nanopartículas metálicas, particularmente de oro, cobre, platino, paladio o plata y un método para su elaboración, en donde dicha formulación se usa como agente antibacteriano, antiviral, catalizador o colorante y emplea extractos alcohólicos de plantas.

Por lo tanto, persiste la necesidad de desarrollar un producto antimicrobiano eficaz y eficiente con efecto biocida de amplio espectro, que permita superar la resistencia a microorganismos que caracteriza a los productos antimicrobianos de sustancias químicas, así como la disminución en los efectos adversos que las mismas generan. Además, aún representa un desafío implementar metodologías eficientes para la obtención de nanopartículas metálicas que sean amigables con el medio ambiente para aplicaciones como agentes bioactivos.

Así entonces, la presente invención evalúa diversos extractos provenientes de varias partes de distintas plantas, con actividad reductora y de estabilización para la síntesis verde de nanopartículas metálicas y su utilización en una formulación biocida de amplio espectro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición biocida que comprende nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos obtenidas por síntesis verde. En dicha metodología de síntesis, que también es objeto de la invención, se utilizan extractos de diferentes partes de plantas como agentes reductores y estabilizantes, agua, extracto vegetal, sal precursora, tensoactivos y otros aditivos. Gracias a la composición de la presente invención, el efecto biocida proporcionado exhibe actividad antimicrobiana de amplio espectro.

Adicionalmente, se desarrolla el método para la elaboración de dichas nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos que principalmente comprende mezclar una solución de una primera sal metálica con un extracto de material vegetal particular bajo condiciones de tiempo, agitación, temperatura y pH, dejar en reposo la mezcla y tomar lecturas en el espectrofotómetro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Caracterización de la solución de nanopartículas de cobre (Cu) por Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés). Se puede evidenciar la distribución de los tamaños de partícula. **A.** Nanopartículas de cobre-plata a partir de *Passiflora ligularis*, **B.** Nanopartículas de cobre a partir de *Solanum betaceum*, **C.** Nanopartículas de cobre-plata a partir de *Cucurbita moschata*, **D.** Nanopartículas de hierro a partir de *Alibertia patinoi*, **E.** Nanopartículas de zinc a partir de *Selenicereus megalanthus*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición biocida que comprende nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos obtenidas por síntesis verde. Adicionalmente, se describe y reclama el método para la elaboración de dichas nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos.

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore una definición particular. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

Composición

La composición biocida aquí desarrollada comprende nanopartículas de metales o de óxidos metálicos y un extracto vegetal. Para efectos de la presente invención, las nanopartículas se entienden como una aglomeración de átomos metálicos de un metal reducido por acción de un extracto vegetal, pero podrían incluir otros componentes como compuestos reductores o no del mismo extracto empleado, conjugados o no con otras sustancias, provenientes de la reducción de una o varias sales metálicas, y tienen un tamaño menor a 100 nanómetros, preferiblemente entre 10 y 80 nm.

Sin constituir una limitante, el metal de las nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos se selecciona entre el grupo de metales de transición, XIII y XIV. Particularmente, el metal de las nanopartículas se selecciona, pero no se limita a, titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, itrio, circonio, niobio, molibdeno, rodio, paladio, plata, cadmio, wolframio, iridio, platino, oro, aluminio, galio, indio, estaño, platino, silicio y germanio, y mezclas de los mismos. En una modalidad específica, el metal de las nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos se selecciona entre cobre, plata, zinc, hierro y cobre-plata.

Además, las nanopartículas se encuentran en la composición biocida en una concentración entre 0,01 y 30% (p/v), preferiblemente entre 0,05% y 5% (p/v) y más preferiblemente entre 0,05 y 1% (p/v).

Por otro lado, el extracto vegetal se entiende como el producto resultante de poner en contacto cualquier parte de una planta con un solvente, por lo que dicho extracto es cualquiera de entre los componentes acuosos o no acuosos, polares o no polares o derivados de ese proceso. Este extracto debe ser filtrado o centrifugado para separar el

residuo o material, y es el que hace parte de la composición biocida en una concentración entre 0,01 y 30% (p/v), preferiblemente entre 10 y 25% (p/v).

En una modalidad preferida, los extractos de la presente invención se seleccionan del grupo que comprende, pero no se limita a, extractos de las especies vegetales *Passiflora ligularis* (granadilla), *Sambucus mexicana* (sauco), *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla), *Solanum quitoense* (lulo), *Annona cherimola* (chirimoya), *Solanum bataceum* (tomate de árbol), *Cucurbita moschata* (ahuyama), *Luffa aegyptiaca* (estropajo), *Arracacia xanthorrhiza* (arracacha), *Fragaria ananassa* (fresa), *Furcraea andina* (fique), *Alibertia patinoi* (borojó), *Pourteria sapota* (zapote), *Ficus carica* (higuera), *Passiflora quadrangularis* (badea), *Vaccinium meridionale* (agraz), *Passiflora maliformis* (cholupa), *Bactris gasipaes* (chontaduro), *Cassia grandis* (cañandonga), *Vasconcellea pubescens* (papayuela), *Melicoccus bijugatus* (mamoncillo), *Mammea americana* (mamey) o mezclas de las mismas. Más preferiblemente, los extractos de dichas especies se obtienen a partir de cualquier parte de la planta tales como hojas, tallos, semillas, flores, frutos, látex, raíces o cáscaras.

En la formulación biocida desarrollada los extractos vegetales pueden estar presentes como agentes reductores, estabilizantes o como coadyuvantes.

La composición biocida además comprende un espesante polimérico que puede ser un coloide gel y se selecciona entre, sin limitarse a, geles de celulosa, alginatos, agar-agar, carragenanos, pectinas, goma xantana, grenetina y polivinilpirrolidona, y en donde los geles de celulosa se seleccionan entre carboximetilcelulosa, hidropropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. En una modalidad preferida, el espesante polimérico es hidroxipropilcelulosa. La concentración del espesante polimérico en la composición biocida se encuentra entre 0,05 y 5% (p/v) y preferiblemente entre 0,2 y 0,9% (p/v).

La composición biocida además comprende uno o más tensoactivos, los cuales pueden ser aniónicos, no iónicos, catiónicos y/o anfotéricos y sin limitarse, se seleccionan entre polisorbato 80, polisorbato 20, glutaraldehído, amonios cuaternarios de segunda

generación y lauril éster sulfato de sodio. El uno o más tensioactivos se encuentran en una concentración entre 0,05 y 30% (p/v) en la composición biocida, preferiblemente entre 3 y 6% (p/v).

Para elaborar la composición biocida se mezclan las nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos, secas o en solución con los extractos, en donde adicionalmente se pueden incorporar otros elementos opcionales como los tensioactivos y espesantes poliméricos en una matriz líquida que puede ser agua, metanol, etanol, glicerol, polietilenglicol, entre otros, y sus mezclas.

En una modalidad preferida la composición biocida de la presente invención comprende una concentración de nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos entre 0,01 y 30 % (p/v); tensoactivos entre 0,05 y 30 % (p/v); espesante polimérico entre 0,05 y 5 % (p/v); extracto vegetal entre 0,01 y 30 % (p/v) y aditivos 0,5 y 2 % (p/v), en una matriz acuosa.

La composición biocida puede presentarse en forma líquida o gel, la cual puede ser aplicada directamente o en dilución con agua, etanol u otros solventes y soluciones. Además, la composición tiene actividad microbiocida contra *Escherichia Coli, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus Aureus, Desulfotomaculum Nigrificans, Candida Albicans, Aspergillus Niger y Flavivirus del dengue*, mostrando una efectividad mayor al 95%.

Método de elaboración in situ de nanopartículas

El presente desarrollo también se dirige al método de elaboración *in situ* de nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas, que comprende mezclar extractos provenientes de diversas partes de plantas con poder reductor/antioxidante y una o varias sales metálicas.

Particularmente, el método de elaboración de las nanopartículas es un método de síntesis verde en donde las nanopartículas se producen *in situ* y comprende

a) mezclar un espesante polimérico en una concentración entre 0,05 y 5 % (p/v), una solución de una primera sal metálica en una concentración entre 0,05 M y 10 M y un extracto de un material vegetal en una relación volumétrica de la primera sal metálica:extracto entre 2:1 y 10:1, durante al menos 2 horas, una agitación de al menos 800 rpm, a una temperatura entre 25 y 100°C y un pH entre 4 y 12;

b) dejar en reposo la mezcla de la etapa a) por al menos 2 horas a temperatura ambiente (25°C) y sin agitación;

c) tomar lecturas de la mezcla en un espectrofotómetro al finalizar la etapa b), hasta que la absorbancia no muestre variación;

en donde la variación se entiende como un cambio de ±5% de la absorbancia al principio del proceso de nucleación, es decir, al iniciar la etapa b).

En una modalidad particular, el material vegetal del extracto se selecciona entre el grupo que consiste de *Passiflora ligularis, Sambucus mexicana, Selenicereus megalanthus, Solanum quitoense, Annona cherimola, Solanum bataceum, Cucurbita moschata, Luffa aegyptiaca, Arracacia xanthorrhiza, Fragaria ananassa, Furcraea andina, Alibertia patinoi, Pourteria sapota, Ficus carica, Passiflora quadrangularis, Vaccinium meridionale, Passiflora maliformis, Bactris gasipaes, Cassia grandis, Vasconcellea pubescens, Melicoccus bijugatus* y *Mammea americana*. Adicionalmente, dicho material vegetal sufre un tratamiento previo que comprende el secado al aire libre, en secadora o en cuarto oscuro, y su posterior trituración o molienda, con el fin de obtener la mayor superficie de contacto y, finalmente se tamiza. Para la extracción de los compuestos reductores/antioxidantes y la preparación del extracto, se mezcla el material vegetal triturado y tamizado con solventes adecuados en una relación determinada, por un tiempo, temperatura y/o agitación particular.

En una modalidad, el espesante polimérico puede ser un coloide gel y se selecciona entre, sin limitarse a, geles de celulosa, alginatos, agar-agar, carragenanos, pectinas, goma xantana, grenetina y polivinilpirrolidona, y en donde los geles de celulosa se seleccionan entre carboximetilcelulosa, hidropropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. En una modalidad preferida, el espesante polimérico es polivinilpirrolidona. La concentración del espesante polimérico

en la composición biocida se encuentra entre 0,05 y 5% (p/v) y preferiblemente entre 0,05 y 0,6% (p/v).

En una modalidad preferida, los solventes utilizados en la preparación del extracto vegetal se seleccionan entre agua, metanol, etanol, propanol, butanol, acetato de etilo y sus mezclas, más preferiblemente un extracto acuoso y/o etanólico. La temperatura del proceso de extracción puede estar entre 20°C y 130°C, preferiblemente entre 25°C y 60°C y el pH de extracción puede estar entre 3 y 10, preferiblemente entre 4 y 7.

El extracto vegetal actuará como la disolución del agente reductor y/o estabilizante en la síntesis de las nanopartículas metálicas.

En otra modalidad de la invención, se adiciona una segunda sal de metal en la mezcla de la etapa a), en donde una primera sal de metal puede mezclarse con el extracto de planta en un primer momento, y una segunda sal de metal puede mezclarse en un segundo momento después de un periodo de tiempo. En una modalidad preferida, la primera y la segunda sal de metal pueden mezclarse con el extracto del material vegetal simultáneamente.

El metal de la primera y segunda sal metálica que se incorpora en solución al extracto se selecciona del grupo de metales de transición, XIII y XIV. Preferiblemente, y sin ser una limitante, dicho metal puede ser titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, itrio, circonio, niobio, molibdeno, rodio, paladio, plata, cadmio, wolframio, iridio, platino, oro, aluminio, galio, indio, estaño, oro, platino, iridio, silicio, germanio y mezclas de los mismos.

Sin ser restrictivo, entre las sales inorgánicas se pueden emplear sulfatos, nitratos, cloruros, fosfatos y fluoruros, así como sales orgánicas como acetatos, citratos, oxalatos y propanoatos. Durante el proceso de síntesis, las sales se presentan en disolución en forma de iones, separando su parte metálica de la no metálica. Una sal metálica para su uso en cualquier proceso de la presente invención puede ser una sal de cualquiera de los metales anteriormente mencionados o sus mezclas y actúa como agente precursor.

En una modalidad preferida, la solución de la primera y/o segunda sal metálica se incorpora en una concentración entre 0,05M y 10M, preferiblemente entre 0,01M y 1M.

En una modalidad preferida, el extracto de un material vegetal se incorpora en una concentración entre 0,5 y 30% (p/v), preferiblemente entre 8 y 30% (p/v).

La cantidad de extracto utilizado en los procesos descritos en la presente, al igual que la cantidad de sales metálicas, es suficiente para convertir sustancialmente todos los iones de metales disueltos y/o mezclados, en nanopartículas.

En una modalidad de la invención, la solución de una primera sal metálica se mezcla con el extracto de un material vegetal en una relación volumétrica de entre 2:1 y 10:1, respectivamente. En una modalidad preferida, dicha relación volumétrica es de 5:1, respectivamente.

En otra modalidad opcional se adicionan uno o más tensioactivos al extracto del material vegetal, los cuales se seleccionan entre aniónicos, no iónicos, catiónicos y/o anfotéricos y sin limitarse, se seleccionan particularmente entre polisorbato 80, polisorbato 20, glutaraldehído, amonios cuaternarios de segunda generación y lauril éster sulfato de sodio.

El uno o más tensioactivos se encuentran en una concentración entre 0,05 y 30% (p/v), preferiblemente entre 3 y 10% (p/v).

El tiempo de reacción de la etapa a) es de al menos 2 horas, preferiblemente, 2 horas; una temperatura entre 25 y 100°C, preferiblemente entre 50 y 65°C; agitación entre 800 rpm y 3600 rpm, preferiblemente 800 rpm; y un pH que comprende el rango entre 4 y 12, preferiblemente 8 y 11.

En la etapa a) ocurre lo que para efectos de la presente invención se conoce como proceso de nucleación, que consiste en que una vez reducida la sal metálica

correspondiente al átomo metálico cerovalente, la concentración de las unidades de construcción alcanza el nivel de saturación, produciendo las primeras entidades sólidas estables actuando como centros de nucleación (partículas primarias), para así dar lugar al crecimiento continuo; este depende del suministro de átomos que se da en la reacción hasta alcanzar el equilibrio.

La etapa de nucleación debe ser corta para conseguir partículas homogéneas en forma y tamaño y esta etapa depende netamente de la relación sal/solvente, temperatura y pH, por esta razón es de principal importancia controlar estas variables.

Una vez finalizado el proceso de preparación de las nanopartículas, estas se dejan en reposo (temperatura ambiente y sin agitación) durante al menos dos horas, de acuerdo con la etapa b). En cuanto empieza el reposo se toma una muestra del sobrenadante, para medir la absorbancia inicial e identificar el proceso de nucleación. Pasadas las dos horas, se lleva la muestra al espectrofotómetro para ser analizada una muestra del sobrenadante, esta lectura en el espectro se hace durante las horas adecuadas hasta que se deje de apreciar un cambio de ± 5% en la absorbancia leída desde el principio del proceso de nucleación (formación de partículas por la unión continua de átomos). Una vez la absorbancia no muestre variación, se sabrá que la reacción ha terminado. En adelante se van a realizar lecturas diarias en el espectro para evaluar la estabilidad en el tiempo de la solución de nanopartículas.

Las nanopartículas metálicas de la presente invención obtenidas a través del método anteriormente descrito son mono o bimetálicas y comprenden el metal reducido o los óxidos de los mismos, pero podrían incluir otros componentes, por ejemplo, otros compuestos reductores o no reductores provenientes del mismo extracto de las plantas utilizadas, conjugadas o no con los metales.

En una modalidad, las nanopartículas pueden ser del metal y/o óxido de cualquiera de las sales involucradas en el proceso de la invención o sus combinaciones. Preferiblemente, la nanopartícula de metal puede ser una nanopartícula de hierro, una nanopartícula de oro, una nanopartícula de platino, una nanopartícula de cobre, una

nanopartícula de indio, una nanopartícula de plata, una nanopartícula de cualquiera de las sales involucradas en el proceso de la invención o sus combinaciones.

Las nanopartículas de metal pueden tener una valencia cero o algún estado de oxidación. Sin embargo, las nanopartículas sintetizadas mediante el método de la invención pueden tener cargas superficiales diferentes que dependen en los componentes biomoleculares del extracto que están asociados con la nanopartícula.

La utilización de extractos provenientes de distintas partes de plantas como frutas, semillas, hojas y flores, se utilizan como agentes y/o estabilizantes para la síntesis verde de nanopartículas, pero no todas las especies vegetales presentan los mismos quimiotipos: por ejemplo, hay materiales que contienen más flavonoides y ácidos fenólicos que actúan como reductores de iones metálicos. Por otro lado, se encuentran aquellas que presentan agentes estabilizantes como las ciclodextrinas, utilizadas para estabilizar nanopartículas de cobre o de plata, individuales e híbridas, además de controlar el crecimiento y estabilización de nanopartículas de la oxidación del aire.

En conclusión, la actividad que desempeña la suspensión coloidal de nanopartículas depende del quimiotipo utilizado en la síntesis.

Adicionalmente, entre los parámetros más influyentes en la síntesis de nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos se encuentran la concentración de la sal precursora, la concentración y poder reductor de los extractos, el tiempo de reacción, la agitación, la temperatura y el pH, en donde un cambio en estas variables puede afectar a la morfología de las nanopartículas de metal, lo que conllevaría cambios que pueden ser significativos en sus propiedades.

Durante el desarrollo del método de la presente invención, la suspensión coloidal de nanopartículas no era estable, pues a medida que pasaba el tiempo se generaban dos fases, lo cual era un indicio de formación de micropartículas durante la síntesis. En este sentido, se variaron los rangos de las variables que afectaban la síntesis de las nanopartículas, a saber:

- Temperatura: además de la estabilización de la suspensión coloidal, esta variable aumenta la velocidad de reacción, generando más o menos nanopartículas en un tiempo de reacción determinado.
- pH: además de la estabilización de la suspensión coloidal, el pH del medio de reacción juega un papel importante durante la formación de nanopartículas, pues con rangos adecuados mejoran la capacidad reductora y estabilizadora de los compuestos antioxidantes en el extracto, además de presentar más o menos absorbancia, lo que va ligado con la concentración de nanopartículas.
- Concentración de sal: además de la estabilización de la suspensión coloidal, la concentración de sal puede acarrear un aumento en los tamaños de partícula de las nanopartículas, debido a la aglomeración de dichos átomos y de esta manera se pueden generar micropartículas, en lugar de nanopartículas.

Adicionalmente, el método de síntesis verde de nanopartículas que desarrolla la presente invención permite la eliminación de etapas conocidas por el estado de la técnica, como por ejemplo la centrifugación. Debido al uso de polímero en la composición biocida y el control de las variables adecuadas en el proceso de síntesis verde de las nanopartículas empleadas, no se genera una separación en dos fases de la suspensión de nanopartículas, como se observaba previamente al terminar la reacción por lo que era necesario el proceso de centrifugación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de nanopartículas metálicas de cobre-plata (Cu-Ag) a partir de Passiflora ligularis

Se empleó como agente precursor la sal metálica $CuSO_4.5H_2O$ (sulfato de cobre pentahidratado) y como agente reductor el extracto de las hojas de la especie *Passiflora ligularis*.

Para la preparación del extracto, se realizó un pretratamiento sobre la hoja de *Passiflora ligularis*, en el cual la hoja se secó por 7 días en cuarto oscuro. Después se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula menor a 0,358 mm. Se agregó agua desionizada en una relación líquido/sólido de 2:1 (mL agua desionizada: g de hoja seca), es decir, el doble de volumen de agua desionizada por gramo de hoja seca, y se dejó reposar durante 2 horas (este proceso se denomina hinchamiento).

Después, a esta solución se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación líquido/sólido igual a 12 (mL de agua desionizada/g de hoja seca) y finalmente se ajustó el pH a 4,3 con ácido cítrico 1 M. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 h. Transcurrido el tiempo, para separar el extracto líquido del residuo sólido, se centrifugó este extracto a 3000 rpm por 2 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material vegetal no precipitado, este se filtró con un papel filtro con tamaño de poro de 4-12 µm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,05% (p/v) de polivinilpirrolidona, a continuación, se mezcló con 69,95% (p/v) de una solución de $CuSO_4.5H_2O$ a una concentración de 0,03 M y se agregó 30% (p/v) de extracto de hoja de *Passiflora ligularis* (relación volumétrica precursor: extracto de 2:1). La mezcla se realizó a una temperatura de 59 ±1 °C, pH de 9,8 ±1 y 800 rpm, permitiendo obtener una conversión del precursor del 99,17% y 7,59 g de macropartículas.

Seguidamente, la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda; este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de cobre se presenta en un rango de longitud de onda de 250 a 400 nm.

Ejemplo 2. Síntesis de nanopartículas metálicas de cobre-plata (Cu-Ag) a partir de Passiflora ligularis

Se llevó a cabo un procedimiento similar al del Ejemplo 1 empleando como agente precursor la sal metálica $CuSO_4.5H_2O$ (sulfato de cobre pentahidratado) y adicionalmente $AgNO_3$ (nitrato de plata), y como agente reductor el extracto de la cáscara de fruta de la especie *Passiflora ligularis*.

Para el pre-tratamiento del material vegetal, la cáscara se secó por 7 días en cuarto oscuro. Después se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 mm. Se agregó agua desionizada en una relación líquido/sólido de 3:1 (mL agua desionizada: g de cáscara seca), es decir, el triple de volumen de agua desionizada por gramo de cáscara seca, y se dejó reposar de 2 a 3 horas (este proceso se denomina hinchamiento).

Para la preparación del extracto, se procedió a agregar agua desionizada suficiente para completar una relación líquido/sólido de 15:1 (mL de agua desionizada/g de cáscara seca) y finalmente se ajustó el pH a 5 con ácido cítrico 1 M. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se centrifugó el extracto a 2500 rpm por 5 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material vegetal no precipitado, este se filtró con un papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Finalmente, para elaborar las nanopartículas metálicas se adicionó 0,05% (p/v) de polivinilpirrolidona, a continuación, se mezcló con 69,95% (p/v) de solución de $CuSO_4.5H_2O$ a una concentración de 0,015M y 0,015M de $AgNO_3$. Se agregó 30% (p/v) de extracto de cáscara de fruta de *Passiflora ligularis*. La mezcla se agitó a una temperatura de 57°C ±1°C, pH de 10,5 ±1 y relación volumétrica precursor/extracto de 2:1, respectivamente, y agitación de 800 rpm los cuales permiten obtener una conversión del precursor del 98% y 9 g de macropartículas.

Seguido a esto, la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el

cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de cobre-plata se presenta en un rango de longitud de onda de 400 a 500 nm.

Ejemplo 3. Síntesis de nanopartículas metálicas de cobre (Cu) a partir de Solanum betaceum

Se empleó como agente precursor la sal metálica $CuSO_4.5H_2O$ (sulfato de cobre pentahidratado) y como agente reductor el extracto de la pulpa de fruta de *Solanum betaceum*.

El pretratamiento de la pulpa de fruta *Solanum betaceum* fue molerla hasta alcanzar una consistencia de puré. Después, se secó en horno a 60°C por 24 horas, para volverla a moler en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 nm. Se agregó agua desionizada en una relación 4:1 (mL agua desionizada: g de pulpa seca) y se dejó reposar por 2-3 horas.

Posteriormente, se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación de líquido/sólido 20:1 (mL de agua desionizada: g de pulpa seca) y finalmente se ajustó el pH a 10 con NaOH. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se separó la fase sólida de la líquida por medio de centrifugación a 2500 rpm por 30 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material no precipitado, este se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,5% (p/v) de polivinilpirrolidona, a continuación, se mezcló con 81% (p/v) de una solución de $CuSO_4.5H_2O$ a una concentración de 0,015 M. Se adicionó 15,5% (p/v) de extracto de pulpa de fruta de *Solanum betaceum* y 3% (p/v) de polisorbato. Los valores óptimos de las variables de proceso para esta reacción son: temperatura de 60°C, pH 9, relación volumétrica del precursor/extracto de 5:1 y agitación de 800 rpm.

Seguidamente, la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de cobre se presenta en un rango de longitud de onda de 250 a 400nm.

Ejemplo 4. Síntesis de nanopartículas metálicas de plata (Ag) a partir de Passiflora ligularis

Se empleó como agente precursor la sal metálica Ag_2SO_4 (sulfato de plata) y como agente reductor el extracto de la cáscara de fruta de la especie *Passiflora ligularis*.

Se disminuyó el tamaño de la cáscara de la *Passiflora ligularis*. Después se secó en horno a temperatura de 60°C por 24 horas, posteriormente se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 nm. Se agregó agua desionizada en una relación 4:1 (mL agua desionizada: g de cáscara seca) y se dejó reposar por 2-3 horas.

Después, se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación de líquido/sólido 21:1 (mL de agua desionizada: g de cáscara seca) y finalmente se ajustó el pH a 7 con NaOH. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se separó la fase sólida de la líquida por medio de una centrífuga a 2500 rpm por 30 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material no precipitado, este se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,05% (p/v) de polivinilpirrolidona, a continuación, se mezcló con 81,45% (p/v) de solución de Ag_2SO_4 a una concentración de 0,01M. Se adicionaron 15,5% (p/v) de extracto de cáscara de *Passiflora ligularis* y 3% (p/v) de polisorbato. Los valores óptimos de las variables de proceso para esta reacción son: temperatura de 60°C, pH 12, relación volumétrica del precursor/extracto de 5:1 y agitación de 800 rpm.

Seguidamente la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de plata se presenta en un rango de longitud de onda de 400 a 500 nm.

Ejemplo 5. Síntesis de nanopartículas metálicas de zinc (Zn) a partir de Selenicereus megalanthus

Se empleó como agente precursor la sal metálica $ZnC_4H_6O_4$ (acetato de zinc) y como agente reductor el extracto de la pulpa de fruta de la especie *Selenicereus megalanthus*.

La pulpa de la fruta *Selenicereus megalanthus* se trituró hasta quedar en puré. Después se secó en horno a temperatura de 60°C por 24 horas, posteriormente se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 nm. Se agregó agua desionizada en una relación 4:1 (mL agua desionizada: g de pulpa seca), y se dejó reposar por 2-3 horas.

Seguidamente se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación de líquido/sólido 21:1 (mL de agua desionizada: gramos de pulpa seca) y finalmente se ajustó el pH a 7 con NaOH. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se separó la fase sólida de la líquida por medio de una centrífuga a 2500 rpm por 30 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material no precipitado, este se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,05% (p/v) de grenetina, a continuación, se mezcló con el 81,45% (p/v) de la solución de $ZnC_4H_6O_4$ a una concentración de 0,03M. Se adicionaron 15,5% (p/v) de extracto de pulpa de fruta de *Selenicereus megalanthus* y 3% (p/v) de polisorbato. Los valores óptimos de las variables de proceso

para esta reacción son: temperatura de 60°C, pH 8, relación volumétrica del precursor/extracto de 5:1 y agitación de 800 rpm.

Seguidamente la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de Zinc se presenta en un rango de longitud de onda de 250 a 350nm.

Ejemplo 6. Síntesis de nanopartículas metálicas de Cobre-Plata (Cu-Ag) a partir de Cucurbita moschata

Se empleó como agente precursor la sal metálica $CuSO_4.5H_2O$ (sulfato de cobre pentahidratado) y $AgNO_3$ (nitrato de plata) y como agente reductor el extracto de la pulpa de fruta de la especie *Cucurbita moschata*.

La pulpa de la fruta *Cucurbita moschata* se trituró hasta quedar en puré. Después se secó en horno a temperatura de 60°C por 24 horas, posteriormente se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 nm. Se agregó agua desionizada en una relación 4:1 (mL agua desionizada: g de pulpa seca), y se dejó reposar de 2-3 horas.

Seguidamente se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación de líquido/sólido 20:1 (mL de agua desionizada: gramos de pulpa seca) y finalmente se ajustó el pH a 7 con NaOH. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se separa la fase sólida de la líquida por medio de una centrífuga a 2500 rpm por 30 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material no precipitado, este se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,6% (p/v) de polivinilpirrolidona, se mezcló con 60,9% (p/v) de solución de $CuSO_4.5H_2O$ a una concentración de 0,015M y 20,5% de solución de $AgNO_3$ a una concentración de 0,015 M. Se adicionó 15% (p/v) de extracto de pulpa de *Cucurbita moschata* y 3% (p/v) de polisorbato y se agregaron a las mezclas de las sales preparadas anteriormente. Los valores óptimos de las variables de proceso para esta reacción son: temperatura de 60°C, pH 8, relación volumétrica del precursor/extracto de 4:1 y agitación de 800 rpm.

Seguidamente la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de cobre- plata se presentan en un rango de longitud de onda de 400 a 500 nm.

Ejemplo 7. Síntesis de nanopartículas metálicas de hierro (Fe) a partir de Alibertia patinoi

Se empleó como agente precursor la sal metálica $FeSO_4$ (sulfato de hierro) y como agente reductor el extracto de la pulpa de fruta de la especie *Alibertia patinoi*.

La pulpa de la fruta se trituró hasta quedar en puré. Después se secó en horno a temperatura de 60°C por 24 horas, posteriormente se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 nm. Se agregó agua desionizada en una relación 4:1 (mL agua desionizada: g de pulpa seca), y se dejó reposar por 2-3 horas.

Seguidamente se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación de líquido/sólido 20:1 (mL de agua desionizada: g de pulpa seca) y finalmente se ajustó el pH a 7 con NaOH. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se separó la fase sólida de la líquida por medio de una centrífuga a 2500 rpm por 30 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material no precipitado,

este se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,05% (p/v) de goma xantana y se mezcló con 82,05% (p/v) de una solución de $FeSO_4$ a una concentración de 0,02M. Se adicionaron 14,9% (p/v) de extracto de pulpa de fruta de *Alibertia* y 3% (p/v) de polisorbato. Los valores óptimos de las variables de proceso para esta reacción son: temperatura de 50°C, pH 8, relación volumétrica del precursor/extracto de 5:1 y agitación de 800 rpm.

Seguidamente la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de hierro se presenta en un rango de longitud de onda de 300 a 400 nm.

Ejemplo 8: Síntesis de nanopartículas metálicas de Cobre (Cu) a partir de Cucurbita moschata

Se empleó como agente precursor la sal metálica $CuSO_4.5H_2O$ (sulfato de cobre pentahidratado) y como agente reductor el extracto de la pulpa de fruta de la especie *Cucurbita moschata*.

La pulpa de la fruta *Cucurbita moschata* se trituró hasta quedar en puré. Después se secó en horno a temperatura de 60°C por 24 horas, posteriormente se molió en un molino de rodillo hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0,3 y 0,4 nm. Se agregó agua desionizada en una relación 4:1 (mL agua desionizada: g de pulpa seca), y se dejó reposar por 2-3 horas.

Seguidamente se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación de líquido/sólido 20:1 (mL de agua desionizada: gramos de pulpa seca) y finalmente se ajustó el pH a 7 con NaOH. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo, se separa la fase sólida de la líquida por medio de una centrífuga a 2500 rpm por 30 min. Se extrajo el sobrenadante y con el fin de retirar el material no precipitado, este se filtró con papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm. Finalmente, el extracto obtenido se almacenó bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se adicionó 0,05% (p/v) de polivinilpirrolidona, a continuación, se mezcló con 88,02% (p/v) de solución de $CuSO_4.5H_2O$ a una concentración de 0,01M. Se adicionaron 8,93% (p/v) de extracto de pulpa de la fruta *Cucurbita moschata* y 3% (p/v) de polisorbato. Los valores óptimos de las variables de proceso para esta reacción son: temperatura de 50°C, pH 10, relación volumétrica del precursor/extracto entre 10:1, respectivamente y agitación de 800 rpm.

Seguidamente, la solución coloidal de nanopartículas obtenida es llevada a espectrofotometría UV-Vis para realizar el barrido y obtener las absorbancias correspondientes a diferentes longitudes de onda, este proceso se realiza hasta que el cambio de absorbancia tenga un grado de incertidumbre de ±5% en el barrido de la muestra. El pico de absorbancia adecuado para las nanopartículas de cobre se presenta en un rango de longitud de onda de 250 a 400nm.

Ejemplo 9: Caracterización de la solución coloidal de nanopartículas

Existen diferentes técnicas de caracterización fisicoquímica que son de ayuda y pueden emplearse como una guía cualitativa y/o cuantitativa para la identificación y determinación de los candidatos a extractos capaces de reducir los iones metálicos provenientes de las sales metálicas que faciliten la síntesis de nanopartículas metálicas. Estas técnicas son llamadas Pruebas de Capacidad o Poder Reductor o antioxidante. Entre las más destacadas se encuentran el poder antioxidante-reductor férrico (FRAP, por sus siglas en ingles), el parámetro antioxidante de atrapamiento de radicales totales, (TRAP, por sus siglas en ingles), el ensayo de capacidad antioxidante equivalente Trollox (TEAC, por sus siglas en ingles), capacidad atrapadora del radical DPPH, capacidad atrapadora del radical ABTS, poder antioxidante por reducción del Fe (III),

entre otros. Estos métodos han sido empleados previamente para documentar el poder reductor de una diversidad de plantas, partes de plantas y productos de plantas.

La capacidad o poder de reducción de una planta puede variar según el nivel de biomoléculas antioxidantes presente. Los resultados de estas pruebas pueden cambiar según las condiciones y/o zonas de cultivo, recolección y también según la especie vegetal.

La producción de nanopartículas puede confirmarse mediante diferentes técnicas de caracterización. Cada una de ellas entrega información de vital relevancia para la invención. La producción de nanopartículas se puede confirmar mediante el análisis de la resonancia del plasmón superficial mediante el uso de un espectrofotómetro UV-Vis en un rango de 200 a 600 nm. Mediante el uso de un difractómetro de Rayos X (XDR por sus siglas en inglés), se puede determinar la valencia de las nanopartículas. La distribución de los tamaños de las nanopartículas se puede evaluar mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés). La morfología de las nanopartículas se puede determinar mediante Microscopía Óptica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) o mediante microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Para evaluar la composición de la solución obtenida se puede determinar mediante el uso de un Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés).

En este sentido, se caracterizó la solución de nanopartículas del Ejemplo 2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés). La FIG. 1A muestra la distribución de los tamaños de partícula, en donde el primer pico de la izquierda representa el 56,2% del total de nanopartículas, las cuales se encuentran con un tamaño de 11,97 ± 3,197 nm, mientras que el segundo pico muestra el 43,6% faltante que se encuentra con un tamaño de partícula de 755 nm. Con este resultado se verifica la generación de nanopartículas.

De igual modo se caracterizó la solución del Ejemplo 3. La FIG 1B muestra que el primer pico de la izquierda representa el 20,1% del total de las nanopartículas, las cuales

se encuentran con un tamaño de 10±3 nm; el segundo pico representa el 60% del total de las nanopartículas, que se encuentra con un tamaño de partícula 190 ± 3,01 nm y el último pico el cual representa el 19,9% del total de las nanopartículas, con tamaños de partícula de 730 nm.

Por otro lado, la FIG 1C muestra que toda la solución del Ejemplo 6 tiene un tamaño de nanopartícula de 46 ± 5,8 nm.

La FIG 1D muestra que la solución del Ejemplo 7 presenta 3 picos, el primer pico de la izquierda representa el 20,1% del total de las nanopartículas, las cuales se encuentran con un tamaño de 86±3 nm, el segundo pico representa el 60% del total de las nanopartículas que se encuentran con un tamaño de partícula 720 ± 2,01 nm, y el último pico el cual representa el 19,9% del total de las nanopartículas, se encuentran con tamaños de partícula de 990 ±5,02 nm.

Por último, la solución del Ejemplo 5, FIG 1E muestra que el primer pico de la izquierda representa el 15% del total de las nanopartículas, las cuales se encuentran con un tamaño de 90±4,01 nm; el segundo pico representa el 45% del total de las nanopartículas, que se encuentra con un tamaño de partícula 900 ± 2,01 nm, y el último pico representa el 40% del total de las nanopartículas, con tamaños de partículas de 7000 ±5,02 nm.

Adicionalmente se caracterizó la solución de nanopartículas obtenidas en el Ejemplo 2 por un Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés), donde se evidencia la presencia de óxidos de cobre, debido los picos en bandas entre 550 y 1083 cm^{-1} (Raul et al., 2014), y la presencia de alcoholes secundarios y polifenoles debido a los picos observados en bandas cercanas a 1375 cm^{-1} (Nasrollahzadeh, Sajadi, Rostami-Vartooni, & Hussin, 2016). Por lo tanto, se puede afirmar que la muestra contiene importante cantidad de óxidos de cobre (CuO y Cu_2O) y de compuestos orgánicos (polialcoholes y polifenoles) que pueden ayudar a estabilizar las NPs en la solución coloidal (Harne et al., 2012).

De igual modo se analizó el espectro UV-visible de las nanopartículas de cobre, plata, hierro, cobre-plata sintetizadas por extractos vegetales provenientes de la pulpa de *Solanum betaceum* con y sin tensoactivo, cáscara de *Pasiflora ligularis*, *Alibertia patinoi*, pulpa de *Selenicereus megalanthus*, *Cucurbita moschata*, en donde se evidencia la presencia de nanopartículas, ya que la absorbancia se encuentra en las diferentes longitudes de onda adecuadas para cada nanopartícula sintetizada, según los valores reportados en la literatura. Las nanopartículas de plata se encuentran entre un rango de 400 nm y 500 nm, las nanopartículas de cobre entre 250 nm y 400 nm, las de zinc entre 250 nm y 350 nm. El hecho de que las nanopartículas emitan en ese rango se debe a que el metal con valencia cero emite en los rangos especificados anteriormente.

Así mismo, las muestras de la solución coloidal de nanopartículas obtenidas en los Ejemplos 1 a 8 se analizaron por microscopio electrónico de transmisión TEM, las cuales exhibieron diferentes formas que dependieron de los parámetros que se emplearon en el método de síntesis descrito. Se pudo evidenciar que aquellas muestras que tenían un pH mayor a 10 y temperatura sobre los 50°C arrojaron formas esféricas y varillas, mientras que para un pH por debajo de este las nanopartículas tenían formas triangulares o poligonales.

Por otro lado, la influencia de la temperatura permitió obtener pequeñas variaciones en el tamaño promedio cristalino de las nanopartículas; por su parte la concentración de extracto agregado modifica el tamaño de las nanopartículas, pues a mayor extracto menor es el tamaño de las mismas.

Ejemplo 10. Composición biocida de nanopartículas de cobre

Una vez sintetizadas las nanopartículas de cobre se procede a la realización de una composición con actividad biocida. En un tanque agitado en operación discontinua, se adicionó polisorbato 20 a una concentración de 3,6% (p/v), seguido a esto, se adicionó hidropropilcelulosa al 0,2% (p/v), se inició una agitación a 1000 rpm, a continuación se ajustó el pH a 4 y se agregó lentamente 0,05% (p/v) de una solución coloidal de nanopartículas de cobre, seguidamente se adicionó 10% (p/v) de extracto vegetal de

Solanum betaceum, esta solución se mantuvo en agitación por lo menos 30 min. Finalmente, se agregó agua desionizada y se ajustó el pH a 8.

Ejemplo 11. Composición biocida de nanopartículas de cobre-plata

En un tanque agitado en operación discontinua, se adicionó glutaraldehído a una concentración de 5,6% (p/v), seguidamente se adicionó hidroxietilcelulosa al 0,2% (p/v), se inició una agitación a 1000 rpm y se fue agregando lentamente 0,05% (p/v) de la solución coloidal de nanopartículas de cobre-plata, seguidamente se adicionó 10% (p/v) de extracto vegetal de *Passiflora ligularis*.

Esta solución se mantuvo en agitación por lo menos 30 min; por último, se agregó agua desionizada y se ajustó el pH a 8.

Ejemplo 12. Composición biocida de nanopartículas de zinc

En un tanque agitado en operación discontinua, se adicionó polisorbato 80 a una concentración de 3,6% (p/v), seguidamente se adicionó hidroxietilcelulosa al 0,5% (p/v), se inició una agitación a 1000 rpm y se fue agregando lentamente 0,1% (p/v) de la solución coloidal de nanopartículas. Seguidamente se adicionó 15% (p/v) de extracto vegetal de *Selenicereus megalanthus,* esta solución se mantuvo en agitación por lo menos 30 min, por último, se agregó agua desionizada y se ajustó el pH a 8.

Ejemplo 13. Composición biocida de nanopartículas de hierro

En un tanque agitado en operación discontinua, se adicionó amonio cuaternario de quinta generación en una concentración de 3,6% (p/v), seguidamente se adicionó grenetina al 0,5% (p/v), se inició una agitación a 1000 rpm, se ajustó el pH a 4 y se fue agregando lentamente 0,8% (p/v) de la solución coloidal de nanopartículas; seguidamente se adicionó 15% (p/v) de extracto vegetal de *Alibertia patinoi.* Esta solución se debe mantener en agitación por lo menos 30 min, por último, se agregó agua desionizada y se ajustó el pH a 8.

Ejemplo 14. Actividad biocida exhibida por nanopartículas de cobre y plata

Para las nanopartículas de cobre y plata preparadas en los Ejemplos 1, 2 y 4 se llevaron a cabo pruebas microbiológicas y virucidas empleando las cepas bacterianas *Escherichia Coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus y Desulfotomaculum nigrificans*, las cepas fúngicas *Candida albicans y Aspergillus niger* y el *Flavivirus* del dengue.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

CEPA	**Resultado de cultivo $3x10^5$ (UFC)**	**MBC (µg/ml)**
Escherichia Coli	Negativo	10,5
Salmonella typhimurium	Negativo	10,5
Staphylococcus aureus	Negativo	10,5
Desulfotomaculum nigrificans	Negativo	4,25
Candida albicans	Negativo	10,5
Aspergillus niger	Negativo	10,5
Flavivirus del dengue	Negativo	----

Tabla 1. Concentración Mínima Bactericida (MBC) y actividad biocida de las nanopartículas de cobre y plata sintetizadas a partir de Passiflora ligularis

Ejemplo 15. Actividad biocida exhibida por las composiciones de nanopartículas de plata, cobre, cobre-plata y zinc

Se cuantificó la actividad biológica y efectividad de la composición biocida desarrolladas en los Ejemplos 10 a 13 en términos de la concentración mínima inhibitoria (MIC), llevando a cabo el procedimiento descrito a continuación:

Se utilizó *Escherichia coli* (ATCC® 25922), donada por la Universidad de Santander, la cual estaba suspendida en solución salina y glicerol (40%-Panreac) y preservadas a 80°C. Para su reactivación se realizaron dos pases en agar nutritivo (Merck).

Se utilizó el método estandarizado por el Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio, CLSI M07-A10. Se preparó una suspensión de bacterias de 3-5 colonias de

un cultivo fresco de microorganismo, ajustando su concentración a la turbidez 0,5 de la escala de McFarland en solución salina (0,85%); posteriormente, se realizó una dilución 1:50 y de esta 1:20 en caldo Mueller Hinton, ajustando a una concentración final de 1 o $2x10^4$ células/ml. El inóculo fue expuesto a diferentes concentraciones de las nanopartículas de cobre, plata y zinc sintetizadas en extractos vegetales por 24 horas a 35°C.

Como controles positivos se utilizó la clorhexidina como desinfectante de referencia, partiendo de una concentración del 4% (p/v) Este método permitió determinar la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento microbiano por parte de las nanopartículas metálicas, por medio de valoraciones macroscópicas de la turbidez asociada al crecimiento microbiano.

Para determinar la concentración bactericida mínima, se tomó a partir de la MIC. Se tomaron 10 µl de cada una de las concentraciones en las que se haya observado inhibición del crecimiento visible del microorganismo, posterior a esto se sembró en cajas de Petri con agar Mueller Hinton incubados a 35°C por 24 horas, considerándose como bactericida, aquella concentración en la cual se observe un número < 3 unidades formadoras de colonias (UFC).

Especie Vegetal	**Nanopartículas**	**Resultado $3x10^5$ UFC/ml**	**MIC (µg/ml)**
Solanum betaceum	Plata	Negativo	5,05 ± 0,07
	Cobre	Negativo	8,05 ± 0,02
	Cobre - plata	Negativo	6,10 ± 0,01
Passiflora ligularis	Plata	Negativo	6,05 ± 0,03
	Cobre	Negativo	9,05 ± 0,07
	Zinc	Negativo	7,10 ± 0,03
	Cobre - plata	Negativo	10,5± 0,05
Alibertia patinoi	Plata	Negativo	4,05 ± 0,04
	Cobre	Negativo	6,20 ± 0,06
	Zinc	Negativo	5,60 ± 0,08
	Cobre - plata	Negativo	5,20 ± 0,01
	Plata – zinc	Negativo	9,10 ± 0,03
Selenicereus megalanthus	Plata	Negativo	5,09 ± 0,02
	Cobre	Negativo	8,05 ± 0,05
	Zinc	Negativo	12,05 ± 0,04
	Cobre - plata	Negativo	6,10 ± 0,07

Cucurbita moschata	Plata	Negativo	5,05 ± 0,08
	Cobre	Negativo	7,05 ± 0,04
	Zinc	Negativo	6,10 ± 0,05
	Cobre - zinc	Negativo	7,05 ± 0,02
	Cobre - plata	Negativo	4,05 ± 0,04
	Plata - zinc	Negativo	6,10 ± 0,02

Tabla 2. Concentración Mínima inhibitoria (MIC) y actividad biocida de las composiciones de plata, cobre, cobre-plata y zinc

Ejemplo 16. Pruebas de efectividad de las composiciones de nanopartículas.

Para las composiciones biocidas desarrolladas en los Ejemplos 10 a 13 se realizaron pruebas de efectividad con diferentes cepas bacterianas durante un tiempo de 30 minutos de contacto entre el biocida y la cepa bacteriana. Las cepas bacterianas utilizadas en los biocidas fueron: *Escherichia Coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Desulfotomaculum nigrificans, Candida albicans, Aspergillus niger y Pseudomonas aeruginosas.*

Cepa Bacteriana	**Proporción volumétrica Cultivo: biocida**	**Resultado de cultivo $3*10^4$ UFC/ml**
Escherichia Coli	1:5	Negativo
Salmonella typhimurium	1:4	Negativo
Staphylococcus aureus	1:5	Negativo
Desulfotomaculum nigrificans	1:5	Negativo
Candida albicans	1:5	Negativo
Aspergillus niger	1:5	Negativo
Pseudpmonas aeruginosas	1:4	Negativo

Tabla 3. Actividad biocida de las composiciones de nanopartículas de cobre, plata, zinc, hierro y cobre-plata

Ejemplo 17. Actividad biocida de la composición que comprende nanopartículas de cobre en Desulfovibrio desulfuricans

Se evaluó la actividad biocida en *Desulfovibrio desulfuricans*, por el método de Time Kill Test en el medio Starkey (medio de mantenimiento). En esta metodología el agente biocida que comprende nanopartículas de cobre fue puesto en contacto con una población conocida de microorganismos por cierto tiempo a temperatura de 37˚C.

El medio Starkey es un medio de mantenimiento (usado tanto para inóculo como para dilución y medición de las muestras). La preparación del medio se llevó a cabo con la siguiente formulación:

CONTENIDO	PESO (gramos)
K_2HPO_4	0,56
NH_4Cl	1,1
$CaCl_2$	0,12
Na_2SO_4	0,56
$MgSO_4$* 7 H_20	2,2
Lactato de sodio	3,8
Extracto de levadura	0,5
Agua destilada	1000 ml

Tabla 4. Formulación del medio Starkey

Se realizó la mezcla de todos los elementos y se ajustó el pH a 7,5 ±0,2 con NaOH 1N y se calentó a 70°C.

Se dosificó en volúmenes de 9,0 ml, se introdujo una aguja sola y otra conectada al sistema de gases inyectando N_2 y desplazando el oxígeno, permitiendo así un ambiente anaerobio, posterior a esto se autoclavó a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

Posteriormente, para la preparación del inóculo se tomaron 5 ml de inóculo de las cepas ATCC *Desulfovivrio desulfuricans* en 50 ml de medio Starkey garantizando la cantidad de inóculo deseado. Se incubó por 24 horas 37ºC.

Para la evaluación del biocida, se tomó 1 ml del inóculo preparado y se adicionó en cada uno de los tubos que contenían 9 ml del medio Starkey, adicionalmente se agregó 200 ppm del biocida a evaluar y a continuación, se midió su absorbancia a 600 nm en el equipo TERMO GENESYS 5 a 0h, 2h, 4h, 24h, 36h, 72h y 192h.

Para el control positivo se empleó glutaraldehído y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la muestra.

Se registró el promedio de los recuentos microbiológicos transformados a logaritmo y se calculó la reducción logarítmica de las poblaciones para cada tiempo según la fórmula:

$$\log_{10} RL = \log_{10} 'Control\ positivo' - \log_{10} 'Biocida'$$

Exhibiendo el comportamiento demostrado en la Tabla 5

Actividad Biocida (RL) (promedio)
8,05 ± 0,07
5,32 ± 0,02
5,34 ± 0,01
6,65 ± 0,07
15,86 ± 0,33
5,31 ± 0,03
3,67 ± 0,05

Tabla 5. Actividad biocida exhibida por el biocida con composición de nanopartículas de cobre

De los resultados obtenidos en los Ejemplos 15 a 17, se evidencia que la actividad biocida exhibida por las composiciones de la presente invención ante diferentes cepas presenta un recuento bacteriano de manera consistente por debajo de 3 UFC/ml. Esto se evidencia en las tablas presentadas anteriormente ya que todos los recuentos de cultivos en escalas de $3*10^5$ arrojan resultados negativos, esto significa por debajo de este número de colonias no hay crecimiento bacteriano. De igual manera las pruebas realizadas con la solución coloidal de nanopartículas del Ejemplo 14, presentan inhibición de las cepas valoradas.

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) confirman la capacidad que poseen los diferentes extractos vegetales estudiados, como agentes reductores para la síntesis de nanopartículas metálicas y bimetálicas.

Finalmente se puede apreciar que la adición de diferentes aditivos como los espesantes poliméricos y tensoactivos ayudan a la estabilidad de la solución coloidal de nanopartículas, esto se evidencia mediante las lecturas periódicas de absorbancias, además de presenciarlo de manera cualitativa ya que sólo se observa la presencia de una fase.

Adicionalmente, la composición biocida del presente desarrollo permite el máximo aprovechamiento de los extractos vegetales pues actúan en la composición como agentes estabilizantes que funcionalizan las nanopartículas, ubicándose en su superficie como un tipo de recubrimiento estabilizante, que permite que las nanopartículas no se aglomeren y así evitar la formación de partículas. De igual modo, el uso de tensioactivos en la composición permite el control del tamaño de las nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos. El control de la morfología de las nanopartículas en la composición biocida del desarrollo es importante, ya que de esta depende las propiedades que pueden tener las composiciones como lo son catalíticas, ópticas, fotónicas, químicas y biológicas además de biocidas.

Por otro lado, los Ejemplos 1 a 8 permiten evidenciar que hubo una reducción considerable en los tiempos normales de síntesis de nanopartículas conocidos por una persona versada en la materia del 25%, además los pH empleados para llevar a cabo la reacción corresponden con valores más básicos de 8 y 12, además de la incorporación de polímero ya que este ayuda en la disminución de aglomerados lo cual es favorable para diferentes propiedades como tamaño, estabilidad y actividad biocida.