

**DETERMINACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE LA PROPIEDAD ANTI-
MICROBIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON
EXTRACTOS FRUTALES PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE
BOLIVAR**

ANA MARIA NARANJO HERRERA

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2015

**DETERMINACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE LA PROPIEDAD ANTI-
MICROBIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON
EXTRACTOS FRUTALES PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE
BOLIVAR**

ANA MARIA NARANJO HERRERA

Para optar por el título de Ingeniera Ambiental

Director:

PhD. SANDRA NATALIA CORREA TORRES

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2015

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Piedecuesta, Febrero 27 de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todos los beneficios, aciertos y tropiezos que he tenido en mi vida.

A mi familia, quienes son mí fortaleza y siempre me apoyaron, guiaron, acompañaron, brindaron y sostuvieron todo mi proceso de aprendizaje.

A Fredy Giovany Osorio Gutiérrez por apoyarme en cada momento y ayudarme en cada dificultad.

A Sandra Natalia Correa quien fue mi directora, y a Adriana Herrera (de la Universidad de Cartagena), por guiarme en el desarrollo de mi proyecto.

A las docentes Claudia Santoyo y María Kopytko quienes me acompañaron y orientarme en mi proceso final, brindándome siempre sus mejores consejos sin recibir nada a cambio.

Al docente Uriel Mora Cruz por su colaboración y orientación en el desarrollo del proyecto.

A los docentes que me formaron, no solo en el área de desarrollo del proyecto de grado, sino en todo momento, pues de ellos aprendí la disciplina y fundamentos teóricos para desarrollarme en la vida laboral.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO	1
GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 CONCEPTUALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	5
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	6
2.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	7
2.3.1 Método biológico para síntesis de nanopartículas.....	7
2.3.1.1 Morfología y taxonomía de las plantas implementadas.....	9
2.4 COMPUESTOS ORGÁNICOS PRESENTES EN EL MATERIAL VEGETAL	12
2.4.1 Características de los compuestos orgánicos bioreductores de nanopartículas	12
2.4.1.1 Flavonoides	12
2.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE EXTRACTOS DE PLANTAS	13
2.5.1 Extracción líquido-líquido.....	13
2.5.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) ...	14
2.5.3 Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD)	15
2.5.4 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	16
2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS ..	17
2.6.1 Espectrofotometría UV-Vis	17
3. METODOLOGÍA	19
3.1 FASE I. Selección del material vegetal y Síntesis de nanopartículas.....	20
3.1.1 Sección A. Selección del material vegetal	20
3.1.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)	21
3.1.2 Sección B. Síntesis de nanopartículas de oro	24
3.1.2.1 Identificación de la formación de las nanopartículas de oro.....	25
3.2 FASE II. Análisis de la propiedad antimicrobial de las nanopartículas.....	26
3.2.1 Medio de cultivo modificado.....	27

3.2.2	Sembrado en superficie	28
3.2.3	Prueba de difusión por disco.....	29
3.3	FASE III. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	FASE I. Sección del material vegetal y Síntesis de nanopartículas	32
4.1.1	Sección A. Selección de material vegetal	32
4.1.1.1	Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS).....	32
4.1.1.2	cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD)	42
4.1.1.3	Análisis de infrarrojo para extractos de material vegetal	44
4.1.2	Sección B. Análisis de la síntesis de nanopartículas de oro	49
4.2.1.1	Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Guayaba.....	51
4.2.1.2	Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Guanábana	52
4.2.1.3	Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Tamarindo	53
4.2.1.4	Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Mango.....	54
4.2	FASE II. Análisis de la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro	55
4.2.1	Análisis de la propiedad anti-microbial por medio de cultivo modificado .	56
4.2.2	Análisis de la propiedad antimicrobial por medio del Sembrado de Superficie	58
4.2.3	Análisis de la propiedad antimicrobial por medio de la Prueba de difusión por disco.....	60
4.3	FASE III. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro	65
5.	CONCLUSIONES	81
6.	RECOMENDACIONES	83
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	84

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Pérdida post-cosecha de frutas en la región del Bolívar.....	9
Tabla 2. Morfología y taxonomía de las plantas.	10
Tabla 3. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Mango.....	34
Tabla 4. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de cascaras de Mango.....	35
Tabla 5. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de cascara de Guanábana.....	36
Tabla 6. Identificación tentativa y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Guanábana.	37
Tabla 7. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de cascara de Tamarindo.	38
Tabla 8. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Tamarindo.	39
Tabla 9. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Guayaba.....	40
Tabla 10. Porcentaje total de compuestos orgánicos con anillos bencénicos en cada extracto de material vegetal.	41
Tabla 11. Compuestos flavonoides identificados por medio de HPLC/DAD.....	43
Tabla 12. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Mango.	46
Tabla 13. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Guanábana.....	46
Tabla 14. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Tamarindo.	47
Tabla 15. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Guayaba.....	48

Tabla 16. Longitud de onda máxima de nanopartículas de oro sintetizadas por extractos vegetales.	55
Tabla 17. Resultados de crecimiento microbiano de los medios A y B en el medio de cultivo modificado.	58
Tabla 17. Resultados de crecimiento microbiano de los medios A y B en la prueba de sembrado en superficie.....	59
Tabla 19. Posibles bacterias presentes en los resultados de las pruebas antimicrobiales para las nanopartículas de oro.....	63
Tabla 20. Posibles hongos presentes en los resultados de las pruebas antimicrobiales para las nanopartículas de oro.	64
Tabla 21. Usos y beneficios de las películas como materiales de empaque.....	70
Tabla 22. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro en empaques elaborados con polímeros sintéticos.	77
Tabla 23. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro en empaques elaborados con biopolímeros.	78
Tabla 24. Aplicabilidad de las nanopartículas – Estudios y situación ambiental....	79

LISTADO DE ESQUEMAS

Esquema 1. Metodología del proyecto.....	20
Esquema 2. Metodología - Extracción líquido-líquido.	22
Esquema 3. Metodología – Síntesis de nanopartículas de oro.	25
Esquema 4. Metodología – Determinación de la propiedad anti-microbial.	27
Esquema 5. Metodología – Medio de cultivo modificado.	28
Esquema 6. Metodología – Sembrado en superficie.....	29
Esquema 7. Metodología – Prueba de difusión por disco	31

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Nanopartículas metálicas observadas por un microscopio electrónico a A) 50 nm y B) 10 nm.....	5
Figura 2. Formación de nanopartículas de oro (Síntesis). (Kumar, et al., 2013).....	8
Figura 3. Estructura química de flavonoides.	13
Figura 4. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de Masas (GC/MS).....	14
Figura 5. Equipo para análisis de cromatografía líquida de alta eficacia.	15
Figura 6. Espectro electromagnético. (Cortés, J., 2006)	16
Figura 7. Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-Vis). Universidad Pontificia Bolivariana.	18
Figura 8. Cromatograma de la muestra de hojas de Mango (CG/MS) obtenidas en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.....	33
Figura 9. Cromatograma de la muestra de hojas de Mango (HPLC/DAD) obtenidas en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.	43
Figura 10. FTIR de extracto concentrado de hojas de Mango. Equipo de Infrarrojo (FTIR), Universidad de Cartagena.	45
Figura 11. A) AuNPs Guayaba; B) AuNPs Guanábana; C) AuNPs Tamarindo; D) AuNPs Mango.....	50
Figura 12. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Guayaba.....	51
Figura 13. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Guanábana.....	52
Figura 14. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Tamarindo.	53
Figura 15. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Mango.	54
Figura 16. Blanco representativo incubado a 37°C por 48 horas.....	56

Figura 17. Crecimiento de microorganismo del medio de cultivo modificado de la solución de AuNPs provenientes del extracto de Tamarindo incubado a 37°C por 48 horas, A) con 0,5 mL; B) con 1 mL.	57
Figura 18. Crecimiento de microorganismo del medio de cultivo modificado de la solución de AuNPs provenientes del extracto de Mango incubado a 37°C por 48 horas, A) con 0,5 mL; B) con 1 mL.	57
Figura 19. Sembrado en superficie con 1 ml de la solución de nanopartículas de oro proveniente del extracto de A) Tamarindo y B) Mango.....	59
Figura 20. Blanco representativo para la prueba de difusión por disco incubado a 37°C por 24 horas.....	60
Figura 21. Prueba de difusión por disco A) Tamarindo y B) Mango.....	61

GLOSARIO

AuNPs: Nanopartículas de oro.

ASOHOFRUCOL: Asociación Hortifruticola de Colombia.

HAuCl₄: Ácido cloroáurico.

HPLC: Líquido de alta resolución para cromatografía (High-performance liquid chromatography).

NPs: Nanopartículas.

PFN: Plan Frutícula Naracinal.

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: DETERMINACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE LA PROPIEDAD ANTI-MICROBIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON EXTRACTOS FRUTALES PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE BOLIVAR

AUTOR(ES): ANA MARIA NARANJO HERRERA

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): SANDRA NATALIA CORREA TORRES

RESUMEN

En la presente investigación se realizó la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) mediante extractos naturales elaborados con las hojas de los árboles de Guayaba, Guanábana, Tamarindo y Mango a temperatura ambiente, partiendo de soluciones diluidas de ácido cloroáurico (HAuCl₄) como precursor, con una concentración de 0,27mM. A los extractos naturales se les realizó una extracción líquido-líquido (ELL) para determinar los flavonoides, terpenos y grupos funcionales que permiten la formación de nanopartículas. Los resultados de esta extracción fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (GC/MS) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) e Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). La formación de las nanopartículas de Au fue verificada en un espectrofotómetro UV-Vis, el cual evidencio que los extractos de todas las hojas de las plantas presentan propiedades adecuadas para sintetizar AuNPs. La propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro sintetizadas se determinó con los extractos de hojas de Tamarindo y Mango por medio de tres métodos: la modificación del medio de cultivo, sembrado en superficie y prueba de difusión por disco. Adicionalmente, se determinó la aplicabilidad que estas nanopartículas de oro pueden presentar de acuerdo a su propiedad antimicrobial basándose en referencias bibliográficas. Su aplicabilidad de enfocó únicamente en la implementación de nanopartículas de oro en empaques de alimentos elaborados con biopolímeros y polímeros.

PALABRAS CLAVES:

Nanopartículas, agente reductor, síntesis, propiedad antimicrobial, empaques de alimentos.

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: DETERMINATION OF THE APPLICABILITY OF ANTIMICRIBIAL PROPERTY OF GOLD NANOPARTICLES SYNTHESIZED WITH FRUIT EXTRACTS OF THE DEPARTAMENT OF BOLIVAR.

AUTHOR(S): ANA MARIA NARANJO HERRERA

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: SANDRA NATALIA CORREA TORRES

ABSTRACT

In this research Gold nanoparticle synthesizing (NPs) was made by natural extracts, from tree leaves of Guava, Soursop, Tamarind and Mango at environment temperature, starting from diluted solutions of chloroauric acid (HAuCl₄) as the precursor, with a concentration of 0,27 mM. It was made an extraction liquid-liquid (ELL) to the natural extracts to determinate the flavonoids, terpenes and functional groups which allows nanoparticle formation. The results of this extraction were analyzed by gas chromatography teamed with mass spectroscopy (GC/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier transform infrared (FTIR). The Au nanoparticle formation was verified by UV- vis spectrophotometer, which showed that all four leaves extracts present proper characteristics for synthesizing AuNPs. It was determined the anti-microbial proprieties of the synthetized Gold nanoparticles with the Tamarind and Mango leaves by three different methodologies: breeding environment modification, surface seeding and disc diffusion test. Finally, it was determined the application of this Gold nanoparticles can have by their anti-microbial propriety based on bibliography references. It was only focused in the Gold nanoparticles implementation on food packaging made of polymers and biopolymers.

KEYWORDS:

Nanoparticles, reducing agent, synthesis, anti-microbial property, food packaging.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el diseño, elaboración e implementación de nanopartículas de oro ha presentado un aumento significativo a nivel global, con el fin de satisfacer las diferentes necesidades en los campos de la bioingeniería, biomédica, seguridad alimenticia y desarrollo sostenible (Arizaga, N., Ibarz, G., Piñol, R., 2010).

Para la implementación de nano-partículas metálicas es necesario realizar procedimientos que permitan sintetizarlas para ser incorporadas a los diferentes campos de desarrollo. Los procedimientos actuales que permiten la elaboración de nanomateriales son clasificados en cuatro categorías: procedimientos mecánicos, físicos, químicos y biológicos (Flores-González, M., Villabuena-Ibáñez, M., and Bazzi, R., 2009; Sastry et al., 2003).

La síntesis de nanopartículas de oro por medio de método biológico se realiza a partir de sales precursoras de los metales en conjunto con microorganismos, plantas enteras, tejidos de plantas y frutas, extractos de plantas y algas marinas (Bar et al., 2009; Dhillon et al, 2012.; Duran y Seabra, 2012; Luangpipat et al, 2011; Shankar et al., 2004; Rajesh et al, 2012).

El método de síntesis biológica, el cual se implementó en esta investigación es favorable para el ambiente debido que no genera impactos negativos y residuos peligrosos en comparación con los métodos mecánicos, químicos y físicos (Anastas y Zimmerman, 2007; Dahl et al., 2007; Shankar et al., 2004. Además es un método efectivo y menos costoso para la obtención de nanopartículas (Iravani 2011).

En el presente trabajo, para la síntesis de nanopartículas de oro se implementaron extractos de hojas de plantas provenientes de árboles frutales de Tamarindo,

Guanábana, Mango y Guayaba del departamento de Bolívar. La selección de las plantas para el proyecto se basó en la información sobre el desarrollo de la agricultura de la región y cómo se ve afectado el aprovechamiento de éstas, debido a que algunas plantas de esta región presentan porcentajes de pérdidas, según la secretaria de agricultura y el Plan Frutícola Nacional (PFN). Considerando lo anterior se plantea una alternativa para el aprovechamiento del material vegetal desperdiciado.

Las nanopartículas de oro, así como las de plata, presentan la propiedad antimicrobial (Huang et. al, 2007). Estas nanopartículas metálicas han tenido diversas aplicaciones, por ejemplo en biomédica donde se usan como agentes de contraste para visualización y detección de tumores cancerígenos; en aplicaciones biológicas se usan las nanopartículas como agentes antimicrobiales; en empaques activos de alimentos y así también en el diseño de biosensores para detección de contaminantes tóxicos como pesticidas (Arizaga, N., Ibarz, G., Piñol, R. 2010; Barrera, C., Herrera, A., Rinaldi. C. 2009).

En el presente proyecto, se verificó primero la presencia de compuestos bioreductores y sus grupos funcionales por medio de las técnicas de FTIR, GC/MS, y HPLC. Posteriormente se realizó la síntesis de nanopartículas de oro con extractos naturales de las hojas de los árboles seleccionados de la región de Bolívar. Finalmente se verificó cualitativamente la propiedad anti-microbial de las nanopartículas de oro obtenidas con el fin de llegar a ser incorporadas en empaques de alimentos como agente inhibidor del crecimiento microbiano. En adición se planteó la aplicabilidad de las nanopartículas sintetizadas a partir de extractos vegetales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CONCEPTUALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Una nanopartícula es una partícula con por lo menos una dimensión menor de 100 nm. Dependiendo de su composición se pueden clasificar en carbonosas, metálicas, cerámicas y poliméricas. Las nanopartículas metálicas exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Entre ellas encontramos quantum dots (puntos cuánticos o transistores de un solo electrón) o nanopartículas de metales nobles como oro, plata o de metales reactivos como el dióxido de titanio, entre otras. La **figura 1** expone una imagen donde se evidencian nanopartículas metálicas, con una coloración negra, observadas por medio de un microscopio electrónico.

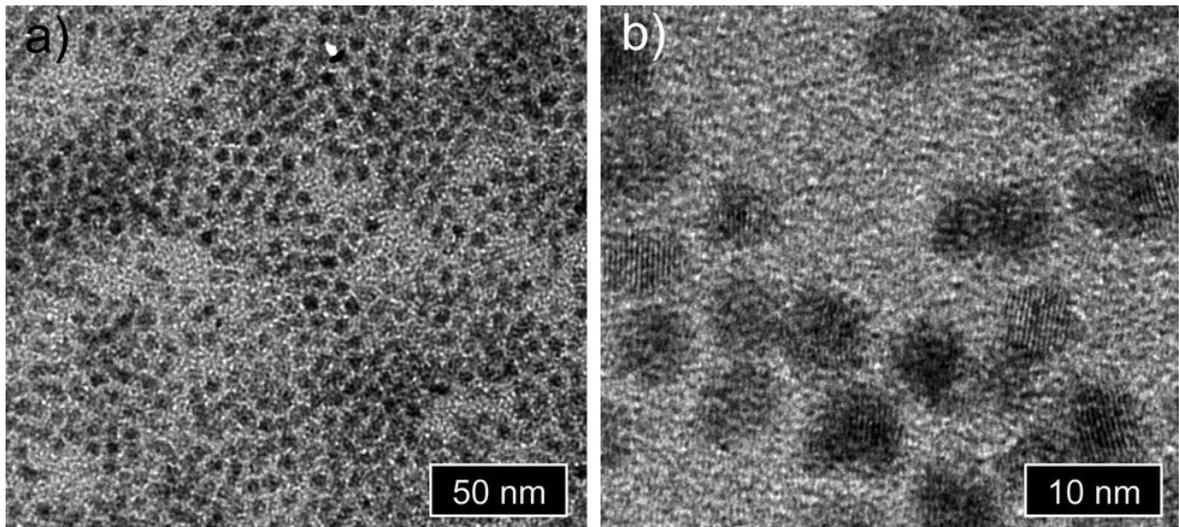


Figura 1. Nanopartículas metálicas observadas por un microscopio electrónico a A) 50 nm y B) 10 nm.

Fuente: <http://bit.ly/1A2KmqM>

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de metales nobles y específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden ser producidas en distintos tamaños (hasta 100 nm) y formas. Pueden ser fácilmente funcionales en un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, entre otros). Todo esto hace que las AuNPs despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario (Mateo, D., et al., 2013).

Las nanopartículas de oro presentan una baja toxicidad y propiedades modificables, con la finalidad de obtener nano-sistemas óptimos para distintas aplicaciones.

Estas nanopartículas presentan propiedades fototérmicas y ópticas, las cuales provienen de las oscilaciones de sus electrones libres en presencia de luz, lo cual favorece a la nanopartícula a la hora de irradiarla. El efecto de las AuNPs de emitir un intenso calor cuando son calentadas o iluminadas con una frecuencia onda de luz en el rango visible, ha abierto grandes expectativas en la liberación de moléculas activas en lugares específicos del organismo, en la destrucción de bacterias y virus y en la desnaturalización de proteínas.

Estas AuNPs tienen aplicaciones terapéuticas, en la cual se ve involucrada la *terapia génica*, una novedosa técnica para el tratamiento de diversas enfermedades genéticas o adquiridas, el cual tiene resultados prometedores en la cura de ciertos cánceres. Las AuNPs pueden mejorar la estabilidad de ADN, ya que la hidrofobicidad de las nano-partículas maximiza la eficiencia de la transfección y minimiza la toxicidad.

Las AuNPs pueden ser detectadas en muestras biológicas y tejidos por medio de diferentes técnicas: microscopia electrónica de campo oscuro, microscopia

electrónica de láser de barrido (MEB), ultravioleta visible (UV-Vis), tomografía óptica, espectroscopia Raman y rayos X entre otros. (Al-qadi 2009).

2.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Los procedimientos actuales que permiten la elaboración de nanomateriales son clasificados en cuatro categorías: procedimientos mecánicos, físicos, químicos y biológicos (González et al., 2009; Aguilar, M. 2009). En el presente trabajo se elaboró la síntesis de nanopartículas a partir de extractos vegetales.

2.3.1 Método biológico para síntesis de nanopartículas

La síntesis biológica de nanomateriales ha sido una buena opción para la obtención de dichos materiales, ya que estos resultan ser más amigables con el medio ambiente. En la biosíntesis se involucran: levaduras, extractos de plantas o microorganismos como las bacterias y hongos; los cuales logran la reducción de varios tipo de iones metálicos (Sastry et al., 2003).

Los organismos vivos pueden llegar a producir nanopartículas intra o extracelular, siendo ésta última la más implementada por los investigadores debido su bajo costo y por ser más adaptable (Basavaraja et al., 2008).

El empleo de extractos de plantas como agentes reductores, pueden llegar a ser una vía más rápida que la implementación de microorganismos para la preparación de nanopartículas. De acuerdo con Narayanan y Sakthivel (2008), es posible obtener AuNPs en un tiempo de 12 horas a partir de hojas de cilantro (Aguilar, M. 2009). Entre los agentes reductores obtenidos a partir de las plantas están: terpenos, flavonoides, enzimas, proteínas y cofactores.

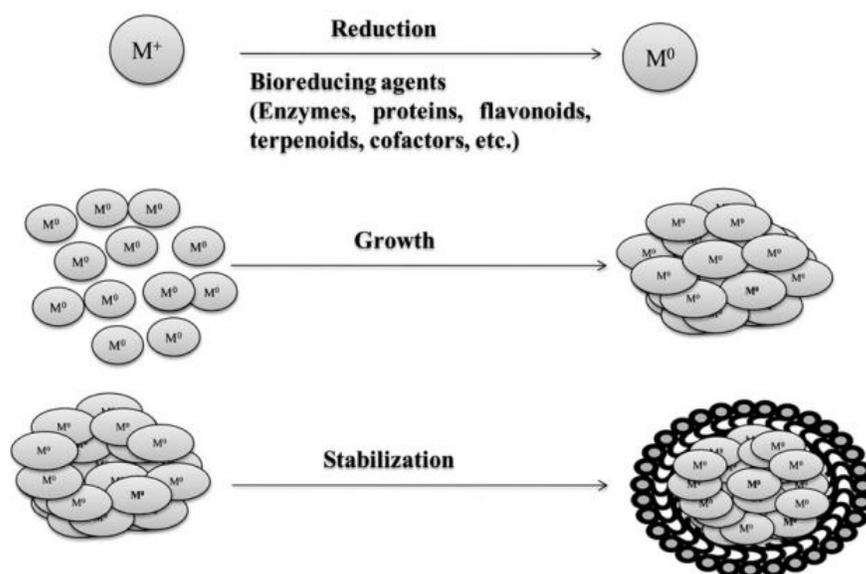


Figura 2. Formación de nanopartículas de oro (Síntesis). (Kumar, et al., 2013).

La **figura 2** ilustra el proceso de síntesis de nanopartículas metálicas. Iniciando por su estado iónico pasando a un estado metálico con ayuda de bioreductores como las enzimas, proteínas, flavonoides, terpenos y cofactores entre otros. Posteriormente el crecimiento de esas partículas en estado metálico (aflomeración) hasta llegar a un estado estable.

En el proyecto se realizó la selección de los extractos de material vegetal que fueron implementados en la síntesis de nanopartículas de oro, se utilizaron las plantas provenientes del departamento de Bolívar, debido a que presentan un alto porcentaje de pérdida de material vegetal. La **tabla 1** expone los porcentajes relacionados con la pérdida después de la cosecha de acuerdo a la especie (frutas), donde se evidencia que la Guayaba y el Mango tienen un porcentaje del 26 y 23 respectivamente.

Tabla 1. Pérdida post-cosecha de frutas en la región del Bolívar.

ESPECIE	PERDIDA (%)
Aguacate*	30
Guayaba**	26
Mango**	23
Maracuyá*	20
Naranja**	35
Piña*	20

Fuente: *Datos obtenidos directamente con los productores.

** URPA. Secretaria de agricultura. Medio magnético.

2.3.1.1 Morfología y taxonomía de las plantas implementadas

La **tabla 2** ilustra la morfología y taxonomía referente a las plantas implementadas para la elaboración de los extractos que fueron utilizados en la síntesis de nanopartículas de oro.

Tabla 2. Morfología y taxonomía de las plantas.

ESPECIE	MORFOLOGÍA	TAXONOMÍA	
		Nombre y Familia	Género y Especie
Tamarindo	<u>Hojas</u> : alternas compuestas (paripinnadas), estipuladas, folios opuestos con margen entero y pecíolo muy corto.	<i>Tamarindus indica</i> L.	<i>Tamarindus</i> .
	<u>Flores</u> : dispuestas en racimos terminales y pendulares; cáliz, membranoso, corola amarilla con cinco pétalos, tres de ellos de mayor tamaño y nervado.	<i>Caesalpiniaceae</i> .	<i>Indica</i> L.
Mango	<u>Hojas</u> : Alternas, espaciadas irregularmente a lo largo de las ramitas, de pecíolo largo o corto, Oblongo lanceoladas, lisas en ambas superficies, de color verde oscuro brillante en el haz y de color verde - amarillento en el envés..	<i>Mangifera indica</i> L.	<i>Mangifera</i> .
	<u>Flores</u> : Polígamas, formadas en las cimas densas o en la últimas ramitas de la inflorescencia y son de color verde – amarillento. <u>Fruto</u> : Drupa carnosa que puede contener uno o más embriones, posee un mesocarpo comestible de diferente grosor según los cultivadores y las condiciones de cultivo.	<i>Anacardiaceae</i> .	<i>Hilacha</i> .
Guayaba	<u>Hojas</u> : Alternas, biseriadas, de pecíolo corto con base cuneiforme, bordes lisos, de color verde oscuro brillante y olor fuerte	<i>Annona Muricata</i> L.	<i>Annona</i> .
	<u>Flores</u> : Poseen 6 pétalos en posición alterna	<i>Annonaceae</i> .	<i>A. Muricata</i> .

y 3 sépalos verde oscuros.

Frutos: Son bayas acorazadas o irregulares de color mate que mide entre 13 y 45 cm de largo y 22 cm de diámetro. De pulpa blanca, color blanco cremoso. Semillas numerosas.

Guanábana

Hojas: Se forman en pares, opuestas, simples, coriáceas, color verde pálido, de forma alargada elíptica a ovalada, de 5 – 15 cm de longitud por 8 de ancho;

Flores: Se forman en las ramas más jóvenes de 1 – 3 por nudo, son blancas de 5 pétalos y con numerosas estambres.

Frutos: Rodeados de 4 – 12 cm de longitud y de 4 – 7 cm de diámetro. Pulpa blanda, jugosa, cremosa con gran cantidad de semillas de constitución leñosa y dura.

Psidium Guajava L.

Psidium.

Myrtaceae.

Palmira ICA-1.

Fuente: Asociación Hortifrutícola de Colombia (ASOHOFRUCOL).

2.4 COMPUESTOS ORGÁNICOS PRESENTES EN EL MATERIAL VEGETAL

Los compuestos orgánicos son sustancias químicas que contienen carbono, los cuales forman enlaces covalentes carbono-carbono y/o carbono-hidrógeno. Pueden tener presencia de oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, boro, halógenos y otros elementos, también llamados moléculas orgánicas. (Curtin., H, 2004).

2.4.1 Características de los compuestos orgánicos bioreductores de nanopartículas

Los principales compuestos orgánicos, favorables para la síntesis de nanopartículas de oro son los flavonoides, terpenos, compuestos orgánicos con anillos bencénicos y diferentes grupos funcionales, debido a que actúan como agentes reductores en la formación de las nanopartículas de oro (AuNPs) (Huang et al., 2007; Sathishkumar et al., 2009; Alí., et al. 2011; Muthuvel, A., 2014; Nazeruddin., 2014; Martínez, A., 2005).

2.4.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales, los cuales se encuentran en vegetales, protegen el organismo de agentes oxidantes que se puedan presentar como lo son rayos ultra violeta (UV), son sustancias químicas que se encuentran en alimentos; el ser humano no es capaz de producir dichas sustancias, por tal motivo las debe obtener por medio de alimentos o suplementos dietarios. Compuestos descubiertos por el premio nobel Szent-Gyorgy; los flavonoides se denominan como vitamina P por su permeabilidad y Vitamina C por tener propiedades similares a ésta. Los flavonoides en su estructura presentan grupos hidroxilo fenólicos y una capacidad antioxidante.

Los flavonoides están presentes en frutas, verduras, semillas, y flores, por tal motivo desempeñan un papel y propósito fundamental en la biología vegetal.

Estos tienen una importante y gran capacidad para fija metales como el hierro y el cobre.

Los flavonoides se encuentran principalmente en las hojas y el exterior de las plantas o frutas. (Martinez, S., et al., 2002). La **Figura 3** muestra la es estructura química de los flavonoides.

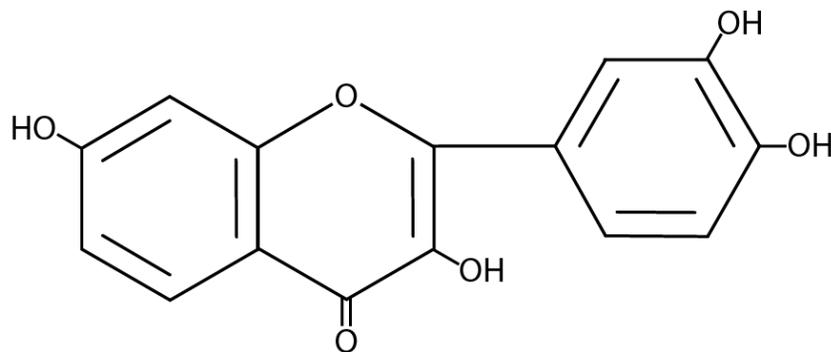


Figura 3. Estructura química de flavonoides.

Fuente: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f7/Fisetin_\(flavonoide\).gif](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f7/Fisetin_(flavonoide).gif)

Para determinar los compuestos orgánicos y grupos funcionales presentes en las plantas de Tamarindo, Guayaba, Mango y Guanábana se les realizó una extracción líquido-líquido.

2.5 TÉCNICAS DE ANALISIS DE EXTRACTOS DE PLANTAS

2.5.1 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es un proceso utilizado para la separación de componentes en una solución. En esta separación se evidencian dos fases inmiscibles líquidas. Este proceso también se conoce como simplemente extracción líquida o extracción con solvente. La extracción líquido-líquido implica la transferencia de masa de una fase líquida en una segunda fase inmiscible líquida, el proceso puede ser realizado de muchos modos diferentes. En el presente

proyecto se utilizó agua-etanol grado HPLC para realizar la extracción (Treybal, R., 1988).

Para la caracterización e identificación de los compuestos y grupos funcionales presentes en los extractos de material vegetal, se realizó un análisis de cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficacia e infrarrojo (FTIR).

2.5.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)

La cromatografía es un método físico de separación de componentes, donde cada componente se distribuye entre dos fases, una de ellas se encuentra en reposo (fase estacionaria), mientras que la otra presenta movimientos en una dirección definida (Fase móvil). En el proceso cromatográfico se basa en el movimiento de los componentes de una mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo de la fase estacionaria, lo cual produce la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla que se analiza en la fase estacionaria y móvil (Zerbini, E., 1999). La **figura 4** ilustra el equipo con el cual se realiza el análisis de cromatografía de gases.



Figura 4. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de Masas (GC/MS).

Fuente: <http://bit.ly/1KumHTe>

2.5.3 Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD)

La cromatografía líquida de alta eficacia se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En esta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analito) en la corriente de la fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

- Aplicaciones principales: Técnica de separación para los materiales más volátiles; análisis cuantitativo de multicomponentes.
- Fenómeno molecular: Reparto entre una solución líquida y un substrato.
- Ventajas en el análisis cualitativo: Separa materiales para su examen por medio de otras técnicas.
- Ventajas en el análisis cuantitativo: Aplicación amplia a los materiales menos volátiles, análisis de multicomponentes.
- Muestra promedio deseable: 10 mg
- Limitaciones del método: Se tarda en desarrollar el método
- Limitaciones para la muestra: Ninguna. En La **figura 5** ilustra el equipo con el cual se realiza el análisis de cromatografía líquida de alta eficacia.



Figura 5. Equipo para análisis de cromatografía líquida de alta eficacia.

Fuente: <http://bit.ly/1C7kt8D>

2.5.4 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo (espectroscopia IV) es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. La **figura 1** muestra el espectro electromagnético que se puede presentar en una lectura de una muestra específica, siendo el rango de todas las radiaciones electromagnéticas posibles. El espectro de un objeto es la distribución característica de la radiación electromagnética.

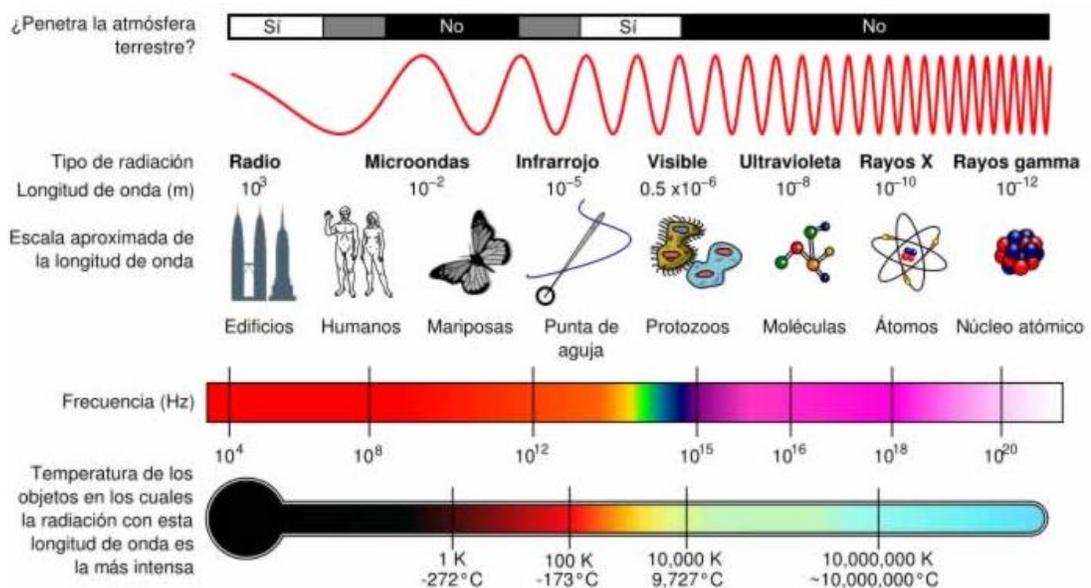


Figura 6. Espectro electromagnético. (Cortés, J., 2006)

La técnica de espectroscopia infrarroja puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. La espectroscopia de infrarrojo puede brindar información acerca de los grupos funcionales de moléculas de estructura desconocida como aldehídos, cetonas, anillos aromáticos, alcoholes, aminas alcanos y alquenos entre otros. La espectroscopia infrarroja es ampliamente usada en investigación y en la industria y confiable práctica para realizar mediciones, control de calidad y mediciones dinámicas.

2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La identificación de la formación de nanopartículas de oro se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis.

2.6.1 Espectrofotometría UV-Vis

El estudio a nivel de cualquier molécula requiere la implementación de técnicas analíticas las cuales permitan una determinación cualitativa y cuantitativa como lo son la caracterización físico-química y biológica. En método de espectrofotometría UV-vis se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en soluciones y en muestras biológicas, utilizando reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar, el cual forma un producto coloreado que permite detectarlo. Las moléculas a analizar deben presentar una capacidad para absorber radiación. Las longitudes de onda que puedan llegar a ser adsorbidas por las partículas dependen de las condiciones del medio como el pH, temperatura, fuerza iónica, y su constante dieléctrica.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Por tal motivo el espectro de adsorción es el fenómeno que presenta una molécula al ser sometida a diferentes longitudes de onda (Aguilar, M. 2009). La **figura 7** ilustra el equipo con el cual fueron realizadas las lecturas de muestra de las soluciones de nanopartículas de oro obtenidas después de su síntesis.

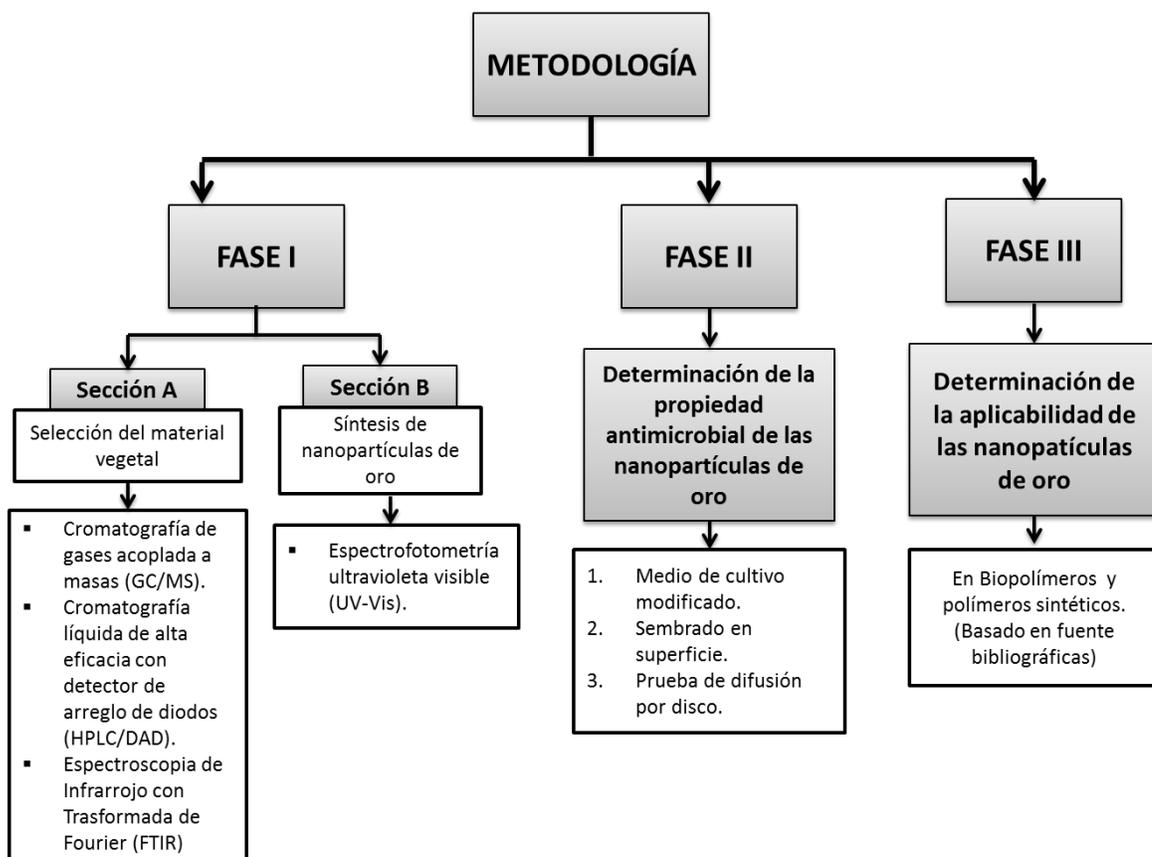


Figura 7. Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-Vis). Universidad Pontificia Bolivariana.

3. METODOLOGÍA

Este proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de Análisis Químico, Microbiología, Agua Residual y Suelos de la Facultad de Ingeniería Ambiental, en colaboración con el laboratorio de Química General de ciencias básicas de la Universidad Pontificia Bolivariana con sede en la ciudad de Bucaramanga.

La presente metodología se desarrollará en tres fases principales. El **esquema 1** expone los pasos a seguir para el desarrollo de los tres objetivos planteados en el proyecto. La **fase I** ilustra la metodología relacionada con el desarrollo del primer objetivo. Esta fase está dividida en dos secciones, la **sección A** se relaciona con la selección del material vegetal de árboles frutales provenientes del departamento de Bolívar y la **sección B** con la síntesis de nanopartículas de oro a partir de los extractos de material vegetal seleccionado. La **fase II** expone las metodologías realizadas para verificar la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro sintetizadas. La **fase III** se enfoca en la aplicabilidad de las nanopartículas de oro en empaques de alimentos respecto a su propiedad antimicrobial, basándose en referencias bibliográficas.



Esquema 1. Metodología para la determinación de la aplicabilidad antimicrobial de las nanopartículas de oro.

3.1 FASE I. Selección del material vegetal y Síntesis de nanopartículas

3.1.1 Sección A. Selección del material vegetal

La selección del material vegetal se basó principalmente en una extracción líquido-líquido. Los resultados de la extracción fueron analizados por medio de cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS), cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) e infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) con el fin de determinar los agentes bioreductores

como flavonoides, terpenos, compuestos fenólicos o con anillos aromáticos y grupos funcionales.

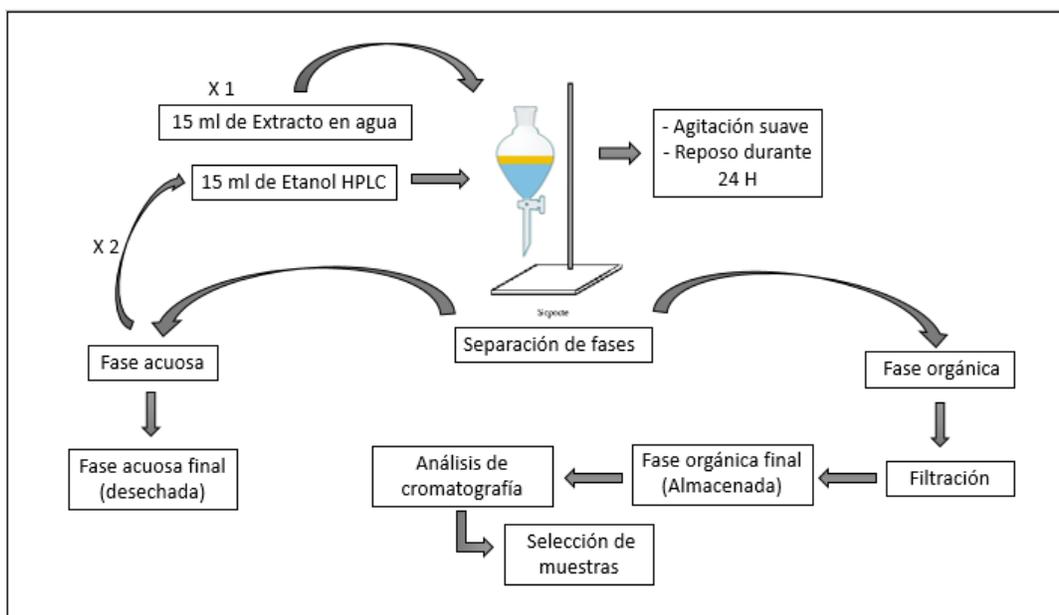
3.1.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)

Para el desarrollo de la investigación se recibieron inicialmente seis muestras provenientes del departamento de Bolívar. Las cuales eran extractos en agua de las hojas y cascaras de los árboles de Tamarindo, Guanábana, Guayaba y Mango, con un volumen aproximado de 50 mL.

Se realizó una extracción líquido-líquido a los extractos en agua de las hojas y cascaras de Tamarindo, Guanábana, Guayaba y Mango, esta metodología se llevó a cabo en la cámara extractora de gases del laboratorio de agua residual, con el fin de separar la fase acuosa de la fase orgánica por medio de Etanol grado HPLC.

Para llevar a cabo el procedimiento, se adicionaron 15 ml del extracto natural con 15 ml de Etanol a un embudo de decantación, se agito suavemente y se dejó reposar 24 horas. La fase orgánica fue retirada, filtrada y almacenada en un tubo de ensayo con tapa; se practicó el mismo procedimiento a la fase acuosa sobrante por segunda vez. La fase orgánica obtenida en su totalidad fue rotoevaporada para ser llevada a analizar al laboratorio de cromatografía para determinar la presencia de compuestos orgánicos de interés (flavonoides y compuestos orgánicos agentes reductores)

Posterior a los resultados obtenidos de los análisis de cromatografía, se seleccionó el material vegetal de trabajo para la síntesis de nanopartículas de oro. La metodología de la ELL fue presentada en el **esquema 2**.



Esquema 2. Metodología - Extracción líquido-líquido.

De acuerdo a la mayor cantidad de compuestos orgánicos, como Flavonoides, Terpenos, compuestos aromático y/o Grupos funcionales presentes en los extractos en agua de los árboles de Tamarindo, Guanábana, Guayaba y Mango, se seleccionó el material vegetal adecuado para la síntesis de nanopartículas de oro. Debido a que los compuestos presentes en el extracto de plantas son responsables de la estabilización de nanopartículas y la biorreducción de iones metálicos (Sathishkumar et al., 2009). Esta selección se basó en los resultados obtenidos del análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS), cromatografía líquida de alta eficacia con detecto de arreglo de diodos (HPLC/DAD). Posterior a la selección de material vegetal basándose en los resultados de los análisis de cromatografía, se corroboró la presencia de grupos funcionales en el material vegetal seleccionado por medio de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Los dos primeros realizados en el laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS) y el último por el

laboratorio Química de la Universidad de Cartagena. Los tres análisis se realizaron de la siguiente manera:

- El análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS) se realizó en un cromatógrafo de gases *AT6890 Serie Plus* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent Technologies*, MSD 5975 *Inert XL*) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). La columna empleada en el análisis fue CB-5MS (*J & W Scientific*, CA, EE.UU) [5%-fenilpoli(dimetilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0,25 μ m]. La inyección se realizó en modo *Split* (30:1), $V_{iny} = 2 \mu$ L. La identificación de los compuestos registrados en las muestras, se estableció con base en sus espectros de masas (EI, 70Ev), usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NISTOS.
- En el análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector de arreglo de diodos se utilizaron las xantinas cafeína (Pat N° C8960-250G, *Sigma-Aldrich*), teobromina (Pat N° T4500-25G, *Sigma-Aldrich*) y teofilina (Pat N° T1633-25G, *Sigma-Aldrich*); las catequinas (\pm)-catequina (C) (Pat N° C1788-500MG, *Sigma-Aldrich*), (-) epigallocatequina galato (EGCG) (Pat N° E4143-50MG, *Sigma-Aldrich*), (-)-epicatequina (EC) (Pat N° E1753-1G, *Sigma-Aldrich*), (-)-epicatequina galato (ECG) (Pat N° E3893-10MG, *Sigma-Aldrich*), (-)-epigallocatequina (EGC) (Pat N° E3768-5MG, *Sigma-Aldrich*); los flavonoides ácido caféico (Pat N° C0625, *Sigma-Aldrich*), ácido *p*-cumárico (Pat N° C9008, *Sigma-Aldrich*), ácido rosmarínico (Pat N° 536954-5G, *Sigma-Aldrich*).

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido (LC) Agilent Technologies 1200 Series (Palo Alto, California, EE.UU.) con detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) a $\lambda = 245$ nm. La columna empleada en el análisis fue

KIETEX (C18) (Phenomenex), 100 nm x 4.6 nm (d.i) x 2.6 μm (tamaño de película). La inyección se realizó en modo automático ($V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$).

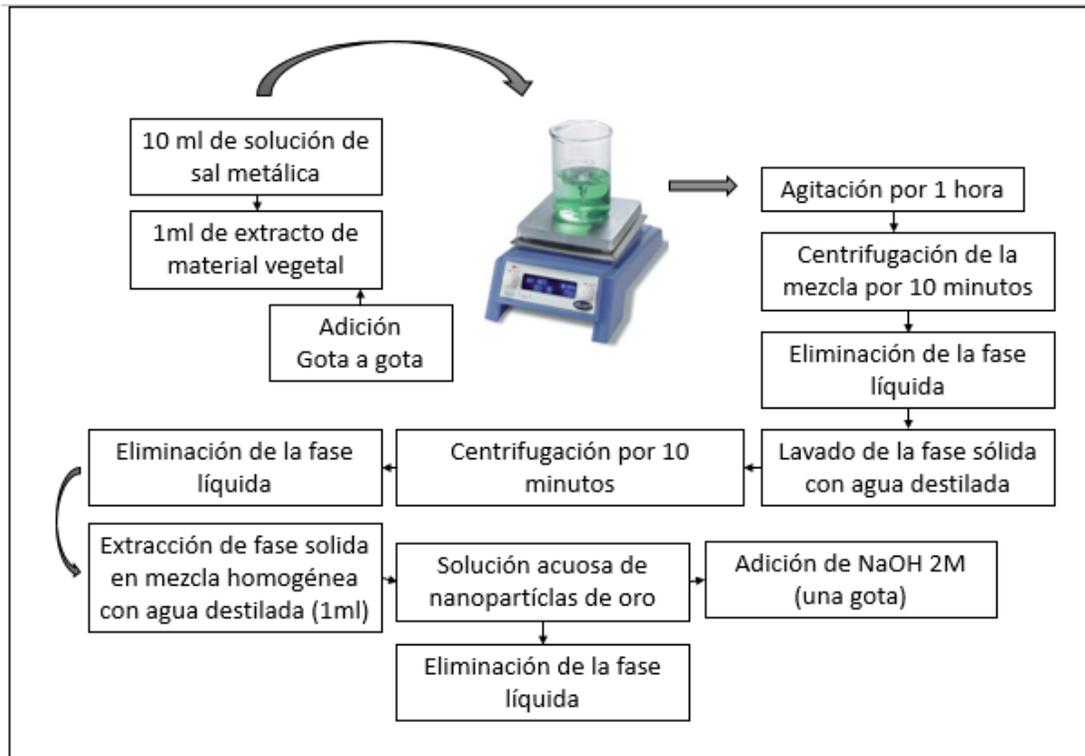
- El análisis de infrarrojo con Transformada de Fourier se realizó con el fin de identificar los diferentes grupos funcionales presentes en las muestras de las hojas de los árboles de Tamarindo, Guanábana, Mango y Guayaba (Chithrani et al., 2006). Los compuestos como los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{COOH}$ en biomoléculas como los aromáticos o polifenoles atribuye el poder reductor de iones metálicos en métodos biosintéticos, como ha sido previamente sugerido por Huang et al (2007) y Sathishkumar et al., (2009).

3.1.2 Sección B. Síntesis de nanopartículas de oro

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo a temperatura ambiente en el laboratorio de suelos. Para este procedimiento las nanopartículas de oro fueron sintetizadas por el método de G.M. Nazeruddin et al. (2014), con algunas modificaciones. Este método es sencillo y relativamente rápido, donde se utilizó el agitador magnético, la centrifugadora, los extractos de material vegetal, la solución de la sal precursora de nanopartículas (Ácido cloroáurico - HAuCl_4) con una concentración de 0.27mM y la solución del Hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración de 2M.

Para el desarrollo de la metodología se adicionaron 10 ml de la solución de sal metálica Ácido cloroáurico (HAuCl_4) en un vaso de precipitado, el cual se encontraba en el agitador magnético; 1 ml del extracto de material vegetal fue adicionado gota a gota, la mezcla se agitó durante una hora a 1000 rpm. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a una velocidad de 5000 rpm, el material sedimentado (nanopartículas de oro) fue lavado con agua destilada y nuevamente centrifugado. Se extrae el material sólido con 2 ml de agua destilada para generar

una solución homogénea de nanopartículas de oro; se adiciona 1 gota de Hidróxido de sodio (NaOH 2M) a la solución final para mantener el pH entre 10 – 12. En **esquema 3** se presenta la metodología realizada sobre la síntesis de nanopartículas de oro con extractos naturales.



Esquema 3. Metodología – Síntesis de nanopartículas de oro.

Después de realizar la metodología para la síntesis de nanopartículas de oro, se verifico su formación por medio de espectrofotometría UV-Vis.

3.1.2.1 Identificación de la formación de las nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas se caracterizan generalmente por su tamaño, forma, superficie, área de la cara, y dispersión (Jiang et al., 2009). Para la caracterización de las nanopartículas de oro sintetizadas se implementó el espectrofotometría UV-

visible, siendo una técnica de uso común (Pal et al., 2007), la cual realiza mediciones de absorción en los intervalos de longitud de onda de 500 - 550 nm para la lectura de estas nanopartícula de oro (Shankar et al., 2004).

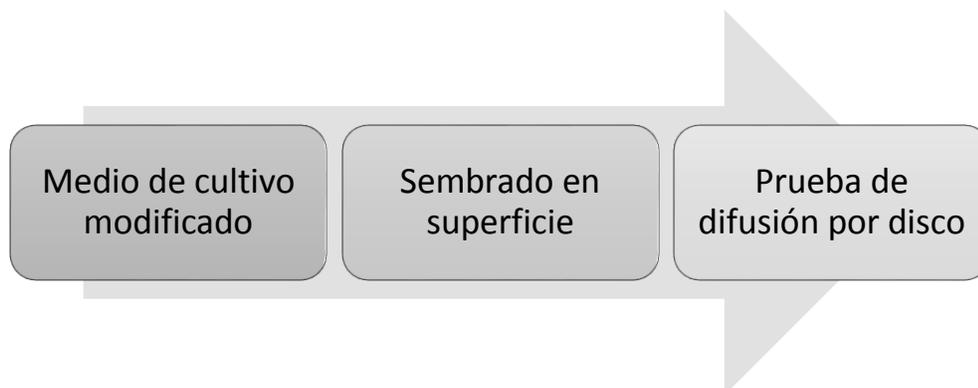
Para la determinación de la formación de las nanopartículas de oro, inicialmente se sometió la solución de nanopartículas de oro al ultrasonido durante 5 minutos, posteriormente, las soluciones de nanopartículas se analizaron en el UV-VIS, verificando la longitud de onda y la absorbancia.

3.2 FASE II. Análisis de la propiedad antimicrobial de las nanoparticulas

El desarrollo de esta metodología se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga.

Con base a los resultados obtenidos por el espectrofotómetro UV-Vis de las muestras leídas anteriormente, se decidió determinar la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro sintetizadas con los extractos de Tamarindo y Mango.

Para determinar la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro se llevaron a cabo tres (3) tipos de metodologías, para las cuales se elaboraron medios de cultivo en cajas Petri con agar nutritivo *MERCK*, con el fin de favorecer el crecimiento tanto de hongos como el de las bacterias. El **esquema 4** presenta las metodologías realizadas para esta fase.

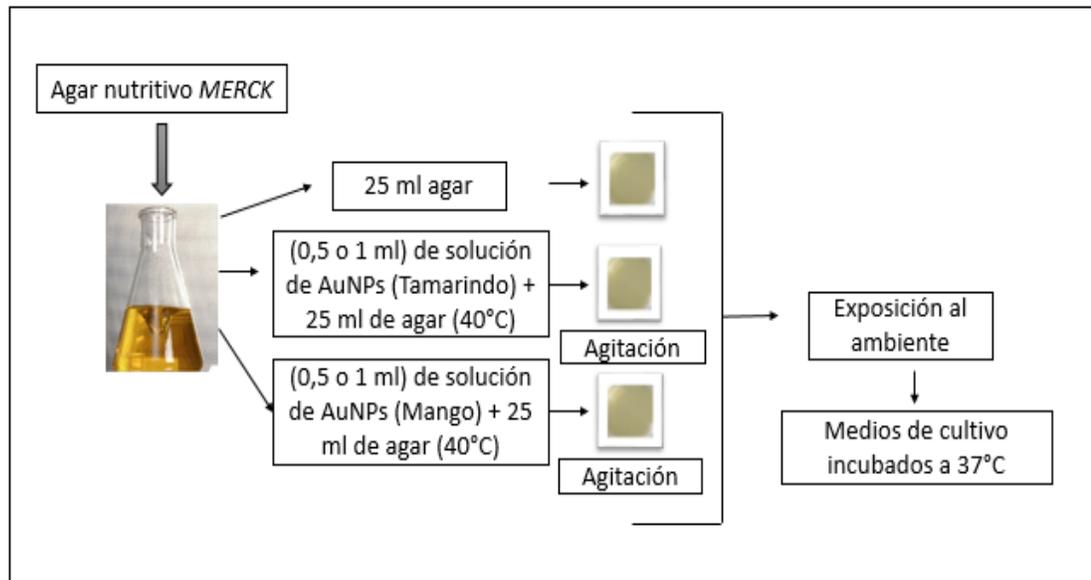


Esquema 4. Metodología – Determinación de la propiedad anti-microbial.

3.2.1 Medio de cultivo modificado

Para la determinación de la propiedad anti-microbial se realizó un medio modificado, el cual consiste en incorporar la solución de nanopartículas de oro, sintetizadas con los extractos de Tamarindo y Mango, en el medio de cultivo de Agar nutritivo.

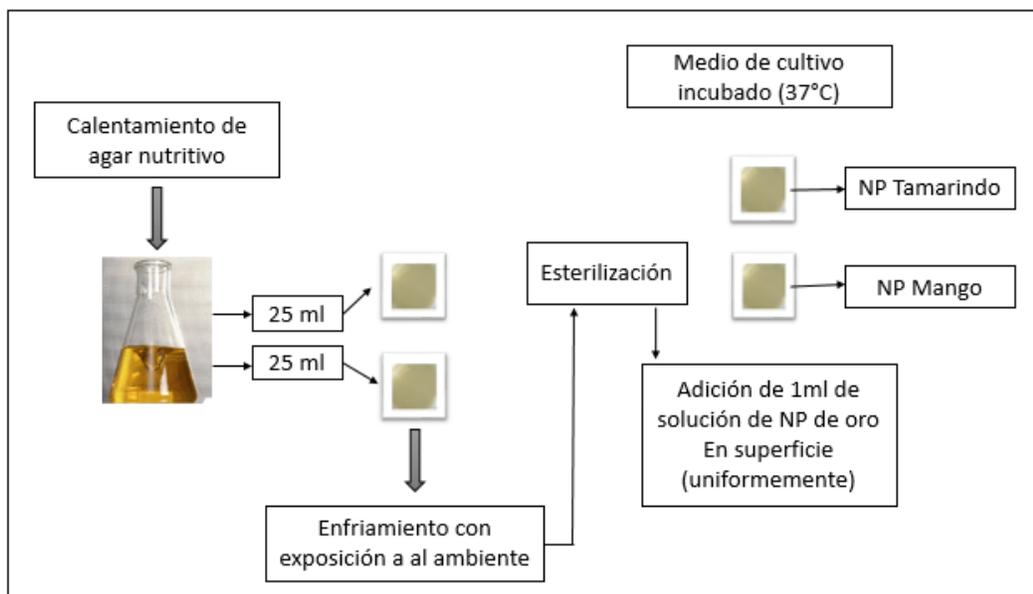
Inicialmente se estableció un blanco, el cual no contiene la solución de nanopartículas. Para la elaboración de los medios modificados, se adicionaron 0,5 ml de la solución de nanopartículas de oro a 25 ml del medio de cultivo, cuando este presentara una temperatura de 40°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los medios listos, antes de ser incubados son destapados para ser expuestos al entorno durante 2 minutos, con el fin de adquirir microorganismos del ambiente lo cual simularía la exposición que tendría los empaques de alimentos con el medio. Posteriormente se llevó a la incubadora a una temperatura de 37°C por 48 horas. Después de los resultados, se procedió a realizar la misma metodología modificando el volumen de la solución de nanopartículas a 1 ml como se muestra en el **esquema 5**.



Esquema 5. Metodología – Medio de cultivo modificado.

3.2.2 Sembrado en superficie

Se realizó el sembrado en superficie posteriormente a los resultados obtenidos del medio de cultivo modificado. Para este procedimiento se esterilizaron en autoclave por 80 min a 120 °C el medio de cultivo sólido agar nutritivo *MERCK*, después se vertieron 25 ml del medio sólido en cada caja Petri hasta solidificar. Posteriormente, se adiciono 1 ml de la solución de nanopartículas de oro en la superficie esparcida uniformemente con un rastrillo de vidrio, posteriormente se expuso al entorno con el fin de adquirir microorganismos del ambiente, lo cual simularía la exposición que tendría los empaques de alimentos. Por último se incubó por 48 horas a una temperatura de 37°C. El **esquema 6** ilustra la metodología implementada para este análisis.



Esquema 6. Metodología – Sembrado en superficie

3.2.3 Prueba de difusión por disco

El tipo de cepa de bacterias para desarrollar este procedimiento se obtuvieron de los procedimientos anteriores, con el fin de comprobar la actividad anti-microbial, el crecimiento e inhibición. Posteriormente se realizó la prueba de difusión por disco, procedimiento el cual se basó en el estudio de BauerKirby adoptados, el cual fue adoptado por El Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) (OPdl., 2010). A continuación se muestra el procedimiento realizado.

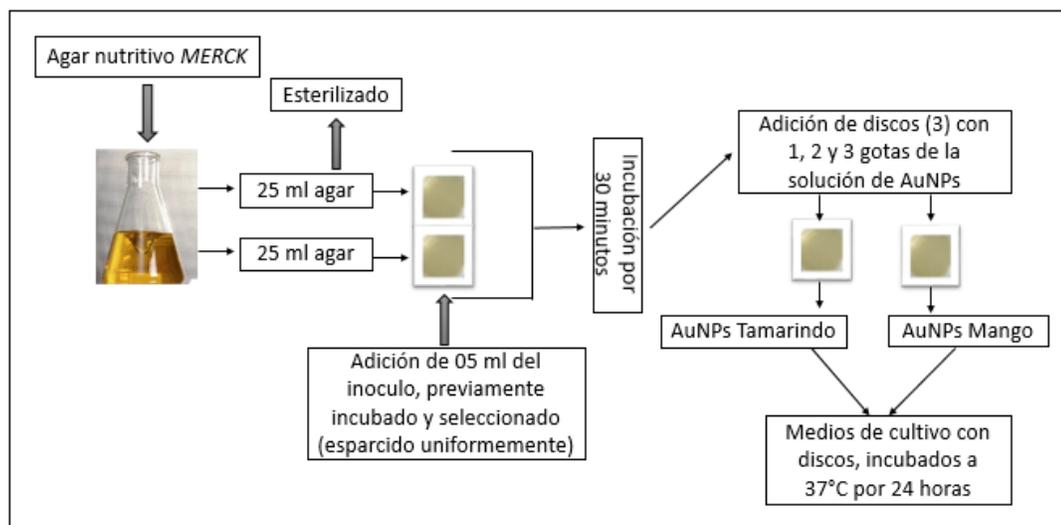
1. Seleccionar las colonias
2. Preparar una suspensión del inóculo
3. Estandarizar la suspensión del inóculo
4. Inocular la placa
5. Colocar discos de antimicrobiano
6. Incubar la placa
7. Medir las zonas de inhibición e interpretar los resultados

Fueron utilizadas cinco (5) tipo de colonias obtenidas en procedimientos anteriores y se preparó el medio sólido para el cultivo celular. Posteriormente los medios se esterilizaron en autoclave por 80 min a 120 °C. El medio sólido constaba de agar nutritivo *MERCK* el cual presentaba un pH de 6.9. Después de esterilizado se vertieron 25 ml del medio solido en cada caja Petri.

Se inoculó 1 ml de las cinco (5) colonias escogidas en una solución salina al 0.89% durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Después, se esparció uniformemente 0,5 ml del inoculo bacteriano en la superficie de las cajas Petri utilizando un rastrillo de vidrio estéril y se incubó por 30 minutos. Se colocaron los discos de papel filtro previamente humedecido con la solución de nanopartículas de oro dentro de la caja de Petri. Este procedimiento se realizó tanto para la solución de nanopartículas de oro de sintetizadas con extracto de las hojas de tamarindo como de las hojas de mango.

Para éste análisis, se colocaron en las cajas Petri tres (3) discos de papel filtro previamente humedecidos con 1, 2 y 3 gotas respectivamente de la solución de nanopartículas de oro (Tamarindo y Mango).

Las cajas Petri con sus respectivos discos, al igual que en las metodologías anteriores, se expusieron al entorno con el fin de adquirir microorganismos del ambiente y se incubaron a una temperatura de 37°C para la posterior verificación de la propiedad anti-microbial, se dejó incubar por un tiempo de 24 horas. El **esquema 7** ilustra el procedimiento realizado.



Esquema 7. Metodología – Prueba de difusión por disco

3.3 FASE III. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro

Para determinar la aplicabilidad de las nanopartículas de oro se realizó un análisis mediante fuentes bibliográficas, donde se determinó si es posible incorporar las nanopartículas metálicas en matrices poliméricas para la elaboración de empaques de alimentos (Biopolímeros y polímeros sintéticos) o se evidencien estudios relacionados con el tema. Para este estudio se planteó las ventajas y desventajas al incorporar las nanopartículas de oro en polímeros y biopolímeros, los avances referentes que se han presentado y el impacto ambiental y social que se genera con dicha incorporación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FASE I. Sección del material vegetal y Síntesis de nanopartículas

4.1.1 Sección A. Selección de material vegetal

La selección del material vegetal se basó en la identificación de compuestos orgánicos de interés (mencionados anteriormente) presentes en los extractos de material vegetal utilizados en la síntesis de nanopartículas de oro. Los resultados de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS), cromatografía líquida de alta eficacia con detecto de arreglo de diodos (HPLC/DAD) e Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) se exponen en las secciones siguientes.

4.1.1.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS)

En la **figura 8** se presenta el cromatograma obtenido de la muestra de hojas de Mango. En los **anexos A-G**, se encuentran los cromatogramas correspondientes a las muestras de extractos de las hojas y cascaras de: Tamarindo, Guanábana, Guayaba y Mango. En las **tablas 3-9** aparecen la identificación y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en las muestras de extractos naturales realizados por GC/MS operando en el modo de barrido (*full scan*).

En el cromatograma de hojas de mango se observan 5 picos de mayor abundancia correspondientes a tiempos de retención de 20.329, 26.836, 36.125, 42.463 y 54.435 min. Los tiempos de retención fueron identificados en la tabla 6, como Fenol, 2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pirona-4-ona, Pirogalol, Ftalato de dietilo y Ácido oleico, compuestos que permiten la formación de nanopartículas.

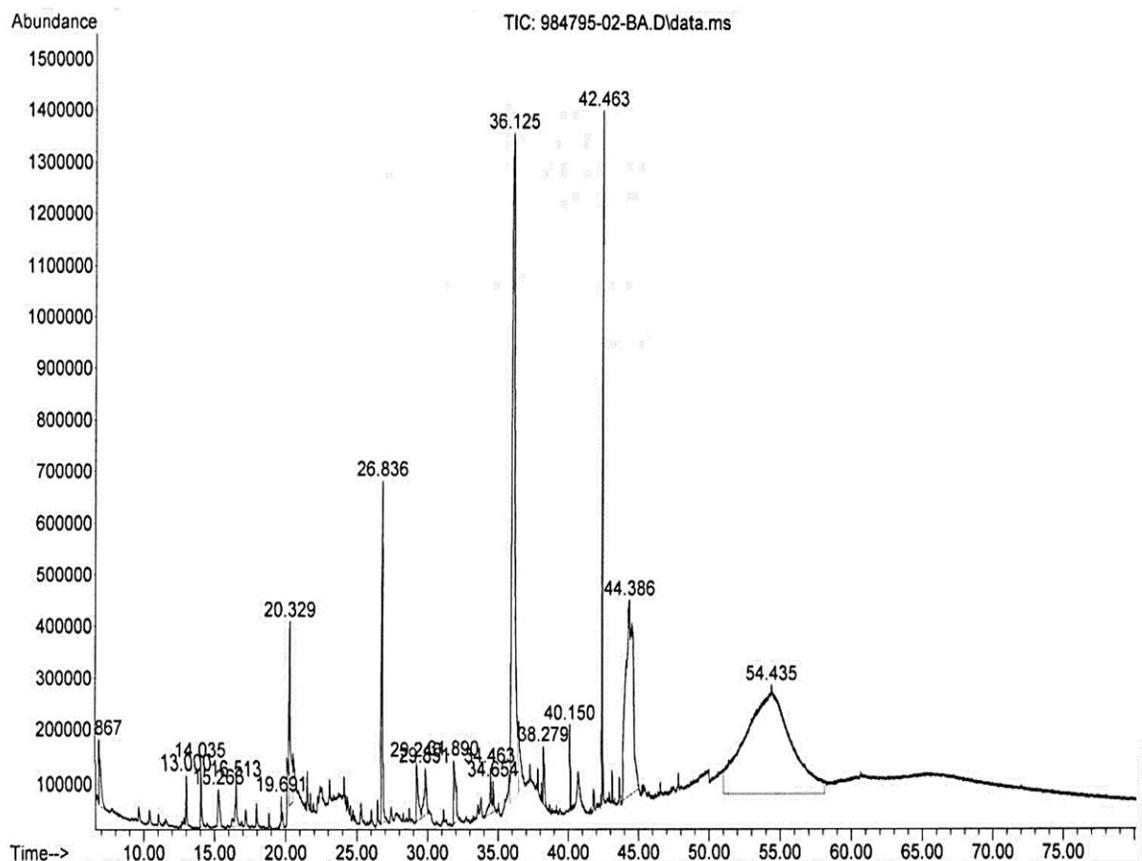


Figura 8. Cromatograma de la muestra de hojas de Mango (CG/MS) obtenidas en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

Los compuestos orgánicos como flavonoides tienen una estructura química muy definida, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (o aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono (Martínez, A. 2005). Debido a eso se determinó la presencia de compuestos con anillos aromáticos en las **tablas 3-9**.

Tabla 3. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Mango.

N° pico	t _R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	6,87	Acetaldehído	1,5
2	13,00	Furfural	0,6
3	14,04	2-Furanometanol	0,8
4	15,27	NI, compuesto oxigenado	0,9
5	16,51	NI, compuesto oxigenado	1,0
6	19,59	2,4-Dihidro-2,5-dihidroxi-3(2H)-furanona	0,1
7	20,33	Fenol	3,1
8	26,84	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pirona-4-ona	5,1
9	29,24	o-Catecol	1,3
10	29,85	NI, compuesto oxigenado	1,4
11	31,89	Hidroquinona	1,7
12	34,46	NI, compuesto oxigenado	0,9
13	34,65	NI, compuesto oxigenado	0,4
14	36,13	Pirogalol	26,9
15	38,28	2-Hidroxiacetofenona	1,0
16	40,15	NI, compuesto oxigenado	0,6
17	42,46	Ftalato de dietilo	4,9
18	44,39	NI, compuesto oxigenado	18,6
19	54,44	Ácido oleico	29,1
Total			100

NI: Compuesto no identificado

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

La **tabla 3**, correspondiente al extracto de hojas de Mango, se identificaron los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): Fenol 0.1%, o-Catecol 1.3%, Pirogalol 26.9% y 2-Hidroxiacetofenona 1.0%.

Tabla 4. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de cascaras de Mango.

N° pico	t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	13,04	Furfural	3,2
2	18,12	3-Metil-2,5-furanoidiona	11,1
3	18,87	5-Metilfurfural	0,4
4	19,74	2,4-Dihidroxi-,5-dimetil-3(2H)-furanona	0,2
5	19,82	NI, compuesto oxigenado	0,6
6	20,16	Fenol	1,8
7	20,36	NI, compuesto oxigenado	2,1
8	20,64	NI, compuesto oxigenado	0,8
9	21,57	NI, compuesto oxigenado	1,4
10	22,07	NI, compuesto oxigenado	0,7
11	24,14	2-Furilhidroximetilcetona	0,6
12	26,81	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Pirran-4-ona	2,9
13	29,27	<i>o</i> -Catecol	1,7
14	29,91	5-Hidroximetilfurfural	2,1
15	32,04	Hidroquinona	0,7
16	33,27	NI, compuesto oxigenado	0,6
17	36,16	Pirogalol	2,9
18	42,51	Ftalato de dietilo	18,6
19	44,21	NI, compuesto oxigenado	9,9
20	54,03	Ácido oleico	37,6
Total			100

NI: Compuesto no identificado

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

En la **tabla 4**, correspondiente al extracto de cascaras de Mango, se identificaron por su forma estructural la presencia de los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): Fenol 1.8%, *o*-Catecol 1.7%, Hidroquinona 0.7%, Pirogalol 29% y Ftalato de dietilo 18.6%.

Tabla 5. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de cascara de Guanábana.

N° pico	t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	22,30	Glicerol	11,9
2	23,76	2-Pirrolidona	2,8
3	25,51	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 119)	0,7
4	25,74	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	1,2
5	29,80	2-Metilbenzaldehído	1,1
6	33,85	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 114)	2,3
7	34,06	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 114), isómero	2,1
8	38,90	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 140)	2,4
9	42,44	Ftalato de dietilo	26,1
10	43,85	NI, compuesto oxigenado	2,4
11	51,16	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 194)	5,8
12	51,37	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 194), isómero	1,9
13	53,83	Ácido oleico	39,1
Total			100

NI: Compuesto no identificado

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

La **tabla 5**, correspondiente al extracto de cascara de Guanábana, se identificaron los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): 2-Metilbenzaldehído 1.1% y Ftalato de dietilo.

Tabla 6. Identificación tentativa y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Guanábana.

N° pico	t _R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	9,70	Pirrole	0,5
2	12,64	Metilpirazina	0,2
3	14,06	2-Furarometanol	0,4
4	16,63	2,5-Dimetilpirazina	0,4
5	20,33	NI, compuesto oxigenado	1,5
6	26,82	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	4,9
7	29,21	<i>o</i> -Catecol	0,7
8	29,80	2,3-Dihidrobenzofurano	21,9
9	32,01	<i>p</i> -Catecol	1,2
10	33,07	<i>p</i> -Vinilguaiacol	0,7
11	37,64	Tirosol	3,4
12	39,28	<i>p</i> -Hidroxifenilacetoniitrilo	0,6
13	40,89	NI, compuesto oxigenado (M ⁺ 192)	0,7
14	42,44	Ftalato de dietilo	10,7
15	43,81	NI, compuesto oxigenado	1,7
16	45,69	NI, compuesto oxigenado	32,5
17	54,50	Ácido oleico	18,0
Total			100

NI: Compuesto no identificado

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

En la **tabla 6**, correspondiente al extracto de hojas de Guanábana, se identificaron los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): *o*-Catecol 0.7%, 2,3Dihicrobenzeofurano 21.9%, *p*-Catecol 1.2%, *p*-Vinilguaiacol 0.7%, Tirosol 3.4% y *p*-Hidroxifnilacetoniitrilo 0.6%.

Tabla 7. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de cascara de Tamarindo.

N° pico	t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	17,95	3-Metil-2,5-furanodiona	0,2
2	23,47	Glicerol	5,2
3	25,47	Bencenoetanol	0,1
4	26,70	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	0,1
5	29,26	o-Catenol	0,1
6	40,52	NI, compuesto oxigenado	0,1
7	42,46	Ftalato de dietilo	8,8
8	42,84	3,4,5-Trimetoxifenol	0,2
9	49,98	NI, compuesto oxigenado	68,0
10	53,25	Áceto oleico	17,2
Total			100

NI: Compuesto no identificado

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

En la **tabla 7**, correspondiente al extracto de cascara de Tamarindo, se identificaron los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): Bencenoetanol 0.1%, o-Catecol 0.1% y 3,4,5-Trimetoxifenol 0.2%.

Tabla 8. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Tamarindo.

N° pico	t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	17,98	3-Metil-2,5-furanodiona	1,9
2	20,31	NI, compuesto oxigenado	0,5
3	21,99	Dihidro-3-metil-2,5-furanodiona	0,2
4	22,21	Alcohol bencílico	0,2
5	24,29	<i>o</i> -Guaiacol	0,2
6	26,69	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	0,2
7	29,76	2,3-Dihidrobenzofurano	0,7
8	33,05	<i>p</i> -Vinilguaiacol	0,2
9	40,77	NI, compuesto oxigenado	1,2
10	42,41	Ftalato de dietilo	2,7
11	49,27	NI, compuesto oxigenado	60,0
12	54,10	Ácido oleico	32,1
Total			100

NI: Compuesto no identificado

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

En la **tabla 8** correspondiente al extracto de hojas de Tamarindo, se identificaron los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): Alcohol bencílico 0.2%, *o*-Guaiacol 0.2%, 2,3-Dihidrobenzofurano 0.7%, *p*-Vinilguaiacol 0.2%, Ftalato de dietilo 2.7%.

Tabla 9. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra de hojas de Guayaba.

N° pico	t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
1	21,51	Limoneno	0,1
2	21,67	1,8-Cinoel	<0,1
3	35,22	α-Copaeno	0,2
4	36,91	<i>Trans</i> - β -Caropfileno	0,8
5	37,87	<i>Trans</i> -Muuroala-3,5-dieno	0,1
6	38,13	α- Humuleno	0,1
7	38,72	Ar-Curcumeno	0,1
8	39,24	β-Selineno	0,1
9	39,30	α- <i>cis</i> Bisaboleno	0,1
10	39,44	α- Selineno	0,1
11	38,57	β -Bisaboleno	0,5
12	39,99	δ-Cadineno	0,1
13	40,10	β-Sesquifelandreno	0,3
14	40,18	<i>Trans</i> -γ- Bisaboleno	0,1
15	41,09	<i>Cis</i> -Niroolidol	0,1
16	42,10	Óxido de cariofileno	0,1
17	44,17	Selin-11-en-4- α-ol	0,1
18	44,26	β-Bisabolol	0,2
19	48,05	Neofitadieno	0,5
20	48,59	Compuesto oxigenado, M*278	0,1
21	49,00	Fitol	0,1
22	59,98	Adipato de bis(2-etilhexilo)	0,7
23	63,25	Diisooctil ftalato	92,9
24	63,66	Metilpinocembrina	0,3
25	69,49	Docosenamida	1,2
26	70,53	Escualeno	0,3
27	85,46	Vitamina E	0,7
Total			100

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

En la **tabla 9** correspondiente al extracto de hojas de Guayaba, se identificaron los siguientes compuestos orgánicos con anillos bencénicos y su cantidad en porcentaje (%): Limoneno 0.1%, Ar-Curcumeno 0.1%, β -Selineno 0.1%, α -*cis*Bisaboleno 0.1%, α - Selineno 0.1%, β –Bisaboleno 0.5%, *Trans- γ* - Bisaboleno 0.1%, Diisooctil ftalato 92.9%, Metilpinocembrina 0.3 y Vitamina E 0.7%.

De acuerdo a los datos anteriores referentes a los compuestos orgánicos aromáticos, en la **tabla 10** se expone el total en porcentaje de los compuestos en cada extracto de material vegetal.

Tabla 10. Porcentaje total de compuestos orgánicos con anillos bencénicos en cada extracto de material vegetal.

Extracto de material vegetal	Total cantidad relativa en el extracto (%)
Cascara Mango	27,8
Cascara Guanábana	27,2
Cascara Tamarindo	0,4
Hojas Mango	32,3
Hojas Guanábana	27,8
Hojas Tamarindo	4
Hojas Guayaba	94,3

Fuente: Autor

De acuerdo a los resultados presentes en las **tablas 3-9** del análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas, se encontraron compuestos orgánicos aromáticos, los cuales en su forma estructural presentan un anillo bencénico como los flavonoides. Estos compuestos fenólicos dentro de los compuestos fitoquímicos de plantas, actúan como bioreductores de nanopartículas

y envuelven a las nanopartículas para proporcionar una excelente robustez, con el fin de evitar su aglomeración (Nazeruddin., 2014).

Para la selección del material vegetal, se tuvo en cuenta los datos de la **tabla 10**, en la cual se evidencia que las hojas de Mango, Guanábana, Guayaba y Tamarindo son las adecuadas para llevar a cabo el proceso relacionado a la síntesis de nanopartículas de oro, debido a que presentan una cantidad relativa mayor referente a la presencia de compuestos orgánicos aromáticos.

4.1.1.2 cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD)

En la **figura 10** se presenta el cromatograma obtenido de la muestra de hojas de Mango. En los **anexos H-N**, se encuentran los cromatogramas correspondientes a las muestras de extractos de las hojas y cascaras de: Tamarindo, Guanábana y Mango. En la **tablas 11** aparecen los compuestos identificados cualitativamente por HPLC/DAD a $\lambda=245$ nm de las muestras de Tamarindo, Guanábana, Guayaba y Mango.

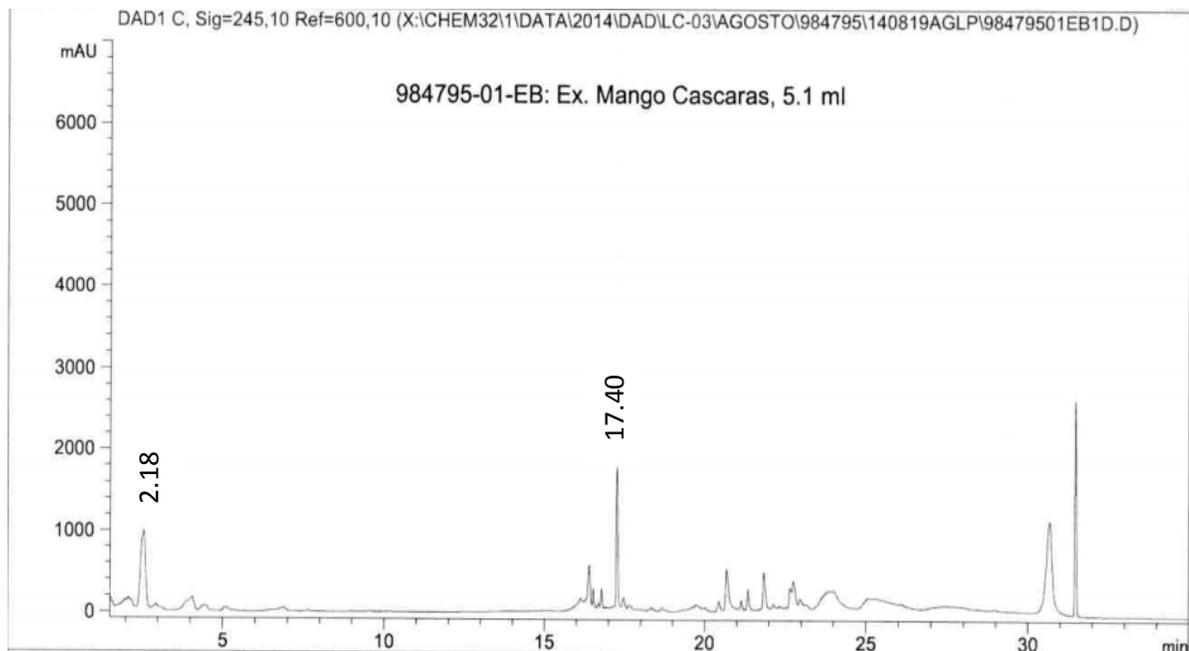


Figura 9. Cromatograma de la muestra de hojas de Mango (HPLC/DAD) obtenidas en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

La **figura 9** ilustra los diferentes picos obtenidos del extracto de las hojas de mango en el análisis de HPLC/DAD. Se identificaron compuestos flavonoides como Ácido gálico y Epigallocatequina galato en los dos picos con un tiempo de retención de 2.10 y 17.40 respectivamente.

Tabla 11. Compuestos flavonoides identificados por medio de HPLC/DAD.

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	COMPUESTO DETECTADO
Mango Cascaras	Ácido gálico
	Epigallocatequina galato
Tamarindo Cascaras	Epicatequina
	Epigallocatequina galato
	Epicatequina galato

Guanábana Cascaras	Epicatequina
	Epigallocatequina galato
Mango Hojas	Ácido gálico
	Epigallocatequina galato
	Acido <i>p</i> -coumárico
	Epicatequina galato
Tamarindo Hojas	Epicatequina
Guanábana Hojas	Epicatequina
	Epigallocatequina galato
Guayaba hojas	Epicatequina
	Epigallocatequina galato
	Ácido felúrico
	Ácido rosmarínico
	Pinocembrina

Fuente: Laboratorio de cromatografía de Universidad Industrial de Santander (UIS).

En los resultados obtenidos por el análisis de cromatografía líquida de alta eficacia, se observó que todos los extractos de material vegetal presentas compuestos orgánicos como los flavonoides. Las hojas de los árboles frutales presentaron más variedad de flavonoides a diferencia de las cascarras de los frutos. Por esto se escogió nuevamente las hojas de los árboles frutales para realizar la síntesis de nanopartículas de oro.

4.1.1.3 Análisis de infrarrojo para extractos de material vegetal

Mediante el análisis infrarrojo (FTIR) se determinó los grupos funcionales presentes en los extractos de hojas de los árboles de Tamarindo, Guanábana, Mango y Guayaba (Chithrani et al., 2006).

Las **tablas 12–15** se ilustran los diferentes grupos funcionales encontrados para cada muestra de material vegetal por el método de FTIR. La **figura 10** presenta el espectro de infrarrojo de los extractos de hojas de mango. Los **anexos O-R**, ilustran los espectros de Infrarrojo referente a cada material vegetal.

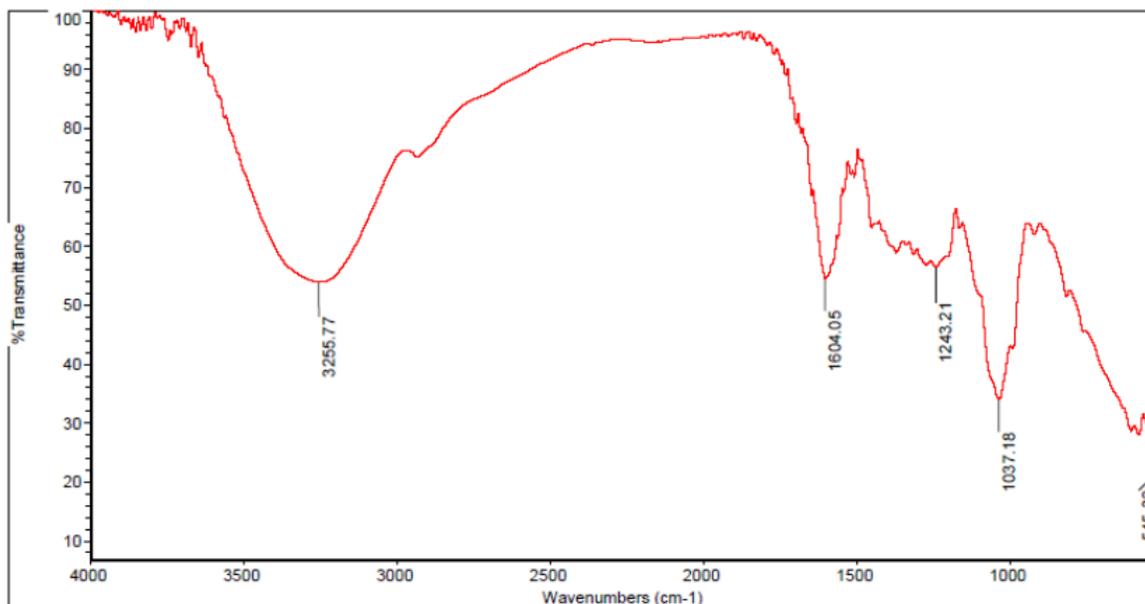


Figura 10. FTIR de extracto concentrado de hojas de Mango. Equipo de Infrarrojo (FTIR), Universidad de Cartagena.

En el espectro infrarrojo (FTIR) de hojas de mango se observan 5 picos de mayor abundancia correspondientes a la presencia de grupos funcionales de 3255.77, 1604.05, 1243.21, 1037.18 y 545,23. Los tiempos de retención fueron identificados en la tabla 13, como Alcohol polimerico, Amina, Fenoles, Fosfato y Haluro de alquilo.

Tabla 12. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Mango.

Grupo funcional	Estructura	Absorción (cm ⁻¹)
Amina	N-H	1604,05
Fenoles		1243,21
Aminas	C-N	1037,18
Fosfato	PO ₄	
Haluro de alquilo	C-Br	545,32

Fuente: Equipo de Infrarrojo (FTIR), Universidad de Cartagena

Tabla 13. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Guanábana.

Grupo funcional	Estructura	Absorción (cm ⁻¹)
Anhidridos		1773.44
Ester		1734.99
Alqueno (cis-disustituido)		1649.47
		1620.68
Anillo aromático		1561.69
Anillo aromático		1541.11
Nitro	NO ₂	
Anillo aromático		1520.49
		1456.17
Alcano	C-H	1392.91
Amina	C-N	1047.40
Fosfato	PO ₄	
Haluro de Alquilo	H-Br	595.33
		536.92

Fuente: Equipo de Infrarrojo (FTIR), Universidad de Cartagena

Tabla 14. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Tamarindo.

Grupo funcional	Estructura	Absorción (cm ⁻¹)
Compuesto Carbonílico	C=O	1716.54
Alqueno (metileno Terminal)		1650.19
Anillo aromático		1559.37
Nitro	NO ₂	1540.32
Alcano (Debil)	C-H	1394.81
Amina	C-N	1254.59
Alcohol	OH	1126.74
Alcohol (Primario)	OH	1072.36
Fosfato	PO ₄	
Haluro de Alquilo	H-Br	557.22

Fuente: Equipo de Infrarrojo (FTIR), Universidad de Cartagena

Tabla 15. Grupos funcionales, estructuras y absorción de los picos del FTIR de hojas de Guayaba.

Grupo funcional	Estructura	Absorción (cm ⁻¹)
Aromático		
Cetona		1609.56
Amina	-NH ₂	
Ruido		1447.18
Alcano (débil)	C-H	
Ácido carboxílico		1346.41
Amina	C-N	
Nitro	-NO ₂	
Fenol		1205.71
Amina	C-H	
Fosfina	pHd	
Alcohol (primario)	O-H	1046.69

Fuente: Equipo de Infrarrojo (FTIR), Universidad de Cartagena

En las hojas de los árboles frutales se presentaron diferentes y variados grupos funcionales como lo son las aminas, fosfatos, fenoles, haluro de alquilo, esterres, alquenos, anillos aromáticos, grupos nitros, alcanos, alcanos, alcoholes, cetonas, ácido carboxílico, compuestos carbonílicos, fosfinas y alcohol primario.

Muchos de estos tipos de compuestos son promotores de la bio-reducción de nanopartículas de oro, en este caso los grupos -OH y -COOH en biomoléculas como los aromáticos o polifenoles atribuye el poder reductor de iones metálicos en métodos biosintéticos, como ha sido previamente sugerido por Huang et al., (2007) y Sathishkumar et al., (2009). Aunque se requieren más estudios para establecer el mecanismo de formación y estabilización de las nanopartículas de oro. Por otro lado se informó de que la cetona es el componente principal el cual hace que las nanopartículas de oro presenten características esférica (Alí., et al. 2011). El grupo carboxilo presente en las proteínas pueden actuar como un agente

tenso activo, lo cual ocasiona la unión a la superficie de las nanopartículas y logra la estabilización electrostática de las mismas (Muthuvel, A., 2014).

El análisis de FTIR permitió confirmar lo obtenido por GC/MS y HPLC/DAD, donde se evidencio diferentes grupos funcionales que actúan como agentes reductores de nanopartículas en las que las hojas de Mango, Guanábana, Tamarindo y Guayaba.

Posterior a la identificación de compuestos orgánicos y grupos funcionales de los extractos de plantas, se realizó la síntesis de nanopartículas de oro con el material seleccionado.

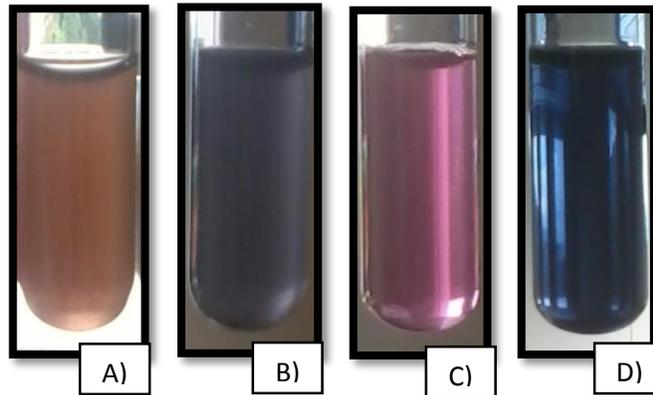
4.1.2 Sección B. Análisis de la síntesis de nanopartículas de oro

Para la síntesis de nanopartículas de oro se implementó un método biológico a temperatura ambiente, en el cual se utilizó extractos de las hojas de los árboles de Tamarindo, Mango, Guanábana y Guayaba (material seleccionado anteriormente).

La biosíntesis de AuNPs fue identificada por cambio de color en la solución durante el transcurso de la reacción, análisis de Ultravioleta-visible (UV-Vis). La intensidad del color depende del grado de bio-reducción de partículas de oro (Nazareddin, G., 2014).

Para la síntesis en extracto de Tamarindo, se observó un viraje de color de verde-amarillento a rojo-violeta, para síntesis con el extracto de Mango y Guayaba el cambio de color se presentó de un café pardo a verde oscuro, por último la síntesis en el extracto de Guanábana cambio de color café pardo a un tono vino tinto. La **figura 11** muestra las soluciones de nanopartículas de oro según el extracto vegetal en el cual fueron formadas.

Figura 11. A) AuNPs Guayaba; B) AuNPs Guanábana; C) AuNPs Tamarindo; D) AuNPs Mango.



Fuente: Autor

El cambio de coloración de la solución de nanopartículas se debe principalmente a los diferentes compuestos orgánicos que se encuentran presentes en las hojas con las cuales se realiza la síntesis y al tamaño que estas presentan después de las síntesis (Sujitha, M., 2013).

Las soluciones de nanopartículas sintetizadas a partir de extractos vegetales fueron adicionalmente analizadas por Ultravioleta-visible (UV-Vis). Según Shankar et al., 2004 el espectro de nanopartículas de oro teóricamente debe presentar una longitud de onda entre 500 – 550 nm aproximadamente.

4.2.1.1 Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Guayaba

Para la identificación de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir del extracto natural de las hojas de Guayaba se analizó el espectro UV-Vis presentado en la **figura 12**. En los resultados obtenidos **no se** observa una longitud de onda característica de la formación de nanopartículas de oro; como la reportada por Rico-Moctezuma., 2010; Muthuvel, 2014; Uma Suganya., 2014 y Shankar et al., 2004.

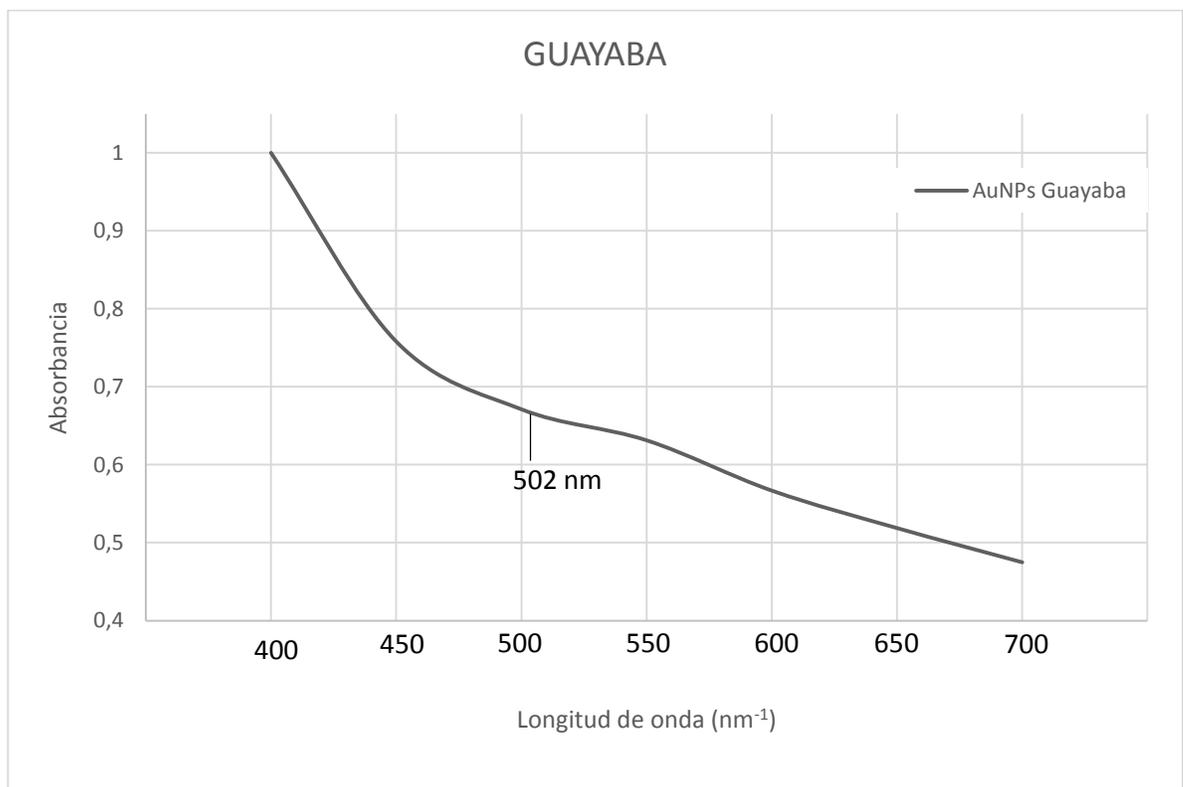


Figura 12. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Guayaba.

4.2.1.2 Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Guanábana

Para la síntesis de las nanopartículas de oro con el extracto de las hojas de Guanábana se obtuvo el espectro UV-Vis presentado en la **figura 13**. El análisis de espectrofotometría UV-Vis evidencia que la gráfica de longitud de onda no es característica de la formación de nanopartículas de oro aunque evidencia una ondulación más clara que con el extracto de Guayaba. (Rico-Moctezuma., 2010; Muthuvel , 2014; Uma Suganya., 2014; Shankar et al., 2004).

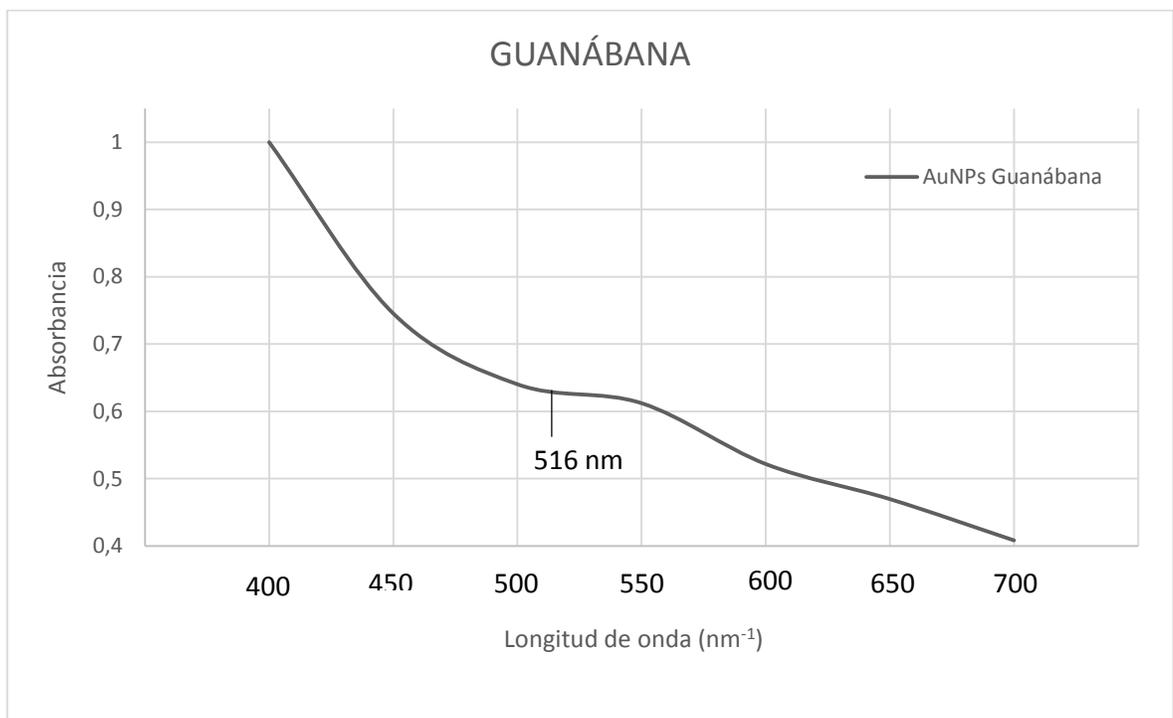


Figura 13. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Guanábana.

4.2.1.3 Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Tamarindo

En la **figura 14** se evidencia ensanchamiento de la banda asociada con las nanopartículas de oro a un pico de longitud de onda de 542nm, sintetizadas con el extracto de las hojas de Tamarindo. El espectro indica que el diámetro de las nanopartículas presentan un tamaño por arriba de 10 nm de diámetro (Rico-Moctezuma., 2010). De acuerdo a Shankar et al., 2004 se puede establecer que se formaron nanopartículas de oro a partir del extracto de tamarindo, debido a que la longitud de onda obtenida está en el rango identificado.

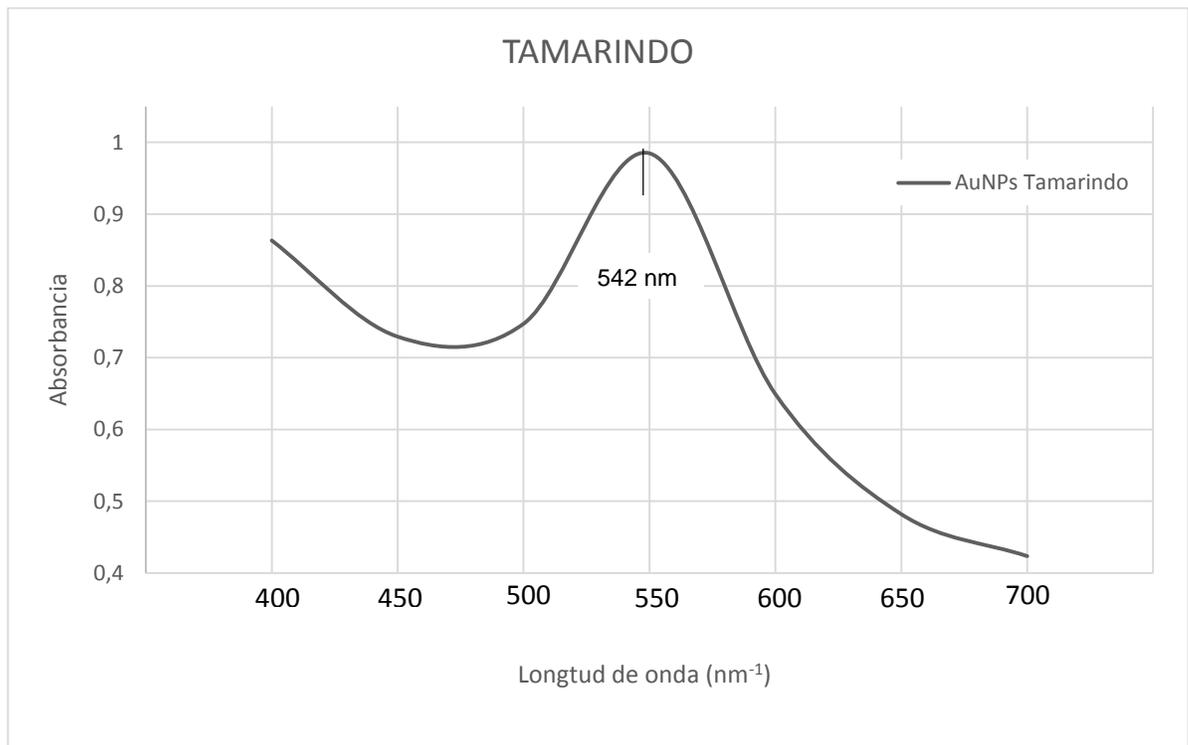


Figura 14. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Tamarindo.

4.2.1.4 Nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de Mango

La **figura 15** se muestra el espectro UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas a partir del extracto de hojas de Mango. En la presente caracterización se observó una longitud de onda máxima de absorción de 566 nm, por otro lado se evidencia ensanchamiento de la banda asociada resonancia plasmónica de las nanopartículas de oro sintetizadas con el extracto de las hojas de Mango, efecto que se atribuye al aumento en el tamaño de las partículas por arriba de 10 nm de diámetro, lo cual conduce a incrementar la dispersión de la luz, y como consecuencia incrementando el ancho del espectro de UV-Vis (Rico-Moctezuma., 2010). A pesar de presentar una longitud de onda mayor al rango reportado por Shankar et al., 2004, se evidencia una longitud característica para la formación de nanopartículas de oro a partir del extracto de Mango según Muthuvel, 2014., Uma Suganya., 2014 y Shankar et al., 2004.

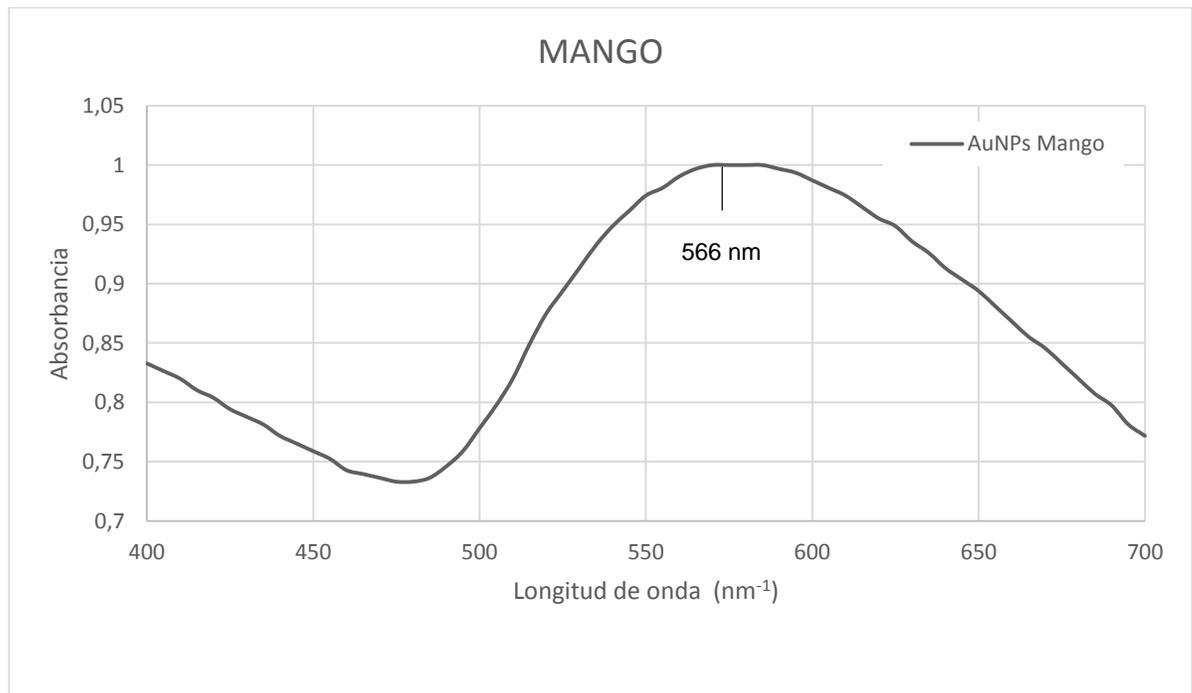


Figura 15. Espectro UV-VIS de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de hojas de Mango.

La **tabla 16** muestra la longitud de onda máxima obtenida por UV-Vis para las nanopartículas de oro sintetizadas a partir de los extractos de Guayaba, Guanabana, Tamarindo y Mango. Se evidencia que las nanopartículas obtenidas a partir del extracto de Tamarindo y Mango están en el rango de longitud de onda establecido por Shankar et al., 2004. Se observa que las longitudes de onda se encuentran entre 540 – 570 nm. Es por esto que se puede decir que los extractos de Tamarindo y Mango son formadores de nanopartículas de oro. Por otro lado los extractos de Guayaba y Guanábana no presentaron una banda de longitud de onda característica para la formación de nanopartículas. Aunque, presentan una pico de longitud de onda de un rango de 500 – 520 nm. Esto probablemente se deba a la presencia de nanopartículas de oro o a otro compuesto. De igual manera esta longitud de onda está en el rango según Shankar et al., 2004.

Tabla 16. Longitud de onda máxima de nanopartículas de oro sintetizadas por extractos vegetales.

Nombre Científico	Extracto Vegetal	Longitud de onda (nm)
<i>Psidium guajava L.</i>	Guayaba	502*
<i>Annona muricata L.</i>	Guanabana	516*
<i>Tamarindus indica L.</i>	Tamarindo	542
<i>Mangifera indica L.</i>	Mango	566

*Posible longitud de onda para la formación de nanopartículas de oro

Fuente: Autor

4.2 FASE II. Análisis de la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro

La propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro sintetizadas por medio de Tamarindo y Mango fue analizada por medio de un cultivo modificado, sembrado en superficie y prueba de difusión por disco.

La **figura 16**, evidencia el crecimiento de microorganismos sin la adición de las soluciones de nanopartículas de oro. Este parámetro (blanco) se tomó como referencias y comparación de las demás pruebas.



Figura 16. Blanco representativo incubado a 37°C por 48 horas

La muestra control o blanco para los dos primeros procedimientos, medio de cultivo modificado y sembrado en superficie), presento crecimiento de bacterias debido a que estuvo expuesta al ambiente por 30 minutos con el fin de adquirir los microorganismos presentes en el ambiente al igual que las muestras problema, las cuales contenían las soluciones de nanopartículas de oro.

4.2.1 Análisis de la propiedad anti-microbial por medio de cultivo modificado

Para el análisis de la propiedad anti-microbial por medio de un cultivo modificado, se tuvo en cuenta los resultados reflejados en **la figura 17 y 18**.

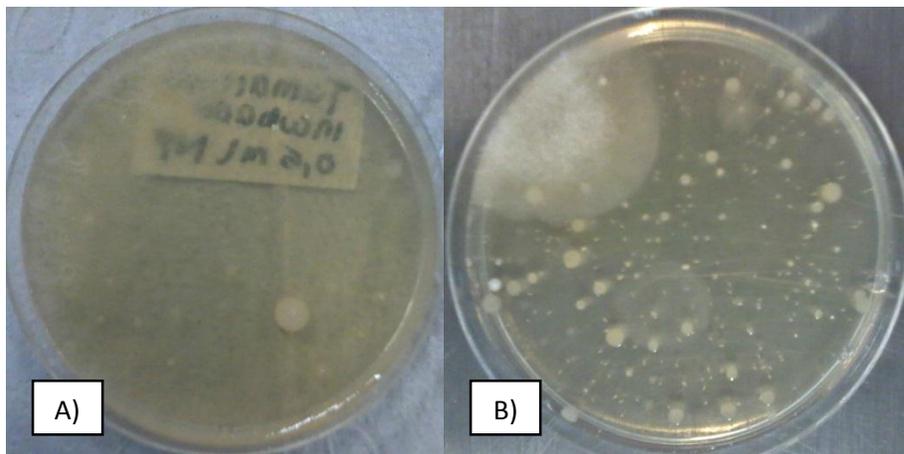


Figura 17. Crecimiento de microorganismo del medio de cultivo modificado de la solución de AuNPs provenientes del extracto de Tamarindo incubado a 37°C por 48 horas, A) con 0,5 mL; B) con 1 mL.

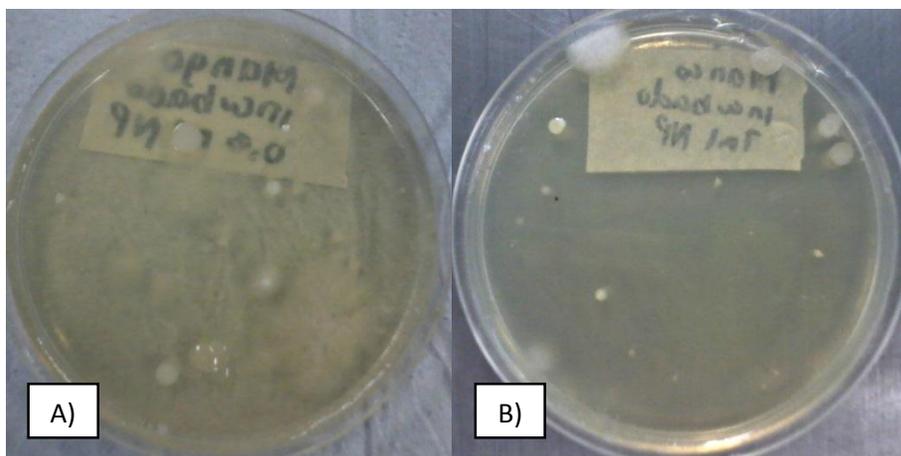


Figura 18. Crecimiento de microorganismo del medio de cultivo modificado de la solución de AuNPs provenientes del extracto de Mango incubado a 37°C por 48 horas, A) con 0,5 mL; B) con 1 mL.

Pasadas las 48 horas, las cajas se retiraron de la incubadora para verificar los resultados. Las pruebas A y B para las dos soluciones de nanopartículas de oro presentaron crecimiento de hongos, colonias de bacterias en superficie y a profundidad de coloración blanca.

Tabla 17. Resultados de crecimiento microbiano de los medios A y B en el medio de cultivo modificado.

Medio A	Medio B
El crecimiento bacteriano y el de hongos, en el medio A de las dos pruebas, cubre en su totalidad la superficie del medio de cultivo (Tamarindo y Mango).	El medio modificado B, de las dos pruebas, al aumentar el volumen de la solución de nanopartículas a 1 ml se presenta una disminución en el crecimiento de microorganismos en medio de cultivo, donde se puede determinar y definir las colonias de bacterias y hongos presentes.

Fuente: Autor.

La **tabla 16**, corrobora que dichas soluciones deben presentar una concentración mayor de nanopartículas para inhibir el crecimiento microbiano.

La solución de nanopartículas obtenidas a partir del extracto de Mango, a comparación de la de tamarindo, evidencia un menor crecimiento de microorganismos en sus pruebas, esto puede deberse a la presencia de los diferentes compuestos orgánicos, azúcares y/o proteínas que contienen directamente las hojas con las cuales fueron elaborados los extractos naturales.

4.2.2 Análisis de la propiedad antimicrobial por medio del Sembrado de Superficie

Seguido al análisis de la prueba del cultivo modificado, se procedió a realizar el análisis de la propiedad antimicrobial por medio del sembrado en superficie. La **figura 19** expone los resultados obtenidos de la prueba.

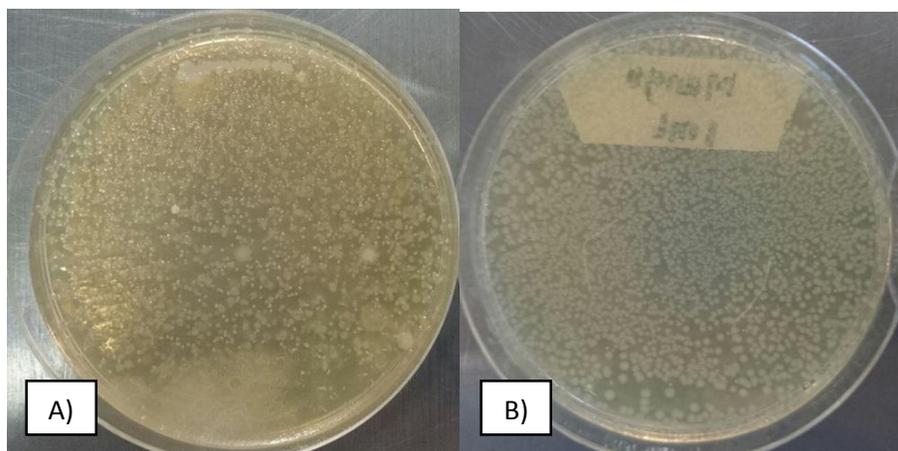


Figura 19. Sembrado en superficie con 1 ml de la solución de nanopartículas de oro proveniente del extracto de A) Tamarindo y B) Mango.

Pasado el tiempo de 48 horas en incubación, las muestras se sacan para determinar la propiedad cualitativamente. Para la prueba de siembra en superficie de las soluciones de nanopartículas de oro, se evidenció un mayor crecimiento que en el blanco.

Tabla 18. Resultados de crecimiento microbiano de los medios A y B en la prueba de sembrado en superficie.

Medio A	Medio B
El medio de cultivo A presentó crecimiento de hongos y bacterianas de menor tamaño pero con mayor cantidad. Fueron contadas 1954 colonias de color blanco.	El medio de cultivo B presento colonias de bacterias más grandes y con menor cantidad de coloración blanca. Fueron contadas 1782 colonias.

Fuente: Autor

Esto sigue corroborando que la solución de nanopartículas de oro necesita una concentración adecuada para inhibir el crecimiento de microorganismos.

4.2.3 Análisis de la propiedad antimicrobial por medio de la Prueba de difusión por disco

Por último, se realizó la prueba de difusión por disco, con el fin de corroborar los resultados obtenidos en las dos pruebas anteriores. La **figura 20** expone los resultados obtenidos de la prueba de difusión por disco del control o blanco después de 24 horas de ser incubada, mientras la figura 15 ilustra los resultados obtenidos con las soluciones de nanopartículas de oro (mango y tamarindo)



Figura 20. Blanco representativo para la prueba de difusión por disco incubado a 37°C por 24 horas.

Después de seguir con el procedimiento descrito en el estudio de Bauer- Kirby (1966) para la prueba de difusión por disco (Anexo S), se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano de las nanopartículas de oro. Pasadas las 24 horas, las cajas se retiraron de la incubadora para identificar las zonas de inhibición y de crecimiento bacteriano. La **Figura 21**, muestra fotos características tomadas de las cajas Petri luego de 24 horas. Se puede observar que para las dos pruebas, la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro no está presente debido a que no se formaron los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, en cambio el crecimiento evidenciado cubre uniformemente la totalidad la superficie del medio de cultivo tomando una textura rugosa y opaca

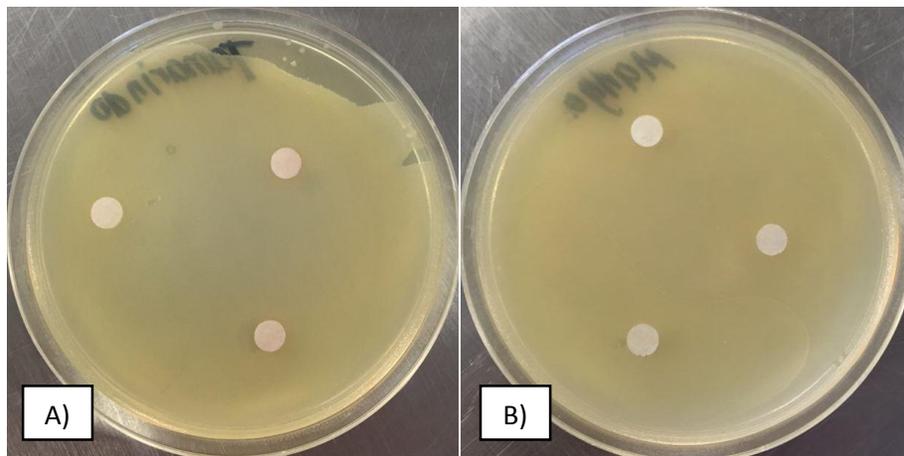


Figura 21. Prueba de difusión por disco A) Tamarindo y B) Mango.

Generalmente, para la determinación de la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro, se observó cualitativamente que el crecimiento de microorganismos donde estaban presentes las nanopartículas de oro, provenientes de los extractos de Mango y Tamarindo fue mayor que el crecimiento de microorganismos en el blanco (medio de cultivo sin nanopartículas), lo cual indica que la propiedad anti-microbial de las AuNPs no está presente.

Esto se debe principalmente a la concentración a la cual se encontraba la solución de AuNPs utilizada para determinar esta propiedad, ya que se encontró que esta solución de nanopartículas para tener una actividad antibactericida adecuada debe presentar una concentración alrededor de los 45 mg/ml (Huang et. al, 2007) mientras que la concentración de la solución Tamarindo y Mango implementada presentaron una concentración de 0,0011 g/ml (1,1 mg/ml) y 0,0009 g/ml (0,9 mg/ml) respectivamente.

Por otro lado las impurezas relacionadas con compuestos orgánicos provenientes de los extractos naturales en la solución de nanopartículas sintetizadas, pudo favorecer en el crecimiento de microorganismos como nutrientes para los mismo. Esto se debe a que los extractos naturales contienen proteínas que pueden actuar como un bio-ligando.

Se ha informado por Lin et al. Que los grupos carbonilo de proteínas que se encuentran en las plantas tienen una fuerte afinidad para unirse a metales. Así el extracto de plantas puede llegar a actuar como agente de protección terminal y proteger así las nanopartículas (Chunekar, 2010), disminuyendo su área superficial opacando su propiedad anti-microbial. Esto puede deberse que en el procedimiento de síntesis únicamente se realizó un lavado con agua destilada y no con solventes orgánicos que eliminara o capturara dichas impurezas para ser retiradas de la solución de nanopartículas de oro.

Esto se corrobora con lo reportado por Muthuvel et al en 2014 y Uma Suganya et al. 2014, donde se expone que la inhibición dependiente de la dosis de nanopartículas en el sitio específico. Las nanopartículas sí presentan forma esférica, tendrán mayor área de la superficie, la cual podrá aceptar fácilmente radicales OH. El punto máximo de inhibición de las nanopartículas de oro debe de los diferentes compuestos fitoquímicos presentes en las hojas implementadas para la síntesis, estos compuestos fitoquímicos pueden adherirse a la superficie activa de la AuNPs disminuyendo su propiedad anti-microbia.

Por otro lado al presentar una concentración de 45 mg/ml, las nanopartículas eran activas contra levadura *Candida Albicans* (Huang et. al, 2007). Fue reportado por Ghosh et al., 2012, que estas nanopartículas en combinación con los antibióticos tienen una actividad antibacteriana sinérgica contra microorganismos, especialmente frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*. De otro modo Ali et al. (2011) informó de la síntesis de nanopartículas de plata y oro que utilizan extractos de *Mentha piperita* y que estas nanopartículas una actividad antibacteriana contra patógenos humanos clínicamente aislados tales como *E. coli* y *S. aureus*.

La **tabla 19 y 20** muestran las posibles bacterias y hongos que se encontraban en los resultados de las pruebas para la determinación de la propiedad antimicrobia de las nanopartículas de oro, de acuerdo a su coloración blanca.

Tabla 19. Posibles bacterias presentes en los resultados de las pruebas antimicrobiales para las nanopartículas de oro.

Bacteria encontrada (probabilidad)	Clasificación de Gram	Características	Clasificación (ejemplos)
<p>STHAPHYLOCOCCUS</p> <p>La especie <i>S. aureus</i> es la de mayor patogenicidad reconocida por su capacidad de producir enzimas extracelulares y toxinas. (Marrero D et al., 2006)</p>	cocos grampositivos	Células esféricas (cocos) grampositivas, que se agrupan de forma irregular, formando racimos de uva, aislados, en cadenas cortas y en pares. Crecen a temperatura de 37 °C, en 18 a 24 horas, formando colonias redondas, lisas, elevadas, con variaciones desde color gris, blanco hasta amarillo intenso.	<p>Staphylococcus coagulasa positiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> <p>Staphylococcus coagulasa negativos (SCN):</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Staphylococcus saprophyticus</i> - <i>Staphylococcus haemolyticus</i> - <i>Staphylococcus lugdunensis</i> - <i>Staphylococcus</i>
<p>ENTEROBACTERIAS</p> <p>Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</p> <p>Son anaerobios facultativos, oxidasa negativos, no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa y reducen los nitratos a nitritos. Forman parte de la flora normal del intestino del hombre y de animales y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. (Marrero D et al., 2006)</p>	Bacilos Gram-negativos Enterobacterias	Se puede evidenciar en medios nutritivos como agar sangre, agar nutritivo, agar BHI, entre otros. Se forman una especie de ola alrededor de las colonias bacterianas y esta se desplaza de forma radial, a este fenómeno se le llama efecto de swarming el cual es característico de <i>Proteus</i> sp. Colonias medianas, convexas, blanquecinas o translucidas, forma circular, bordes redondeados hay	<p><i>Salmonella entérica (más de 2300).</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Shigella (S. dysenteriae, S. sonnei, S. boydii y S. flexneri)</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Yersinia enterocolítica</i> - <i>Hafnia alvei</i> - <i>Citrobacter (C. diversus, C. amalonaticus, C. freundii)</i> - <i>Enterobacter (E. aerogenes, E. agglomerans, E. cloacae)</i> - <i>Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</i>

		presencia de swarming.	- <i>Edwardsiella tarda</i>
BACILLUS SP (Bacillos Subtillis)	Bacilos Gram positivo	Colonias Grandes, planas, blanquecinas, forma irregular, bordes lobulados, dan la apariencia de estar secas, también se observa una protuberancia en el centro de las colonias lo cual les da una apariencia de huevo estrellado.	- <i>B. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> (que incluye a <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>), <i>B. brevis</i> y <i>B. anthracis</i> .
Este microorganismo tiene capacidad para controlar ciertas enfermedades en cultivos vegetales. (Bartram J et al., 2003)			

Fuente: (Marrero D et al., 2006; Bartram J et al., 2003)

De acuerdo a las características físicas que presentaron las bacterias obtenidas en las pruebas de propiedad anti-microbial, como: coloración, relieve y forma se encontraron posibles nombres de bacterias presentes como: *Staphylococcus*, *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*) y *Bacillos Subtillis*.

Tabla 20. Posibles hongos presentes en los resultados de las pruebas anti-microbiales para las nanopartículas de oro.

Hongo encontrado (probabilidad)	Características
MICROSPORUM CANIS (Sarmiento C. y Trujillo M., 2006)	Colonias con micelio blanco, algodonosas, planas y radiadas. Hongo filametososo que presenta microconidios abundantes, fusiforme, grandes, con micelio blanco, aspecto lanoso, bordes desflecados y centro polvoriento
FUSARIUM SP (Tangarife V., 2011)	Es un hongo filamentoso aislado de plantas y suelo. Se encuentra como microbiota normal en arroz, frijol, soya y otros cultivos. Además de ser un contaminante común y fitopatógeno, las especies de <i>Fusarium</i> pueden causar varias infecciones en humanos. Pueden ser

algodonosas de color blanco, con diversos pigmentos según la especie (crema, rosado, salmón, amarillo, rojo o morado). Microscópicamente posee células conidiógenas tipo fialides formadas en la hifa aérea. Poseen 2 tipos de conidia: macroconidias y microconidias, que varían en forma y número según la especie:

Fuente: (Sarmiento C. y Trujillo M., 2006; Tangarife V., 2011).

De acuerdo a las características físicas como: coloración y forma que presentaron los hongos obtenidos en los resultados de las pruebas anti-microbiales realizadas anteriormente se encontraron posibles nombres para los hongos como: *Microsporum canis*, *fusarium sp* y *Thamnidium elegans*.

4.3 FASE III. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro

Debido al auge de tantos mercados y competencia en diversas áreas y productos como es el caso de las industrias de alimentos, se ha vuelto necesario que las compañías investiguen nuevas maneras de mejorar su productividad en términos de seguridad, uso de materiales de empaque de manera sostenible, implementación de tecnología flexible y estandarizada. Recientes avances en la nanotecnología como los nanomateriales le proporcionan a grandes compañías oportunidades de reacomodar sus esquemas de proceso, empaque y manufactura (Camacho, M., 2011).

Dentro de las funciones básicas que debe cumplir un empaque, como la distribución de un producto se encuentran:

- Contención: depende de la naturaleza y forma física del producto; por ejemplo, si es higroscópico, viscoso, ácido, entre otros.
- Prevención: cambios químicos, bioquímicos o deterioro microbiológico.
- Protección: daños mecánicos debido al transporte y manipulación.

- Información del producto: ingrediente, usos o requisitos legales.
- Presentación: tipo de material, color, tamaño, forma.
- Economía: por ejemplo, eficiencia en distribución, producción y almacenamiento.
- Responsabilidad ambiental: en manufactura, uso, re-uso, reciclaje y disposición final.

Polímeros sintéticos

Los plásticos presentan características deseables como la transparencia, propiedades mecánicas eficientes y estabilidad térmica. Algunos de los plásticos más utilizados son el tereftalato de polietileno (PET), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y poliamida. Sin embargo, al no ser totalmente reciclables ni biodegradables, impactan negativamente al medio ambiente, además del aumento en el consumo de combustibles fósiles lo que a su vez incrementa los costos en sus procesos de manufactura (Mahalik, N., 2010).

En la actualidad los polímeros termoplásticos cuentan con una gran demanda en el mercado debido a la facilidad de procesamiento a las propiedades versátiles que presentan después de su síntesis y producción. Además presentan ventajas como facilidad de reciclado, pos-moldeado y dureza con respecto a sus competidores cercanos, como los termofijos (Funari et al., 2010).

Con el fin de obtener mejoras en determinadas propiedades, las cuales no pueden ser logradas a partir de su síntesis, suelen recurrir a los llamados “materiales poliméricos nanoestructurados” que se consiguen con la adición de pequeñas cantidades de nanopartículas. Esto se logra sin perder una de las características más importantes de los polímeros, que es su baja densidad. Estas nanopartículas pueden tratarse de nanoarcillas (Paul y Robeson, 2008; Gonzalez-Valades et al.,

1999; Kearns y Shambaugh, 2002), nanotubos de carbón (Lim et al., 2009; Wu et al., 2007; Bower et al., 1998), partículas metálicas (Kuruville et al., 1999).

Cuando estos materiales son adicionados a la matrices poliméricas, el material original puede sufrir modificaciones de sus propiedades mecánicas, como son módulos de elasticidad, elongación, entre otras (Chrissafis et al., 2008), a su vez esta modificación de propiedades pues favoreces para ampliar la gama a nuevas aplicaciones posibles. Se informó por Castro et al., 2012 sobre la incorporación selectiva de nanopartículas de oro dentro de la membrana de polimerosomas, según caracterizado por las investigaciones de Microscopía Electrónica de Transmisión y Dispersión de Luz Dinámica. Los polimerosomas, con un diámetro de 147 nm, fueron fabricados a partir de copolímero de dibloque de polibutadieno–bloque–poli (óxido de etileno) empleando un proceso de doble emulsión. Los resultados demuestran que la inclusión mecánica durante la evaporación del disolvente orgánico y la interacción hidrófoba entre el 1–mercapto–(trietilenglicol)metiléter de las nanopartículas de oro y el bloque de poli(óxido de etileno) del copolímero es suficiente para guiar la posición de las nanopartículas (con un tamaño promedio de 4,2 nm) dentro de la bicapa del polimerosoma (de espesor 18 nm) (Castro et al., 2012). Esto evidencia que los estudios relacionados con la inclusión de nanopartículas de oro en el área de polímeros es estudiada, donde se evalúa su incorporación y diferentes funciones que puedan llegar a cumplir empaques para alimentos. Por otro lado existen reportes que en los cuales exponen que realizar estas incorporaciones mejoran las propiedades mecánicas (Schevchenko et al., 2008), descomposición térmica (Bueno et al., 2008) y propiedades eléctricas (Gámez de Salazar 2007).

Para realizar la mejora de las propiedades de las matrices poliméricas nanoestructuradas es necesario llevar a cabo una funcionalización o activación superficial de los nanomateriales, que permita un incremento en la energía de adhesión y así favorezca su incorporación, es decir, que lo adecuado sería

generar afinidad entre el polímero y los compuestos nano, donde se contribuye también a una excelente dispersión en las matrices poliméricas a reforzar. A pesar de que se ha realizado muchos estudios relacionados con el tema, aun quedas áreas por explorar, aquellas que puedan contribuir a la producción de materiales que reemplacen en un futuro no muy lejano a los existentes.

La presencia de nanoreforzantes influye directamente sobre la nanoestructura formada dentro de la matriz polimérica, la cual será responsable de las propiedades que adquiera en su parte microscópica el material nanoestructurado. Por otro lado, la implementación de nanopartículas de oro es costosa y no es renovable, es por esto que una buena alternativa para reforzar materiales plásticos la presentan las fibras naturales, que además de ser relativamente baratas son biodegradables.

Biopolímeros

Los biopolímeros presentan características termoplásticas como el polipropileno. La tendencia de implementar biopolímeros ha incrementado rápidamente debido a la mejora que presentan los polímeros en sus propiedades mecánicas, ventajas de procesamiento (causan una menor abrasión en el equipo de procesamiento) (Brujin., 2000), la problemática ambiental que se ha venido presentando (Kuruvilla et al., 1999), sus bajos costos y baja densidad.

El uso de materiales más amigables con el ambiente como los polímeros biodegradables, se ha visto como una de las muchas estrategias para minimizar el impacto ambiental. Los materiales biodegradables presentan características y campos de aplicaciones muy prometedores. Existen varios polímeros sintéticos que son biodegradables y compostables a la vez; sin embargo, algunos plásticos provenientes de un monómero natural, pueden perder su propiedad de biodegradarse debido a modificaciones químicas, como la polimerización. No

obstante, el uso de polímeros biodegradables se limita un poco debido a problemas que se relacionan con tratamiento, rendimiento (barrera de gas y humedad son muy pobres) y costosos (Camacho M., 2011). Mediante la aplicación de nanotecnología se abren nuevas posibilidades para mejorar no sólo las propiedades del material sino también la relación costo-precio-eficiencia (Sorrentino, A., 2007).

Los nanocompuestos a base de biopolímeros son temas de investigación en el área de la ciencia de materiales, electrónica y ciencia biomédica. Un nanobiocompuesto es un material híbrido que consiste en una matriz biopolimérica reforzado con una fibra, una plaqueta o partícula que tiene una dimensión en la escala nanométrica. Debido a las partículas de tamaño nanométrico y dispersas en la matriz biopolimérica, estos nanobiocompuestos exhiben una notable mejora en las propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y fisicoquímicas en comparación con el polímero puro o los convencionales. Esas mejoras incluyen, por ejemplo, el aumento de módulos de elasticidad, fuerza y resistencia al calor, y la disminución de la permeabilidad a los gases y a la inflamabilidad. Mediante nuevas tecnologías que se complementan con la nanotecnología y materiales sostenibles, se puede desarrollar empaques activos y bioactivos. Por lo tanto, la combinación adecuada de estos tres pilares tecnológicos proporcionará la innovación en el sector de empaque de alimentos en los próximos años (Lagaron, J.M., 2010).

Normalmente los biopolímeros se utilizan en forma de películas, los de alto peso molecular se utilizan ya que suministran una gran fuerza de cohesión y capacidad de fusión. Casi todos los biopolímeros naturales pueden ser utilizados para la preparación de películas. Las ventajas de estas películas para ser utilizadas como material de empaque se presentan en la **tabla 21** (Rhim, J., 2007).

Tabla 21. Usos y beneficios de las películas como materiales de empaque.

Mayor plazo de caducidad	Bajo costo y abundantes
Biodegradables	Posible uso de múltiples capas de materiales de empaque junto con películas no comestibles
Suplemento de valor nutricional de alimentos	Control sobre la migración de humedad, gases, líquidos y solutos
Mejora características organolépticas con olor, apariencia y sabor	Envases individuales para alimentos pequeños (nueces y pasas)
Reducción del volumen de residuos de empaques	Función de soporte de agentes antimicrobianos y antioxidantes
Incorpora antioxidantes y agentes antimicrobianos	

Fuente: (Rhim, J., 2007)

La película biopolimérica es una extensa red de interacción del mismo biopolímero en una estructura tridimensional. Las películas biopoliméricas naturales pueden ser procesadas por varios métodos. Existen dos procesos base lo cuales son: seco y húmedo, que se utilizan para su preparación (Camacho., 2011). Por otro lado, se puede definir la nanotecnología como la fabricación y utilización de estructuras con al menos una dimensión en la escala nanométrica. Las estructuras a nanoescala muestran una alta proporción de superficie-volumen, lo que es ideal para aplicaciones que involucran materiales compuestos, reacciones químicas, transporte de drogas, liberación controlada de sustancias en tecnologías de envase activo.

Los nanomateriales se pueden clasificar en tres tipos, dependiendo de las dimensiones nanométricas. Así, encontramos en dos dimensiones como las nanofibras y nanotubos de carbono que pueden conferir propiedades físicas útiles

como resistencia y rigidez para los empaques; nanocapas delgadas pueden ayudar a proporcionar mayor rendimiento de las propiedades de barrera. El recubrimiento puede ser alrededor de 50 nm de espesor clasificándolo como un nanomaterial de una dimensión. Del mismo modo, los tratamientos de las superficies de los envases de vidrio para alimentos y los envases de bebidas con organosilanos, usando plasma u otra tecnología de alta temperatura, son bastante comunes. Y por último, de tres dimensiones, como las nanopartículas que tienen un enorme potencial para liberar o capturar productos químicos. Los ejemplos incluyen nanopartículas utilizadas para la recolección de residuos en la eliminación de oxígeno o de productos químicos o nanoencapsuladas que pueden ser utilizadas para liberar aditivos como conservantes o colores en la superficie del alimento (Bradley, E.L., 2011).

Entre los principales beneficios que ofrecen los nanomateriales en general, ejemplo, las nanopartículas de oro, para ser utilizados en material de empaque se encuentran:

- Innovación: con nuevos productos se puede dar mayores posibilidades de elección a los consumidores, cambios sociales y estilos de vida así como abrir nuevos mercados, impulsando el crecimiento económico.
- Ligeros: se utiliza menos material de empaque, pero con el mismo rendimiento. Esto podría proporcionar un menor contenido en el carbono ambiental a la hora de su fabricación y transporte.
- Mayor protección y conservación de alimentos: mediante la mejora de las propiedades de barrera se puede ayudar a mantener la calidad de los alimentos y aumentar la vida útil, sin conservantes químicos adicionales.

De acuerdo a las propiedades que presentan las nanopartículas de oro como, su propiedad antimicrobial, su relación área-volumen, entre otras, semejantes a las nanopartículas de plata, esta podrían ser implementadas para la elaboración de

empaques adecuados para el transporte de alimentos. No obstante, las nanopartículas de oro no han sido estudiadas tan a fondo como las plata, aun así, su desempeño en empaques sería favorable, trayendo nuevos descubrimientos y desarrollos para la industria alimentaria, de transporte y prolongación de la vida útil de dichos alimentos. Las nanopartículas de oro podrían ser implementadas en empaques activos de alimentos o en empaques antimicrobianos de acuerdo a las propiedades y ventajas que nos ofrecen.

Empaques activos

La oportunidad de modificar la atmósfera interior del envase del producto o incluso simplemente la incorporación de determinadas sustancias en la pared del empaque ha hecho este grupo de tecnologías muy atractivas, lo que representa un área de investigación cada vez más productiva. A pesar de que los primeros desarrollos de envases activos y la mayoría de las tecnologías comercializadas consisten en tecnologías de la bolsa, que hacen uso de una pequeña bolsa permeable que contiene el principio activo que se inserta dentro del paquete, las tendencias actuales tienden hacia la incorporación de principios activos directamente en la pared del envase.

Los polímeros, y en particular los derivados de la biomasa, son los materiales preferidos para el empaque activo debido a sus propiedades intrínsecas, que constituyen un soporte ideal para los principios activos, con la ventaja de ser ajustables en términos de liberación controlada y la posibilidad de combinar varios polímeros a través de fusión o de múltiples capas por extrusión (Camacho et al., 2011).

Empaques antimicrobianos

En segunda instancia se encuentran los empaques antimicrobianos que presentan objetivo principal el control de microorganismos indeseables en los alimentos mediante la incorporación o depósito de sustancias antimicrobianas en o sobre los materiales de embalaje. El principio de acción de los envases antimicrobianos se basa en la migración de liberación controlada de las especies biológicas a la fase líquida y/o la cámara de aire o por contacto directo, esta última hace referente a como actuaría la presencia de dichas nanopartículas de oro.

Otra opción es el uso, dentro de los plásticos y sustratos de cerámica, de sistemas sobre bases biológicas, metales, extractos naturales y otros principios. Esta se encuentra disponible comercialmente por una empresa de nanotecnología con el nombre comercial general de NanoBioTer®. La nanodispersión de estos sistemas en materiales plásticos y bioplásticos conduce a las sinergias con otras propiedades mientras conserva la transparencia y otras propiedades de la matriz polimérica.

También de especial interés es el polímero de quitosano de base biológica. Este sistema ha sido ampliamente investigado; pero no fue hasta hace poco que la fenomenología del polisacárido y sus propiedades biológicas se entienden con mayor claridad, y métodos adecuados de caracterización puestos en marcha con el fin de optimizar la capacidad biológica de este polímero en aplicaciones de envasado de alimentos y recubrimiento. Sin embargo, los nanocompuestos más comunes utilizados como películas antimicrobianas para el empaque de alimentos se basan en la plata, que es bien conocida por su fuerte toxicidad para una amplia gama de microorganismos, con estabilidad a altas temperaturas y baja volatilidad (Lagaron, J.M., 2010), a su vez se ha descubierto que las nanopartículas de oro presentan propiedades antimicrobiales (Ali et al., 2011; Ghosh et al., 2012; Muthuvel et al., 2014; Uma Suganya et al., 2014; Huang et. Al., 2007), las cuales

se podrían implementar, así como las nanopartículas de plata, en los empaques activos de alimentos con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos, los cuales ayudan a descomponer los alimentos perecederos almacenados.

Aplicación de nanocompuestos

Un nanocompuesto formado por una película antimicrobiana es particularmente deseable debido a su integridad estructural y aceptables propiedades de barrera impartida por la matriz del nanocompuesto y las propiedades antimicrobianas aportadas por los agentes antimicrobianos naturales impregnados en su interior.

Teniendo en cuenta la rápida evolución en este ámbito y la naturaleza global de las empresas internacionales de los alimentos, no es razonable anticipar que el empaque de alimentos que se mejora con las nanopartículas, podrían comenzar a aparecer en muchos otros mercados en los próximos años.

Una de las primeras aplicaciones que surgen en el mercado son los nanocompuestos de polímero con nanopartículas de arcilla. El mineral de las nanopartículas de arcilla utilizado en estos nanocompuestos es la montmorillonita (también conocido como bentonita); es una arcilla natural, comúnmente obtenida a partir de cenizas volcánicas / rocas. Otros nanocompuestos de polímero se le han incorporado nanopartículas de metales (óxidos) o nanocelulosa. Estos aditivos se pueden comprar libremente en el mercado.

Otros ejemplos de alta tecnología incluyen revestimientos de nanocompuestos híbridos orgánicos-inorgánicos de los precursores de híbridos y sistemas de sol-gel. Algunas capas son producidas utilizando la tecnología de plasma atmosférico con descargas de barrera dieléctrica. Otros, como los híbridos polímero de silicona, se fabrican mediante procesos sol-gel. Estos sistemas son de propiedad y los costes de desarrollo no se hacen públicos (Bradley E., et al., 2011).

Seguridad para los seres humanos y el medio ambiente

Hay dos temas de relevancia, el primero es la seguridad alimentaria, la calidad y el impacto potencial sobre los consumidores. El segundo es acerca del impacto ambiental; inicialmente en la producción del material de embalaje, pero también cuando se desechan. Una de las preguntas es, si se hace posible el reciclaje cuando se utilizan los nanomateriales o si se pondría en peligro el funcionamiento de los sistemas de reciclaje existentes.

En la actualidad, con base en consideraciones teóricas y el carácter fijo o integrado de las nanopartículas en el empaque de alimentos, la expectativa es que no es probable la migración y se plantea un riesgo significativo para el consumidor. Pero no tenemos las herramientas analíticas de medición para confirmar esta predicción (Tiede, K., 2008). Hay una falta de conocimiento sobre el impacto de los nanomateriales en la eliminación de los flujos de residuos. Estos incluyen la reutilización, el reciclado, incineración para recuperación de energía y relleno simple. La pregunta específica sobre el reciclaje y embalaje, si los nanomateriales se utilizan en los plásticos, papel o vidrio o metal, es que la recuperación existente y los procesos de reciclado de estos materiales sea capaz de hacer frente. Cualquiera que sea la ruta elegida, la eliminación de residuos o la recuperación para el reciclaje es importante ya que debe abordarse el destino de los nanomateriales cuando son expuestos a las interacciones del medio ambiente.

Por el momento, el único ejemplo de la aprobación previa a la comercialización fue de las nanopartículas de nitruro de titanio utilizado en botellas de PET (tereftalato de polietileno). La base de la evaluación fue que el nitruro de titanio es químicamente inerte y completamente insoluble en todos los alimentos y simulantes de alimentos. Por otra parte, las nanopartículas de nitruro de titanio no migran del plástico a niveles detectables y por lo tanto, ya que no hubo exposición,

los datos toxicológicos para esta aplicación no se requieren (Camacho et al., 2011).

De acuerdo a sus propiedades, las nanopartículas se han desempeñado en diferentes áreas ambientales como el agua y suelo, es por eso que se desea ver su desempeño en el área de empaques para alimentos, en donde se identifique la problemática y beneficios que puedan brindar. Es por eso que se realizó el presente trabajo de grado, con el fin de encontrar nuevas alternativas de uso y descubrir aplicaciones de dichas nanopartículas, donde se favorezca el ambiente y la sociedad.

En la **tabla 22-24** se exponen las ventajas, desventajas y aspectos ambientales que implicaría la incorporación de las nanopartículas de oro tanto en polímeros sintéticos como en biopolímeros. Se evidencia que a pesar de ser ambientalmente recomendable la implementación de biopolímeros para la incorporación de nanopartículas de oro, estos biopolímeros no presentan las características adecuadas para la elaboración del empaque. Es por esto que se recomienda la utilización de polímeros sintéticos con la incorporación de nanobiocompuestos que mejoren las características de los empaques de alimentos y la problemática ambiental que un está en estudio.

Tabla 22. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro en empaques elaborados con polímeros sintéticos.

POLÍMEROS SINTÉTICOS			
Sin nanopartículas		Con nanopartículas	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
- Reciclado.	- No biodegradables	- No presenta pérdidas de las características principales como s baja densidad	- De alto costo (incorporación y empaque).
- Pos-moldeado	- Polímeros más costosos que biopolímeros	- Pueden ser adicionadas nanoarcillas, nanotubulos de carbono y partículas metálicas.	- El material puede sufrir modificaciones de sus propiedades mecánicas como módulos de elasticidad y elongación.
-Dureza		- La incorporación favorece para ampliar la gama a nuevas aplicaciones posibles	- Quedan áreas de exploración a pesar de los estudios realizados.
		- Mejoran propiedades mecánicas, descomposición térmica y propiedades eléctricas.	- No biodegradable.
		- Gran demanda en el mercado por facilidad de procesamiento.	

Fuente: Autor.

Tabla 23. Aplicabilidad de las nanopartículas de oro en empaques elaborados con biopolímeros.

BIOPOLÍMEROS					
Sin nanopartículas		Con nanopartículas		Nanobiocompuestos	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
- Biodegradables	- Propiedades de barrera pobres (gases y humedad).	- Empaques biodegradables (amigables con el ambiente), mejora la problemática ambiental que se ha venido presentando.	- Área poco explorada.	- Esas mejoras en el aumento de módulos de elasticidad, fuerza y resistencia al calor, y la disminución de la permeabilidad a los gases y a la inflamabilidad.	- Nanopartículas no biodegradables
Económico por su fácil obtención (fuentes naturales)	- Un poco limitado por problemas relacionados con tratamiento y rendimiento.	- Mediante nuevas tecnologías con la nanotecnología y materiales sostenibles, se puede desarrollar empaques activos y bioactivos	- Nanopartículas no renovables.	- Exhiben una notable mejora en las propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y fisicoquímicas en comparación con el polímero puro o los convencionales.	- Utilización de matriz polimérica sintética como fuente principal
	- La elaboración de empaques es costoso.	- Baja densidad		- Empaque más biodegradable.	Alto costo en la implementación
		Aplicaciones muy prometedoras. (Buenas)		- Se puede desarrollar empaques activos y bioactivos.	
		Causan una menor			

		abrasión en el equipo de procesamiento.			
--	--	---	--	--	--

Fuente: Autor.

Tabla 24. Aplicabilidad de las nanopartículas – Estudios y situación ambiental.

ESTUDIOS	SITUACIÓN AMBIENTAL
<p>Se informó por Castro et al., 2012 sobre la incorporación selectiva de nanopartículas de oro dentro de la membrana de polimerosomas. Los polimerosomas fueron fabricados a partir de copolímero de dibloque de polibutadieno–bloque–poli (óxido de etileno) empleando un proceso de doble emulsión.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Se hace posible el reciclaje cuando se utilizan los nanomateriales? 2. ¿Afectaría a la salud humana el uso de nanomateriales?
<p>Nanopartículas de nitruro de titanio utilizado en botellas de PET. Debido a que el nitruro de titanio es químicamente inerte y completamente insoluble en todos los alimentos y simulantes de alimentos. las nanopartículas de nitruro de titanio no migran del plástico a niveles detectables. y por lo tanto, ya que no hubo exposición, los datos toxicológicos para esta aplicación no se requieren (Camacho et al., 2011).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - se plantea un riesgo significativo para el consumidor. - Hay una falta de conocimiento sobre el impacto de los nanomateriales en la eliminación de los flujos de residuos. (Incluyen: reutilización, reciclado, incineración para recuperación de energía y relleno simple)
<p>Los nanocompuestos más comunes utilizados como películas antimicrobianas para el empaque de alimentos se basan en la plata, que es bien conocida por su fuerte toxicidad para una amplia gama de microorganismos, con estabilidad a altas temperaturas y baja volatilidad (Lagaron, J.M., 2010)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cualquiera que sea la ruta elegida, la eliminación de residuos o la recuperación para el reciclaje es importante, debido a que hay que darle el mejor tratamiento o disposición a los nanomateriales con el fin de evitar inconvenientes con la salud humana y del ambiente.

Fuente: Autor.

5. CONCLUSIONES

- ✚ Las hojas de los extractos de Guanábana, Tamarindo y Mango y Guayaba fueron seleccionadas como el material vegetal adecuado para la síntesis de nanopartículas de oro, debido a que contenían mayor cantidad de compuestos aromáticos y flavonoides en comparación a las cascaras de los extractos. La sección se basó en los resultados de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG/MS), cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos (HPLC/DAD) e infrarrojo (FTIR).
- ✚ La síntesis de nanopartículas de oro a partir de los extractos de las hojas de Tamarindo y Mango presentaron variación de color y una longitud de onda característica dentro del rango de los 540 nm a 570 nm. Estos resultados indican que la formación de nanopartículas de oro es efectiva y que presentan un tamaño aproximado entre los 10 nm a 150 nm. Los extractos naturales de las hojas de Guayaba y Guanábana no evidencian la formación de nanopartículas de oro.
- ✚ En el presente trabajo se evaluó la propiedad anti-microbial de la nanopartículas de oro sintetizadas con extractos de hojas de Mango y Tamarindo por medio de tres metodologías, en donde se demuestra que las nanopartículas de oro no presentan una propiedad antimicrobial, debido a la baja concentración de la solución.
- ✚ Las nanopartículas de oro pueden ser incorporadas en biopolímeros como fuente principal, esto es una alternativa amigable con el ambiente, pero no es viable debido a sus desventajas relacionadas con sus propiedades de barrera (rendimiento) y el costo que implica la elaboración de un empaque derivado de esta matriz.

- ✚ La implementación las nanopartículas de oro se puede realizar en dos matrices poliméricas (polímeros sintéticos y biopolímeros). Esta incorporación es de suma importancia para la industria alimenticia, debido a que sería un área de trabajo e implementación de las nanopartículas de oro donde se destaca su propiedad anti-microbial, la cual funcionaría como agente inhibidor de microorganismos en los alimentos almacenados.

6. RECOMENDACIONES

- ✚ Sería adecuado realizar un análisis por microscopía electrónica de barrido para observar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas con los extractos de plantas implementados en el proyecto, y corroborar la formación de nanopartículas de oro para el extracto de hojas de Guayaba y Guanábana.
- ✚ Es recomendable trabajar una concentración de solución de nanopartículas entre los 45 mg/ml para poder inhibir el crecimiento de microorganismos como lo reporta la literatura, y si fuera necesario realizar un segundo lavado con solvente orgánico en la centrifugación con el fin de eliminar compuestos orgánicos terminales que disminuyan el área superficial activa de las nanopartículas.
- ✚ Para implementar las nanopartículas de oro en empaques de alimentos es necesarios realizar un estudio de toxicología, en el cual se muestre los posibles problemas que se puedan presentar en los seres humanos si se llegan a ingerir las nanopartículas o los daños que traería al ambiente.
- ✚ Lo recomendado por ahora sería realizar la incorporación de nanobiocompuestos que mejoren la biodegradabilidad de los empaques de alimentos y sus características físicas en polímeros sintéticos. Esto presentaría beneficios para la industria alimentaria y de transporte de alimentos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. (2009). Síntesis y caracterización de nano-partículas de plata: Efecto sobre *Colletotricum gloesporioides*. Tesis Mag.Sc. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. 90 p.
- Alberto Corzo Lucioni. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS POR REDUCCIÓN DE H[AuCl]. 2012. Rev Soc Quím Perú. 78 (2).
- Ali DM, Thajuddin N, Jeganathan K, Gunasekaran M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;85:360–5
- Al-qadi, S., Remunan-Lopez, C. (2009). Nanopartículas metálicas: oro. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/994/1028>
- Anastas PT, Zimmerman JB. Green nanotechnology. 2007. Why we need a green nano award and how to make it happen. Washington DC: Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- Arizaga, N., Ibarz, G., Piñol, R. (2010). *Journal of Colloid and Interface Sci.* vol. 348 p.832
- Armendariz V, Herrera I, Peralta-Videa JR, Jose-Yacaman M, Troiani H, Santiago P. Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: use of plants in nanobiotechnology. *J Nanopart Res* 2004;6:377–82.
- ASOHOFrucol. ASOCIACION HORTIFRUTICOLA DE COLOMBIA de www.asohofrucol.com.co
- Aswathy Aromal S, Philip D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochim. Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2012;97:1–5.

- Bar H, Bhui DK, Sahoo GP, Sarkar P, De SP, Misra A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids Surf A* 2009;339:134–9
- Barrera, C., Herrera, A., Rinaldi. C. (2009). *Journal of Colloid and Interface Sci.* vol. 329, p.107.
- Bartram J et al. (eds.), 2003: Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing.
- Bower, C., L. Jin y O. Zhou. 1998. Alignment of carbon nanotubes in a polymeric matrix by mechanical stretching. *Applied physics letter*, 73, pp 1199
- Bradley, E.L., Castle, L., Chaudhry, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. *Trends in Food Science & Technology* (2011).
- Brujin, J. 2000. Natural fiber mat thermoplastic products from a process point of view. *Applied Composite Materials*. 7, 415-420.
- Castro, e., Taboada, P., Mosquera, V., (2012). POLIMEROSOMAS DE POLI(BUTADIENO)–BLOQUE–POLI(ÓXIDO DE ETILENO) CARGADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 13(3)*.
- Coulson, J.M. y J.F. Richardson. “Ingeniería Química. Tomo II. Operaciones básicas”. Editorial Reverté, Barcelona, 1988
- Chunekar, K., 2010. Bhavprakash Nighantu. Chaukhambha Bharati Academy, pp.33–34.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 2006;6:662–8
- Chrissafis, K., K. M. Paraskevopoulos, A. Jannakoudakis, A. Bikiaris, A. Vassiliou y A. Docolis. 2008. Effect of acid treated multiwalled carbon

nanotubes on the mechanical, permeability, thermal properties and thermooxidative stability and stability, 93(5), pp. 952-967.

- Dahl JA, Maddux BLS, Hutchison JE. Toward greener nanosynthesis. *Chem Rev* 2007;107:2228–69.
- De Azeredo, H. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 42 (2009) 1240-1253.
- Duran N, Seabra AB. Metallic oxide nanoparticles: state of the art in biogenic syntheses and their mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;95:275–88
- Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, Verma M. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2012;32:49–73
- Funari S.S., M. Motovilina, T. Schubert, N. Stribeck, Z. Denchev y N. Dencheva. 2010. Nanostructure and mechanical properties studied during dynamical straining of microfibrillar reinforced HDPE/PA blends. *Journal of polymer science B*, 48(3), pp. 237-250.
- Flores-González, M., Villabuena-Ibáñez, M., and Bazzi, R. 2009. Preparación de nanopartículas y nanoestructuras luminiscentes de γ -O₃: Eu³⁺, Tb³⁺ usando el método poliol. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* V. 48, 3, 141-146.
- Goodwin, T.W. 1971. *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Londres.
- Gonzalez-Valades, A., J. M. Cervantes-Uc, R. Olaya Y P. J. Herrera-Franco. 1999. Effect of fiber surface treatment on the fiber-matrix bond strength of natural fiber reinforced composites. *Composites*, 30, pp. 309-320.
- Ghosh S, Patil S, Ahire M, Kitture R, Kale S, Pardesi K, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation

of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int J Nanomed* 2012;7: 483–96.

- Henley, E.J. y Seader, J.D. “Operaciones de separación por etapas de equilibrio en Ingeniería Química”. Reverté, Barcelona. 1988.
- Hermann Morrill Curtin Fuson. (2004). *The Systematic Identification of Organic Compounds*. United States of America. John Wiley & Sons Inc. pp. 22-132.
- Hernández Pérez., (2005). CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA. EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO. *Ed Cont Lab Clin.* 8:49-62
- Huang JL, Li QB, Sun DH, Lu YH, Su YB, Yang X, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 2007;18. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>. [article 105104]
- Huang X, Wu H, Pu S, Zhang W, Liao X, Shi B. One-step room-temperature synthesis of Au@Pd core–shell nanoparticles with tunable structure using plant tannin as reductant and stabilizer. *Green Chem* 2011;13:950–7
- Hutchison JE. Greener nanoscience: a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. *ACS Nano* 2008;2:395–402
- Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem* 2011;13:2638–50
- Kearns, J. C. y R. L. Shambaugh. 2002. Polypropylene fibers reinforced with carbon nanotubes. *Journal of Applied Polymer Science* 86(8), pp. 2079-2084.
- Kumar Mittal, A., Yusuf Chisti., Chand Banerjee, U. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* 31, 346–356.

- Kumar V, Yadav SK. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. J Chem Technol Biotechnol 2009;84:151–7
- Kuruvilla, J., Romildo, F., Beena, J., Sabu, T., Hecker, L. 1999. A review on fiber reinforced polymer composite. Revista Brasileira de Engenharia Agricola e Ambiental. 3, 367-379.
- Lagaron, J.M., López-Rubio, A. Latest Developments and Future Trends in Food Packaging and Biopackaging. Innovation in Food Engineering. New Techniques and Products. 2010.
- Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. J Nanomater 2011. [article 270974]
- Lim, Y. T., J. W. Lee y O. Park. 2000. Thermal characteristics of organoclay and their effects upon the formation of polypropylene/organoclay nanocomposites. Polymer Bulletin, 45(2), pp.191-198.
- Luangpipat T, Beattie IR, Chisti Y, Haverkamp RG. Gold nanoparticles produced in a microalga. J Nanopart Res 2011;13:6439–45.
- Mahalik, N & Nambiar, A. Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. Trends in Food Science & Technology, Volume 21, Issue 3, March 2010, 117- 128.
- Marrero D et al., (2006). Guía para la Identificación de las Bacterias más frecuentes en el Laboratorio de Microbiología Clínica. http://www.hvil.sld.cu/bvs/archivos/215_guia%20para%20la%20identificacio%20de%20las%20bacteria.pdf
- Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., Haza, A. 2013. Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro Gold nanoparticles: Applications and in vitro cytotoxicity. Acta Toxicol. Argent. (2013) 21 (2): 102-109
- Martinez, S., González, J., Culebras, J., Tuñón, M., (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. XVII (6) 271-278.

- Mukunthan K, Balaji S. Cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) speeds up the synthesis of silver nanoparticles. *Int J Green Nanotechnol* 2012;4:71–9.
- Muthuvel, A., Adavallan, K., Balamurugan, k., Krishnakumar, N., (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4: 325–332
- Nazeruddina G.M., Prasada N.R., Prasadd S.R., Shaikha Y.I., Waghmare S.R., Parag Adhyapak. *Coriandrum sativum* seed extract assisted in situ green synthesis of silver nanoparticle and its anti-microbial activity. *Industrial Crops and Products* 60 (2014) 212–216.
- Nirmal, U., Hashim, J., Ahmad M.M.H, M. 2014. A Review On Tribological Performance Of Natural Fibre Polymeric Composites. National Defence University of Malaysia, Faculty of Engineering and Technology, Multimedia University. Manuscript
- OPdl., S. (2010). Recuperado el 24 de Agosto de 2014, de www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/04.pdf.
- Paul, D.R. y L. M. Robenoson 2008. Polimer nanotechnology: nanocomposites. *Polmer* 49(15), 3187-3204.
- Rajesh S, Raja DP, Rathi JM, Sahayaraj K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata* (Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J Biopest* 2012;5:119–28.
- Rhim, J. W., & Ng, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (2007). 47(4), 411–433
- Rico-Moctezuma, A. R. Vilchis-Nestor, V. Sánchez-Mendieta. (2010). Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus-indica*. ©Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales. *Superficies y Vacío* 23(S) 94-97.

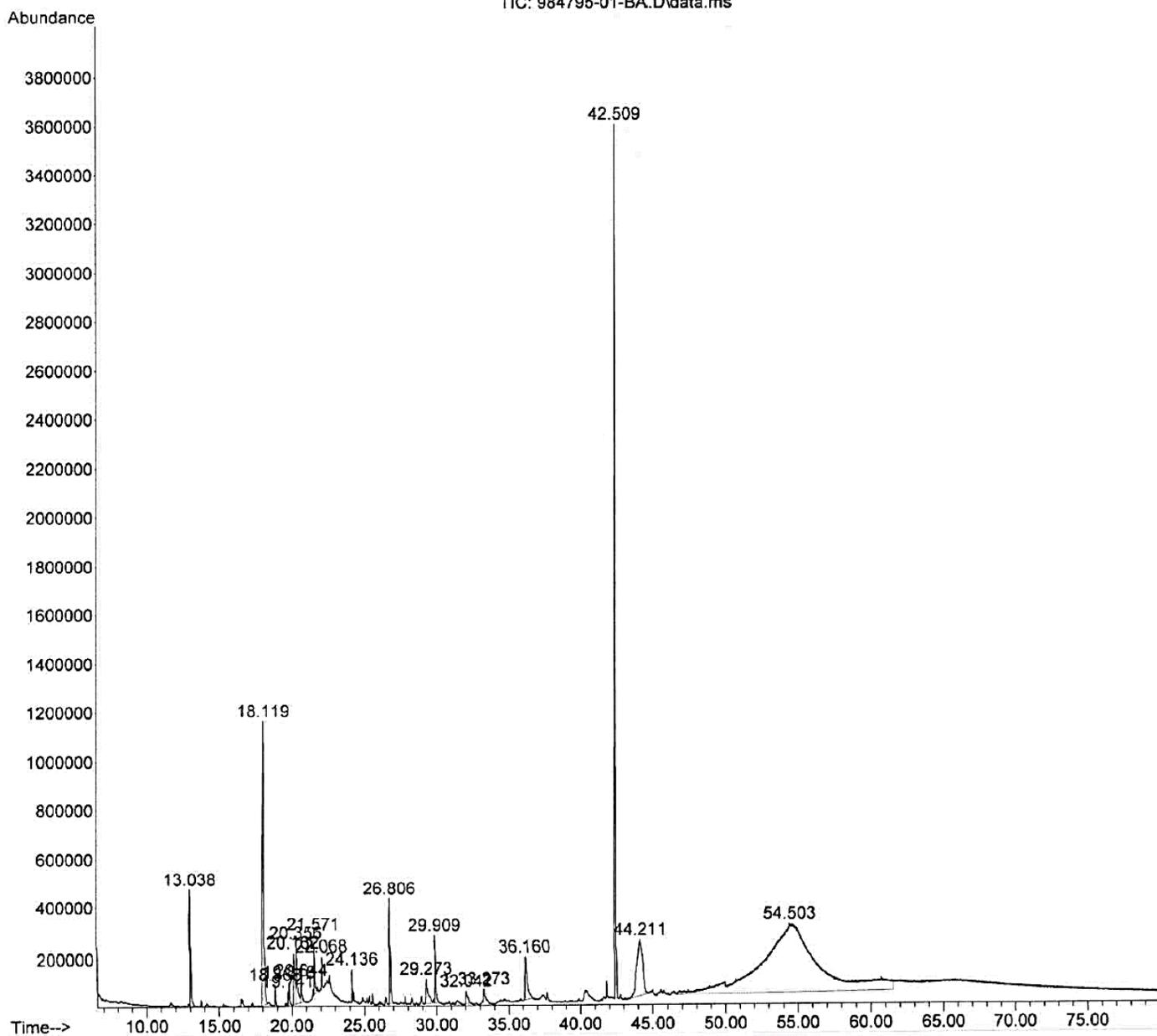
- Robert E. Treybal, Operaciones de Transferencia de Masa, McGraw Hill 1980 (ISBN968-6046-34-8)
- Sarmiento C. y Trujillo M. Estabilización e implementación de las técnicas en el diagnóstico clínico de micosis cutáneas en el laboratorio de micología de la Pontificia Bolivariana Javeriana. Bogotá, 2006, trabajo de grado (Bacteriología). Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de ciencias.
- Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci* 2003;85:162–70.
- Sathishkumar M, Sneha K, Won S, Cho CW, Kim S, Yun YS. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009b;73:332–8
- Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:496–502
- Sorrentino, A., Gorrasi, G., & Vittoria, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, (2007) 18(2), 84–95.
- Sujitha MV, Kannan S. Green synthesis of gold nanoparticles using citrus fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2013;102:15–2
- Tangarife V. 2011. *Fusarium spp.* Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia
<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100813>.
- Tiede, K. – Boxall, A. B. A. – Tear, S. P. – Lewis, J. – David, H. – Hassellöv, M.: Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives and Contaminants*, 25, 2008, pp. 795–821

- Treybal, Robert. Operaciones de transferencia de masa. Segunda edición. 1988.
- Villada, H., Acosta, H., Velasco, R., BIOPOLÍMEROS NATURALES USADOS EN EMPAQUES BIODEGRADABLES. 2007. TEMAS AGRARIOS - Vol. 12:(2), (5 - 13)
- Wu, L., Hu, Y., Ye, M., Shen, J., Huang, W. 2007. Thermophysical properties of epoxy nanocomposites reinforced with aminofunctionalized multi-walled carbon nanotubes. Composites Part A: Applied Sciences and Manufacturing, 38(5), 1331-1336.
- Zerbini, E., Cardoso, M., Sequeira, M., Taher, H. (1999). UTILIDAD DE LA CROMATOGRAFIA GASEOSA PARA LA IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS. MEDICINA (Buenos Aires); 59: 453-458.

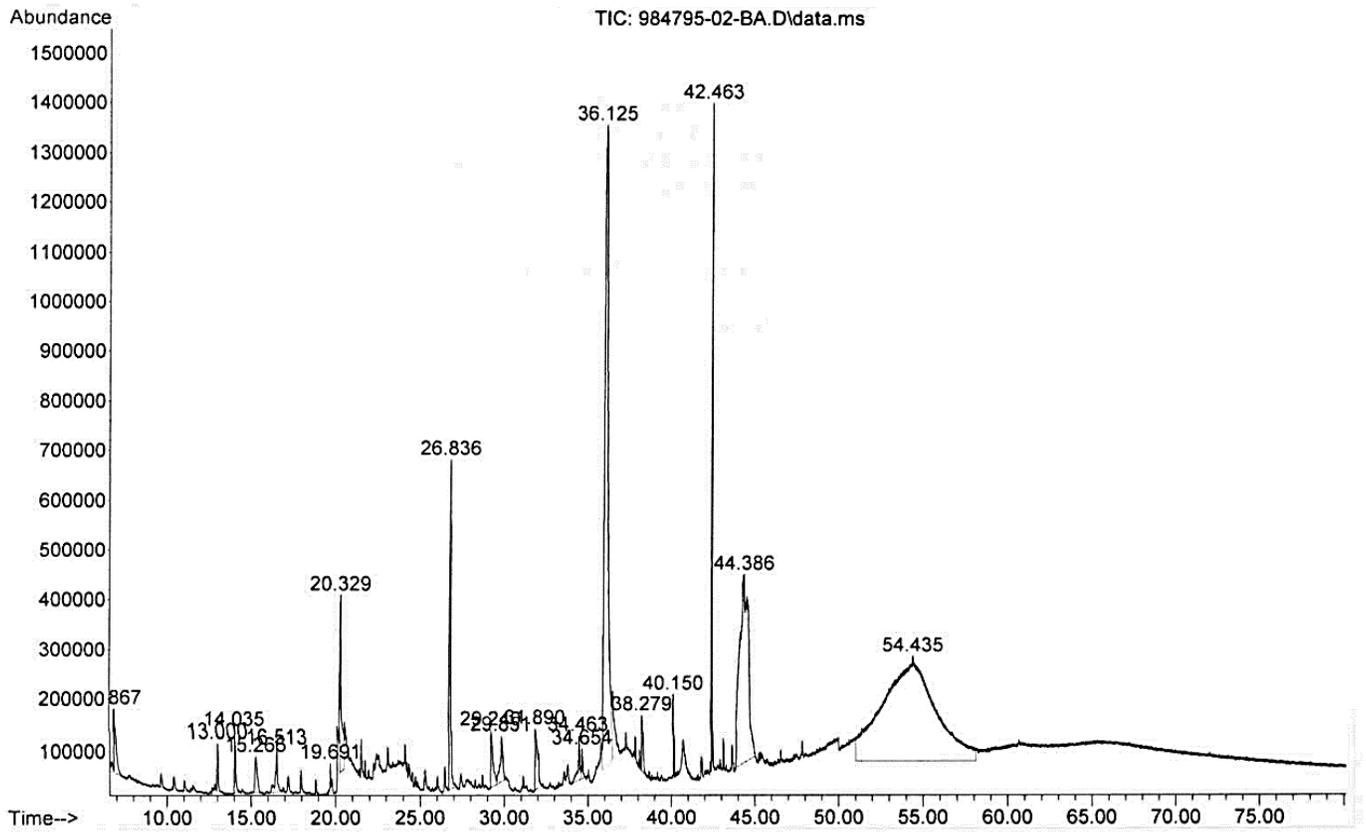
Anexo A. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) de la muestra de cascaras de Mango (CG-MS).

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	13.038	2379	2412	2523	BB 2	462350	20660022	8.53%	3.205%
2	18.119	4231	4311	4385	BV 2	1150630	71550935	29.54%	11.101%
3	18.868	4532	4591	4649	BB 3	82266	2577104	1.06%	0.400%
4	19.741	4898	4917	4929	VV 2	59166	1572934	0.65%	0.244%
5	19.818	4929	4946	5018	VB 5	94572	3791987	1.57%	0.588%
6	20.162	5022	5075	5120	BV 2	202363	11664777	4.82%	1.810%
7	20.356	5120	5147	5226	VV 2	236495	13809925	5.70%	2.143%
8	20.644	5226	5255	5338	VB 7	90466	5397238	2.23%	0.837%
9	21.571	5574	5601	5659	PV 2	235763	9194339	3.80%	1.426%
10	22.068	5733	5787	5838	BB 2	128310	4572911	1.89%	0.709%
11	24.136	6501	6560	6589	BV 2	130073	3861707	1.59%	0.599%
12	26.806	7489	7558	7651	BB 4	425783	18534976	7.65%	2.876%
13	29.273	8395	8480	8642	BV 3	100772	11105936	4.59%	1.723%
14	29.909	8677	8718	8801	VB 5	267554	13519756	5.58%	2.098%
15	32.042	9254	9306	9382	BB 2	53720	4505049	1.86%	0.699%
16	33.273	9536	9640	9698	BB 8	54258	3554967	1.47%	0.552%
17	36.160	10371	10422	10558	BB 3	172491	18869848	7.79%	2.928%
18	42.509	12085	12143	12177	BB	3609705	119567463	49.37%	18.551%
19	44.211	12357	12605	12739	BV 5	221276	64033705	26.44%	9.935%
20	54.503	14720	15132	15595	M9	191602	242202121	100.00%	37.577%

Sum of corrected areas: 644547699



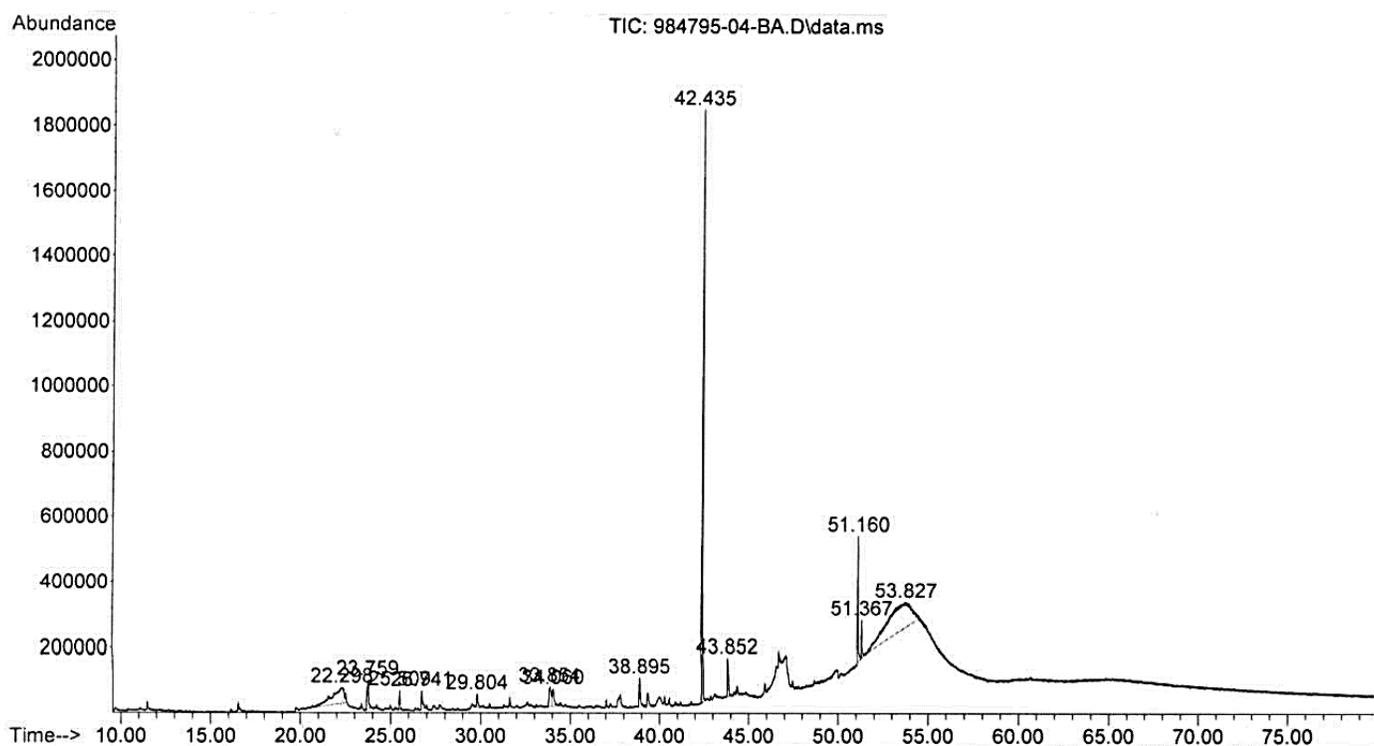
Anexo B. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) de la muestra de hojas de Mango (CG-MS).



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	6.867	84	106	277	PB	119456	11059891	5.14%	1.498%
2	13.000	2377	2398	2453	BB 3	94969	4173325	1.94%	0.565%
3	14.035	2719	2785	2872	BB 5	120752	5937779	2.76%	0.804%
4	15.266	3171	3245	3355	BB 2	70870	6710443	3.12%	0.909%
5	16.513	3547	3711	3802	BB 5	85751	7291487	3.39%	0.987%
6	19.691	4800	4899	4915	BV 3	46280	638985	0.30%	0.087%
7	20.329	5103	5137	5206	M2	350275	23232985	10.79%	3.146%
8	26.836	7503	7569	7670	BB 2	656124	38021247	17.67%	5.149%
9	29.240	8410	8467	8584	BV	109385	9919048	4.61%	1.343%
10	29.851	8584	8696	8761	VV	85301	10017718	4.65%	1.357%
11	31.890	9214	9265	9353	BB 3	116685	12597387	5.85%	1.706%
12	34.463	9826	9962	9993	BV 5	84324	6528231	3.03%	0.884%
13	34.654	9993	10014	10060	VB 5	58022	2909457	1.35%	0.394%
14	36.125	10336	10413	10506	VV 2	1285303	198884849	92.41%	26.934%
15	38.279	10964	10996	11072	PB 3	110751	7050586	3.28%	0.955%
16	40.150	11447	11504	11521	BV	166290	4640009	2.16%	0.628%
17	42.463	12104	12131	12174	VB	1314118	35886704	16.67%	4.860%
18	44.386	12507	12652	12819	M6	376156	137698562	63.98%	18.648%
19	54.435	14482	15117	15520	M9	153596	215222761	100.00%	29.146%

Sum of corrected areas: 738421452

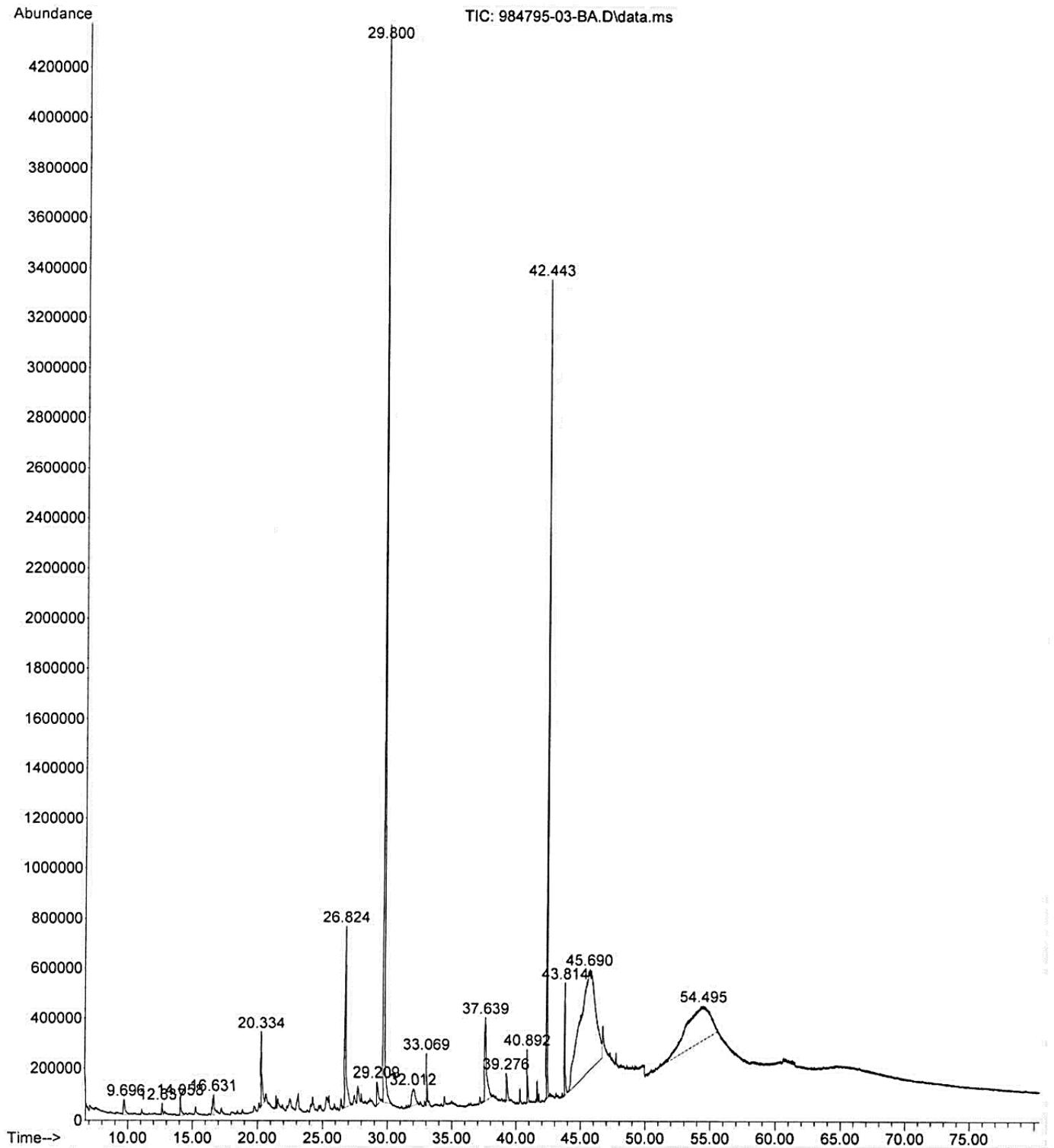
Anexo C. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) de la muestra de cascaras de Guanábana (CG-MS).



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	22.298	5209	5873	5980	M4	47947	23206894	30.37%	11.862%
2	23.759	6372	6419	6484	BB 3	85264	5561100	7.28%	2.843%
3	25.509	7058	7073	7086	M3	57917	1626399	2.13%	0.831%
4	26.741	7501	7533	7584	M2	53913	2406642	3.15%	1.230%
5	29.804	8644	8678	8757	M3	40411	2245594	2.94%	1.148%
6	33.854	9765	9797	9828	M2	60590	4470566	5.85%	2.285%
7	34.060	9830	9853	9883	M4	53328	4083221	5.34%	2.087%
8	38.895	11129	11163	11226	BB 2	88022	4612272	6.04%	2.358%
9	42.435	12082	12123	12158	BB	1803527	51123712	66.90%	26.132%
10	43.852	12467	12507	12548	BB 2	114273	4735574	6.20%	2.421%
11	51.160	14380	14421	14441	BV 2	386919	11373372	14.88%	5.813%
12	51.367	14441	14465	14487	VB 2	114928	3775193	4.94%	1.930%
13	53.827	14520	14988	15134	BB 2	73573	76419075	100.00%	39.061%

Sum of corrected areas: 195639615

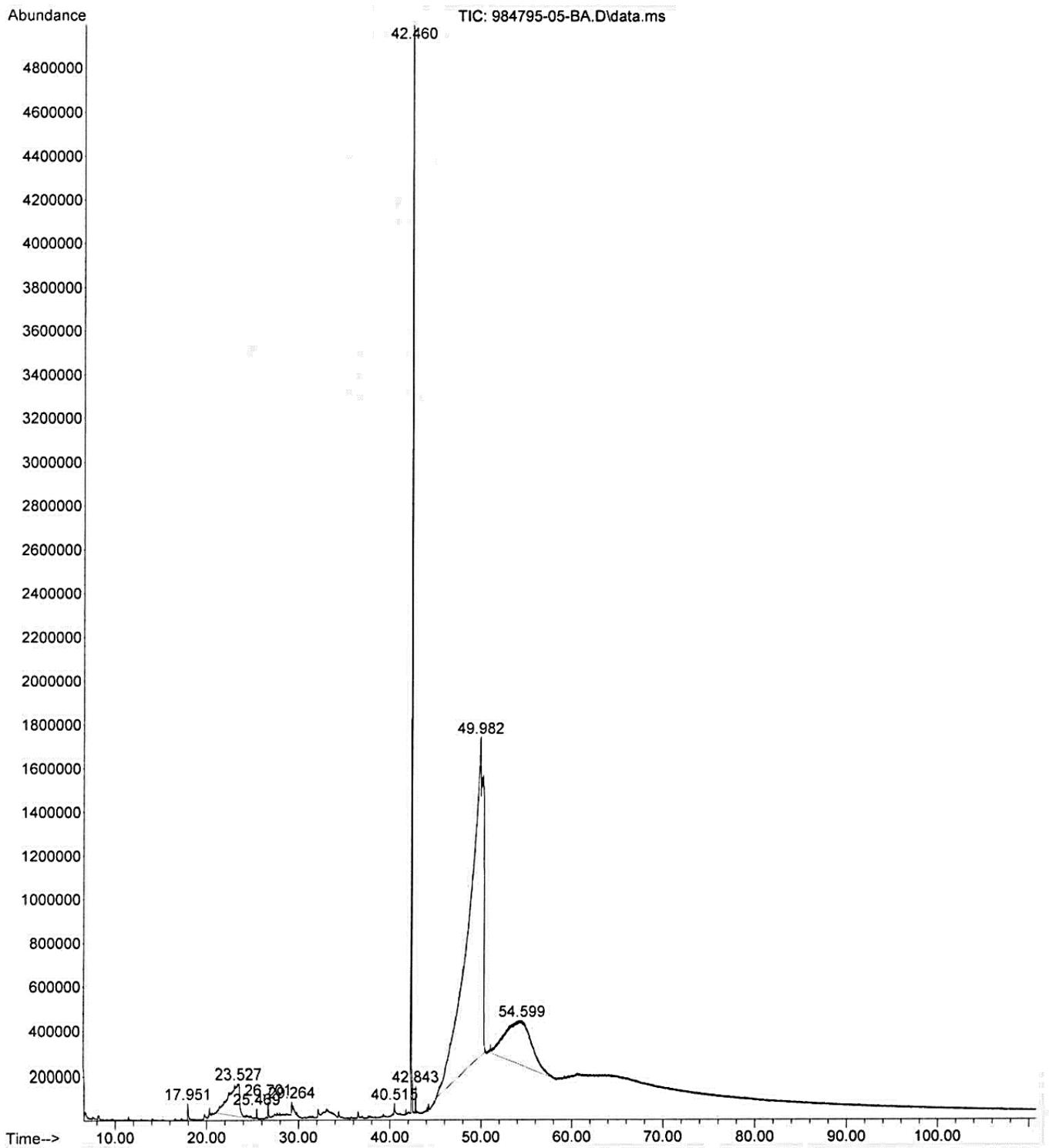
Anexo D. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) de la muestra de hojas de Guanábana (CG-MS).



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.696	1127	1163	1320	M3	61566	5641322	1.67%	0.542%
2	12.637	2231	2262	2314	M2	45000	1972661	0.58%	0.190%
3	14.058	2741	2793	2880	M5	67812	4297949	1.27%	0.413%
4	16.631	3734	3755	3773	M2	83494	3860308	1.14%	0.371%
5	20.334	5097	5139	5219	BV 2	291364	15281717	4.52%	1.469%
6	26.824	7440	7565	7718	VB 5	720888	51406943	15.21%	4.943%
7	29.209	8414	8456	8546	BV 4	89474	7645773	2.26%	0.735%
8	29.800	8620	8677	8830	BB 2	4318344	227636335	67.35%	21.889%
9	32.012	9172	9298	9394	BB 4	65776	12114883	3.58%	1.165%
10	33.069	9564	9584	9642	BB 3	202241	7476080	2.21%	0.719%
11	37.639	10740	10823	10949	BB 2	324902	35003613	10.36%	3.366%
12	39.276	11242	11267	11327	BB 2	107650	6405716	1.90%	0.616%
13	40.892	11594	11705	11740	BB 2	211590	7300421	2.16%	0.702%
14	42.443	12043	12125	12146	BV	3121079	111767607	33.07%	10.747%
15	43.814	12453	12497	12541	BB 2	449686	17432615	5.16%	1.676%
16	45.690	12553	13005	13279	BV 7	402432	337973507	100.00%	32.498%
17	54.495	14250	15130	15358	BB 10	136737	186754486	55.26%	17.958%

Sum of corrected areas: 1039971934

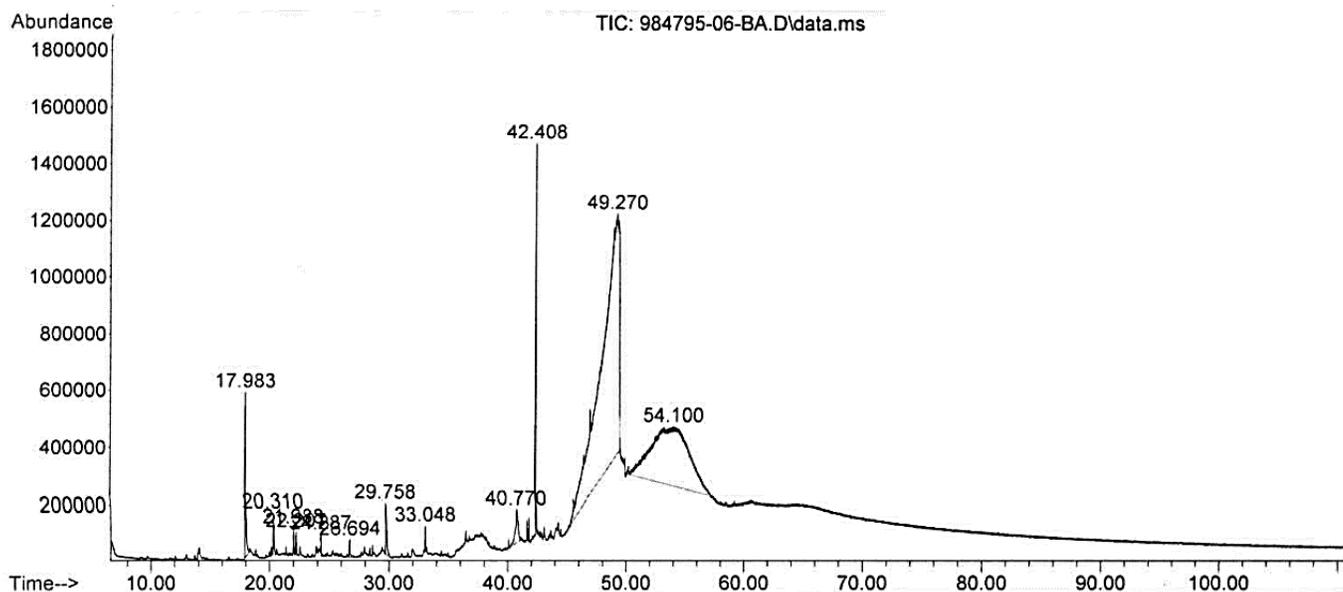
Anexo E. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) de la muestra de cascaras de Tamarindo (CG-MS).



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	17.951	4176	4248	4338	BB 2	72284	3935872	0.25%	0.168%
2	23.527	5379	6332	6518	M3	145701	122694640	7.70%	5.239%
3	25.469	7037	7058	7100	M3	44743	1437444	0.09%	0.061%
4	26.701	7467	7518	7579	BB 3	81519	3426341	0.22%	0.146%
5	29.264	8441	8477	8522	BV 3	44493	2343953	0.15%	0.100%
6	40.515	11495	11602	11650	BB 5	46932	3153970	0.20%	0.135%
7	42.460	11997	12130	12177	BB	4936413	205324703	12.89%	8.768%
8	42.843	12214	12234	12258	PV	116797	3525894	0.22%	0.151%
9	49.982	12809	14169	14276	M6	1461095	1592708945	100.00%	68.011%
10	54.599	14406	15152	15780	M6	205798	403274112	25.32%	17.220%

Sum of corrected areas: 2341825874

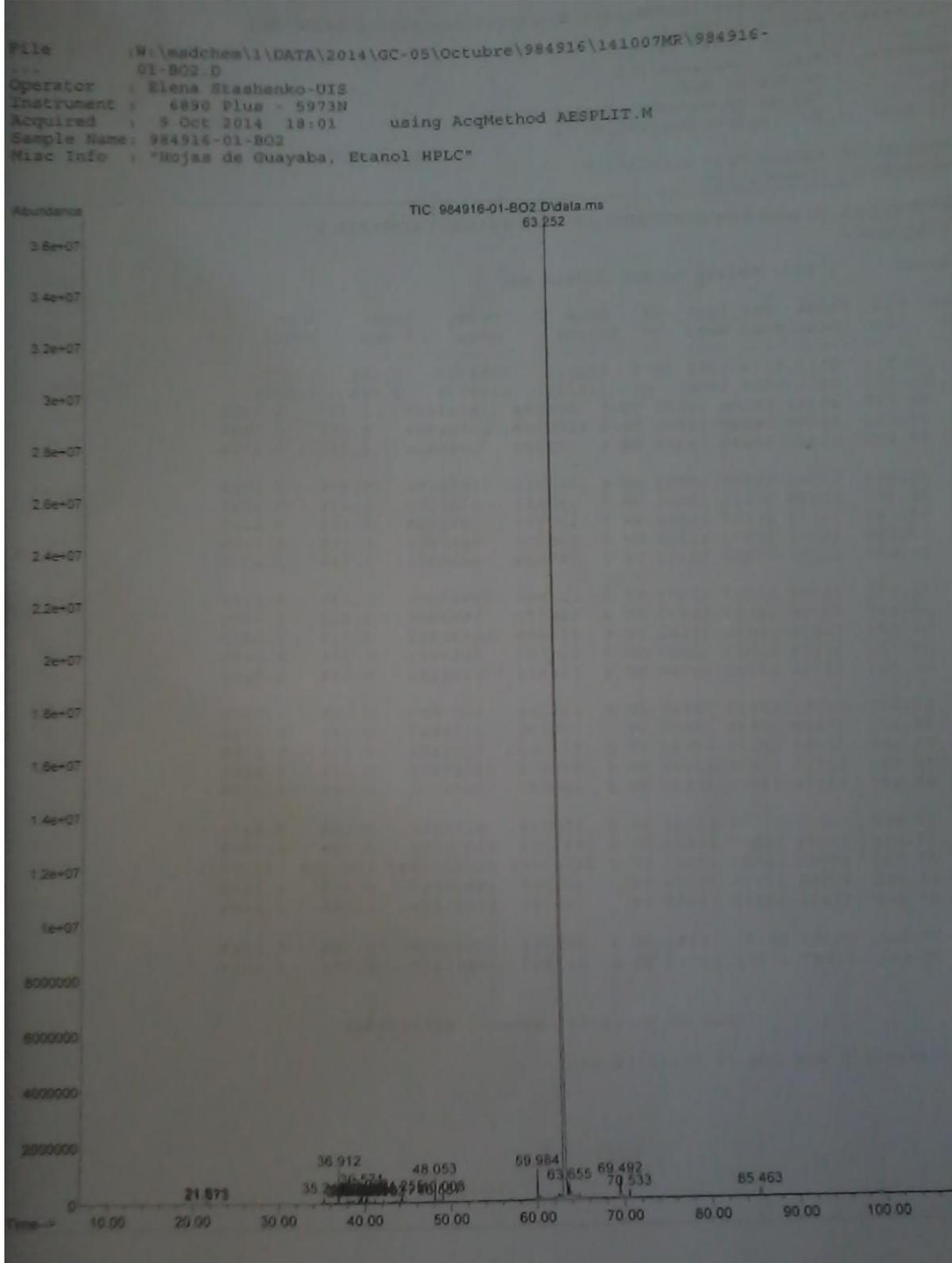
Anexo F. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) de la muestra de hojas de Tamarindo (CG-MS).



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	17.983	4183	4260	4360	BV	565792	28187896	3.25%	1.948%
2	20.310	5098	5130	5202	VV 3	143682	6786900	0.78%	0.469%
3	21.988	5695	5757	5814	BB 3	92392	3230089	0.37%	0.223%
4	22.207	5814	5839	5896	BB 3	81030	2884702	0.33%	0.199%
5	24.287	6609	6616	6652	M3	77611	2182769	0.25%	0.151%
6	26.694	7493	7516	7599	M2	60384	2662351	0.31%	0.184%
7	29.758	8630	8661	8766	BB	176784	9584645	1.10%	0.663%
8	33.048	9559	9578	9597	VV 2	89289	2799607	0.32%	0.194%
9	40.770	11528	11672	11754	BV 6	112441	17667335	2.04%	1.221%
10	42.408	12062	12116	12144	VV	1380581	38860056	4.48%	2.686%
11	49.270	12911	13976	14044	M5	849636	867835272	100.00%	59.988%
12	54.100	14272	15046	15683	M5	209208	464001448	53.47%	32.073%

Sum of corrected areas: 1446683071

Anexo G. Cromatograma de la muestra de hojas de Guayaba (CG-MS).



Area Percent Report

Data Path : W:\msdchem\1\DATA\2014\GC-05\Octubre\984916\141007MR\
 Data File : 984916-01-BO2.D
 Acq On : 9 Oct 2014 18:01
 Operator : Elena Stashenko-UIS
 Sample : 984916-01-BO2
 Misc : "Hojas de Guayaba, Etanol HPLC"
 ALS Vial : 63 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

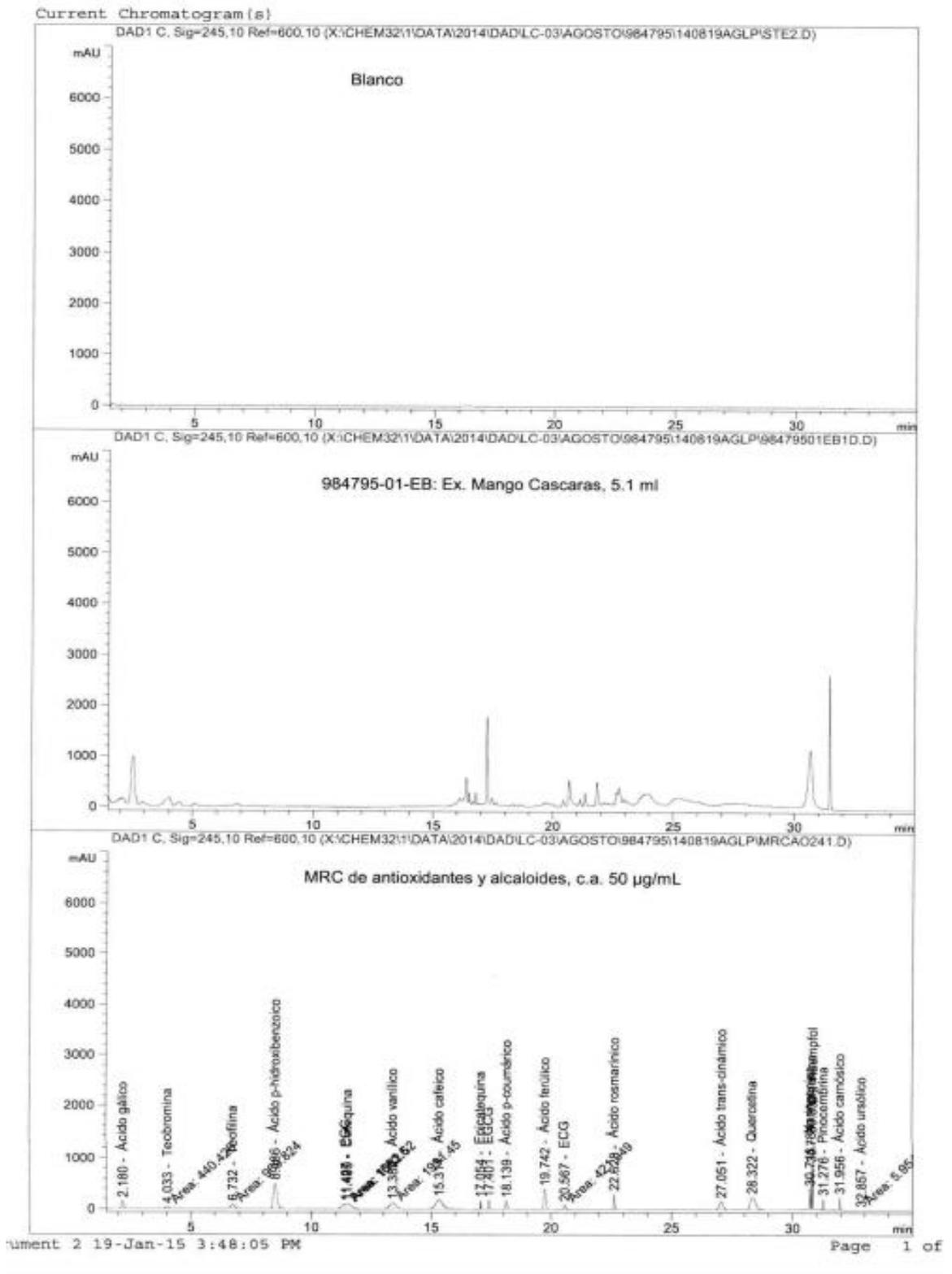
Method : W:\msdchem\1\METHODS\2014\GC-05\AESPLIT984916.M
 Title :

Signal : TIC: 984916-01-BO2.D\data.ms

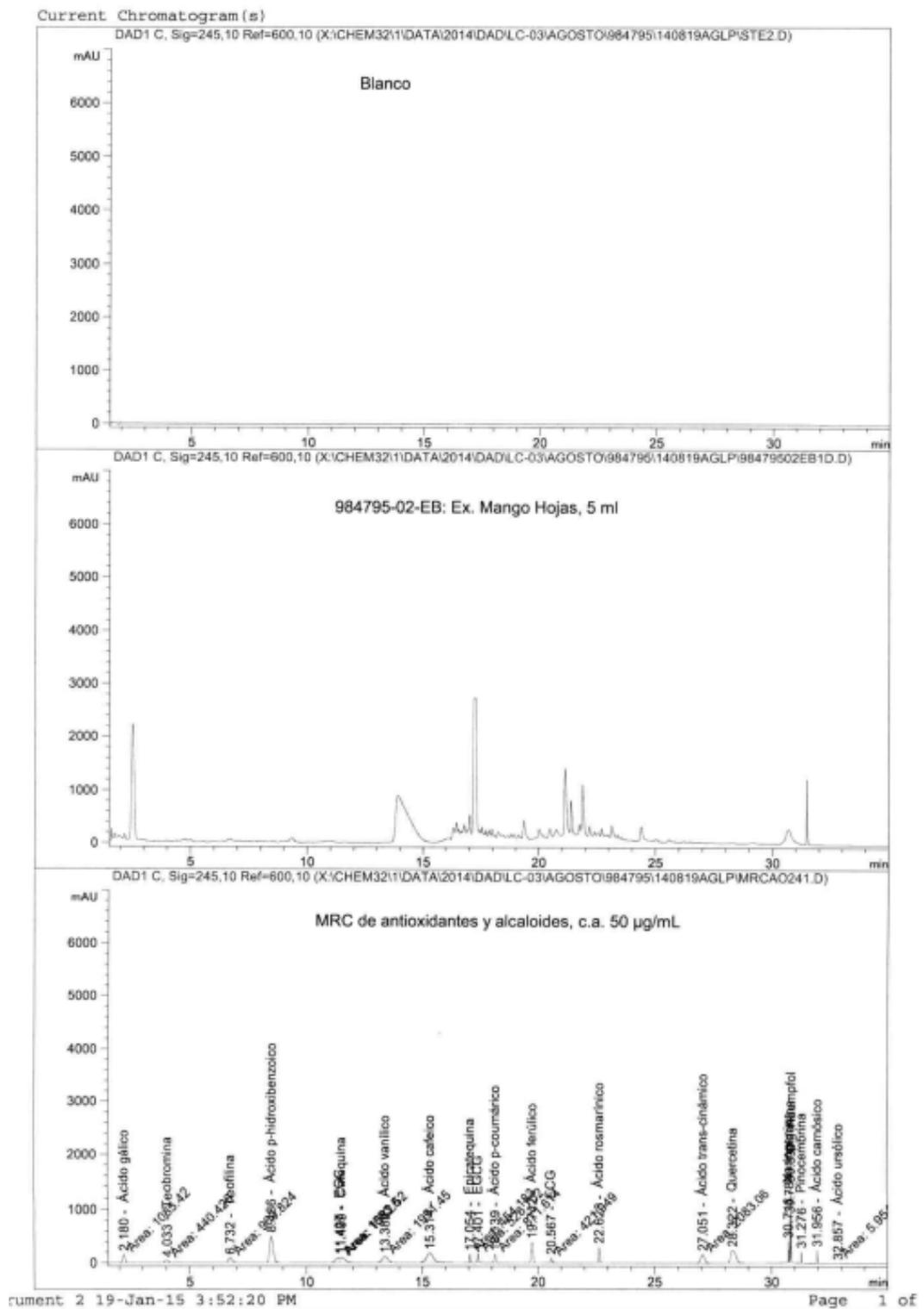
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	21.511	5551	5579	5611	BB 7	109311	3159927	0.08%	0.071%
2	21.673	5621	5639	5659	M7	48211	1228015	0.03%	0.028%
3	35.215	10149	10166	10203	VB 5	249646	8011209	0.19%	0.180%
4	36.912	10590	10626	10668	BB 4	1189468	35261783	0.85%	0.792%
5	37.872	10853	10886	10923	BB 4	162392	5450726	0.13%	0.122%
6	38.134	10926	10957	10978	BV 4	126211	4573001	0.11%	0.103%
7	38.720	11105	11116	11145	VB 5	159057	4793123	0.12%	0.108%
8	39.241	11243	11257	11266	VV 7	177212	4942018	0.12%	0.111%
9	39.299	11266	11273	11293	VV 4	128751	4462252	0.11%	0.100%
10	39.437	11293	11310	11328	VV 6	189419	5618701	0.14%	0.126%
11	39.571	11328	11347	11375	PV 4	522860	20417905	0.49%	0.459%
12	39.986	11446	11459	11472	VV 3	136707	3553406	0.09%	0.080%
13	40.099	11472	11490	11505	VV 4	333500	12993233	0.31%	0.292%
14	40.181	11505	11512	11551	VB 8	213580	6647143	0.16%	0.149%
15	41.090	11742	11758	11794	BB 5	124313	3598148	0.09%	0.081%
16	42.102	12002	12033	12064	BB 8	131149	4027809	0.10%	0.090%
17	44.171	12580	12594	12604	VV 7	129291	3316663	0.08%	0.074%
18	44.255	12604	12616	12645	VV 5	271959	9636654	0.23%	0.216%
19	48.053	13615	13646	13693	BB 4	835422	21561268	0.52%	0.484%
20	48.587	13778	13791	13825	BB 9	120087	3441106	0.08%	0.077%
21	49.003	13869	13903	13948	BB 5	229253	6100411	0.15%	0.137%
22	59.984	16273	16297	16325	BV 2	1047534	31482140	0.76%	0.707%
23	63.252	16907	16992	17025	VV 4	36903483	4136202840	100.00%	92.883%
24	63.655	17062	17078	17101	PV	422809	15454449	0.37%	0.347%
25	69.492	18272	18319	18423	BB	705797	51931608	1.26%	1.166%
26	70.533	18506	18541	18583	BB 3	279362	14449453	0.35%	0.324%
27	85.463	21667	21716	21795	BB 2	283047	30840907	0.75%	0.693%

Sum of corrected areas: 4453155901

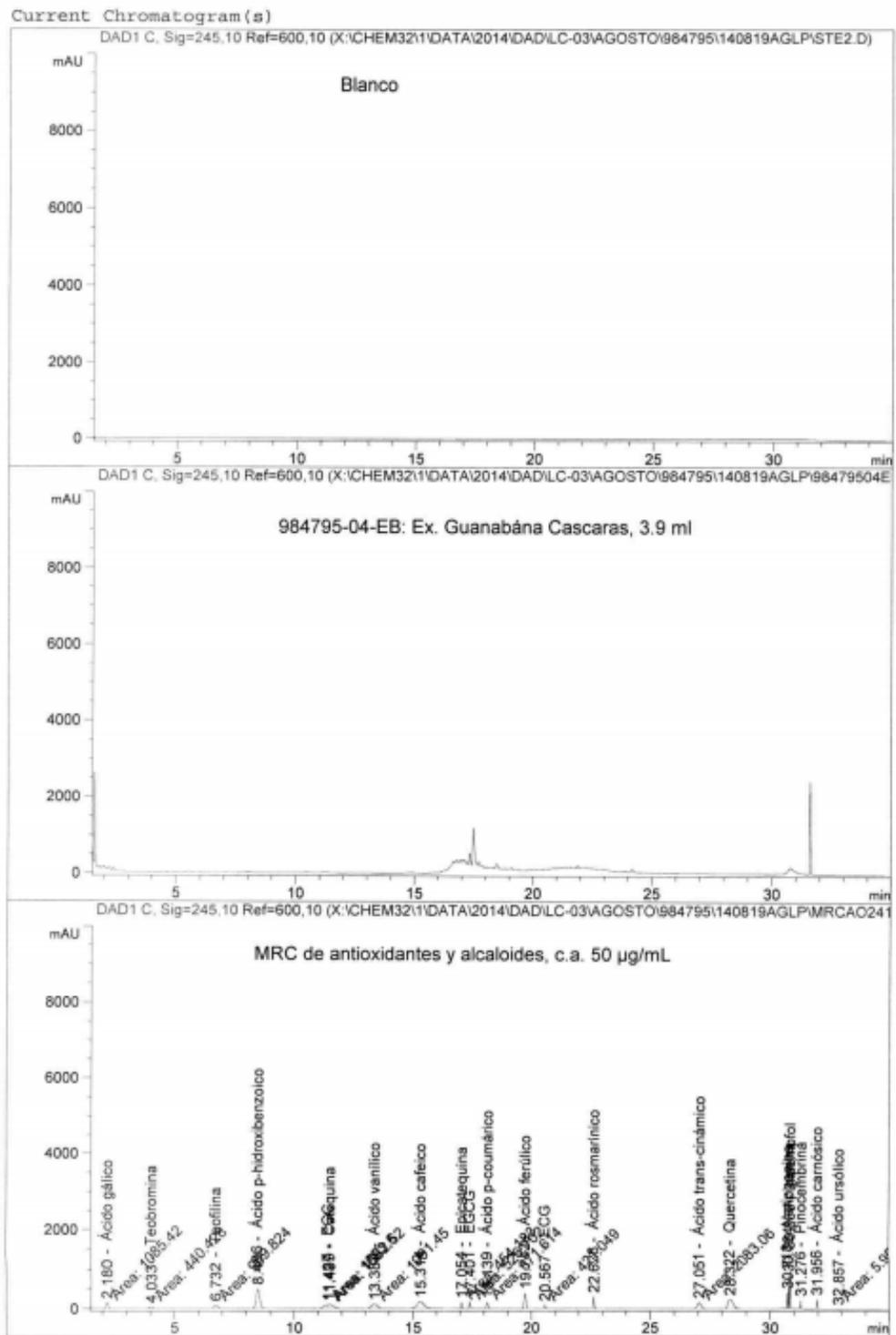
Anexo H. Cromatograma de la muestra de cascaras de Mango (HPLC/DAD).



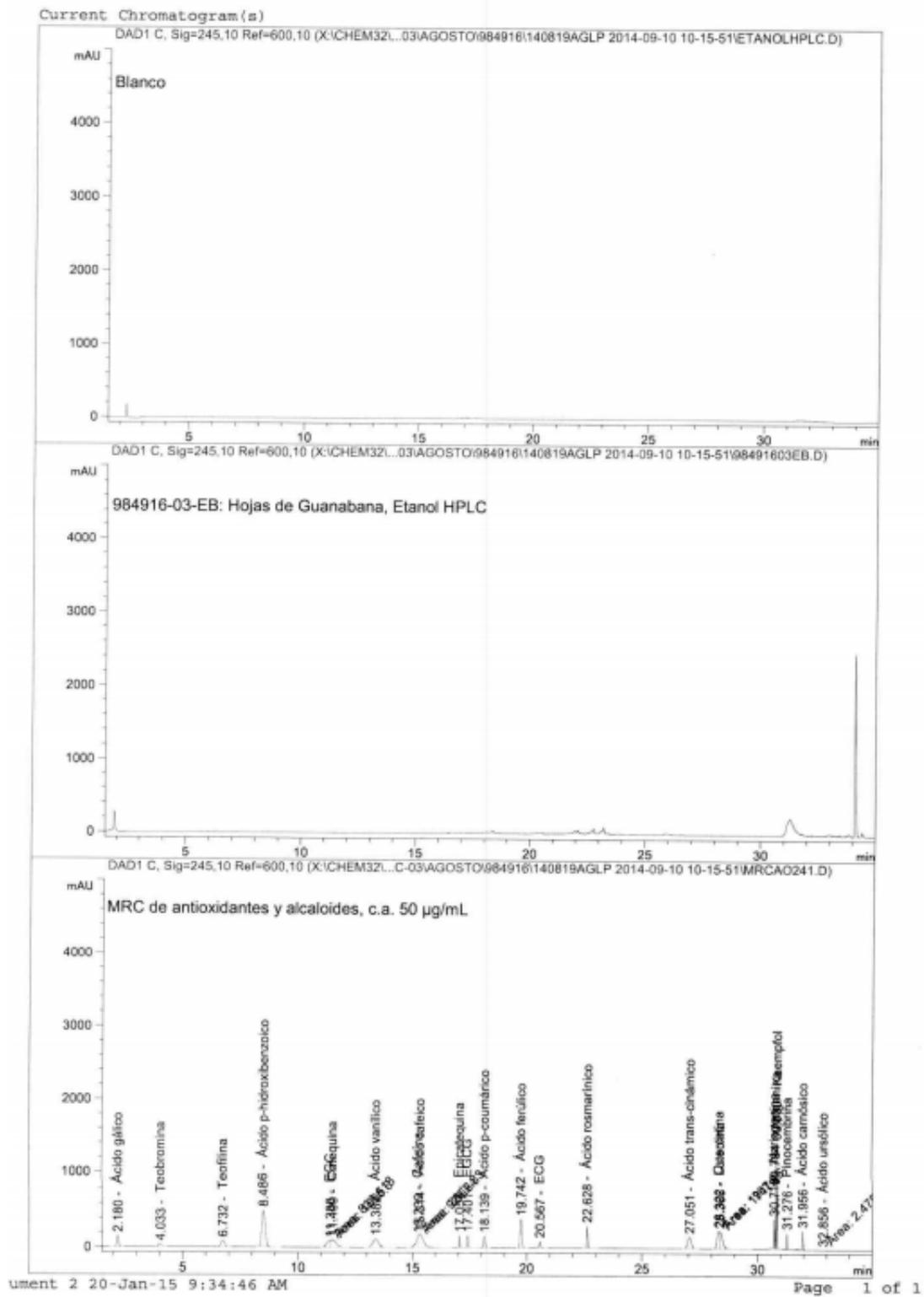
Anexo I. Cromatograma de la muestra de hojas de Mango (HPLC/DAD).



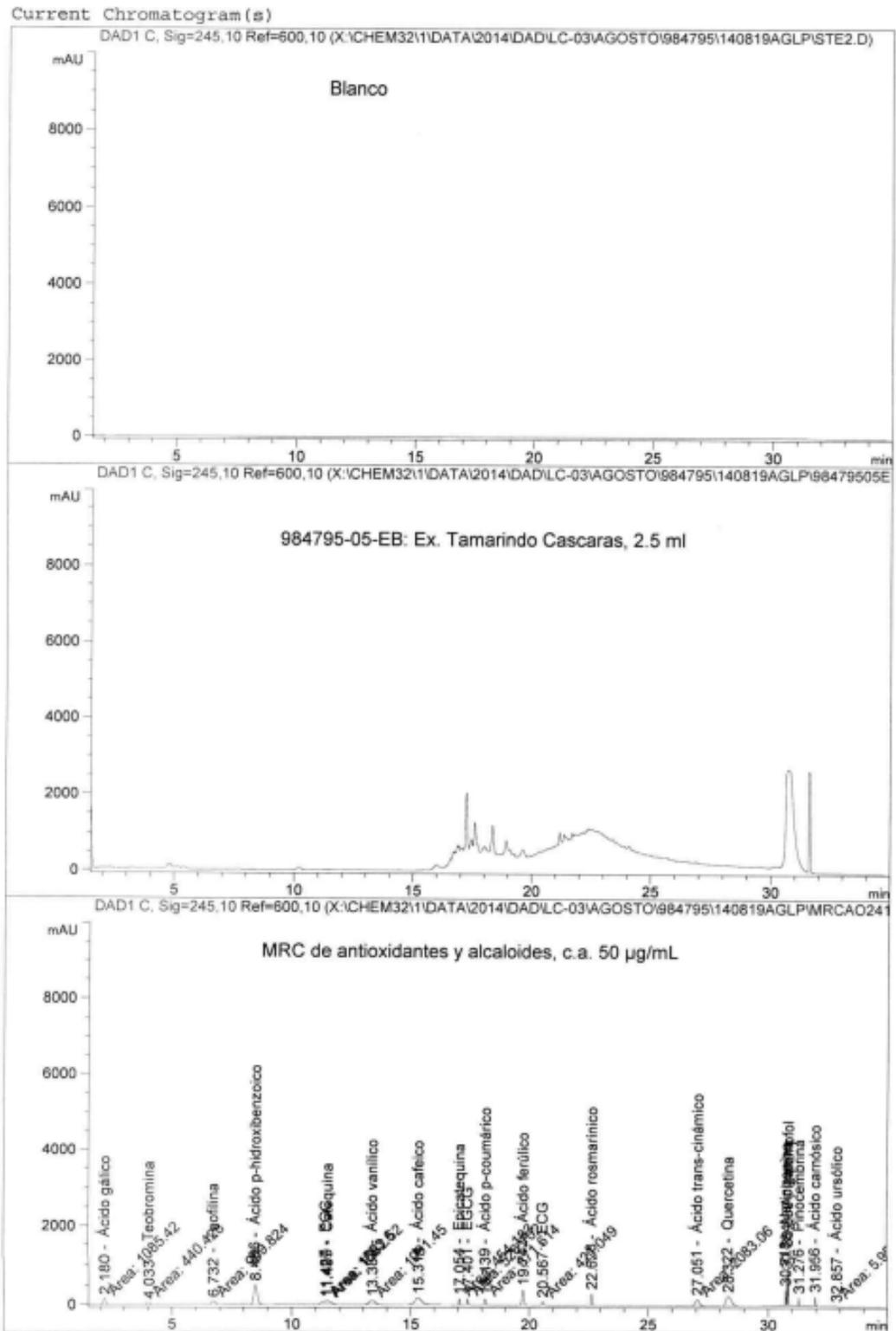
Anexo J. Cromatograma de la muestra de cascaras de Guanábana (HPLC/DAD).



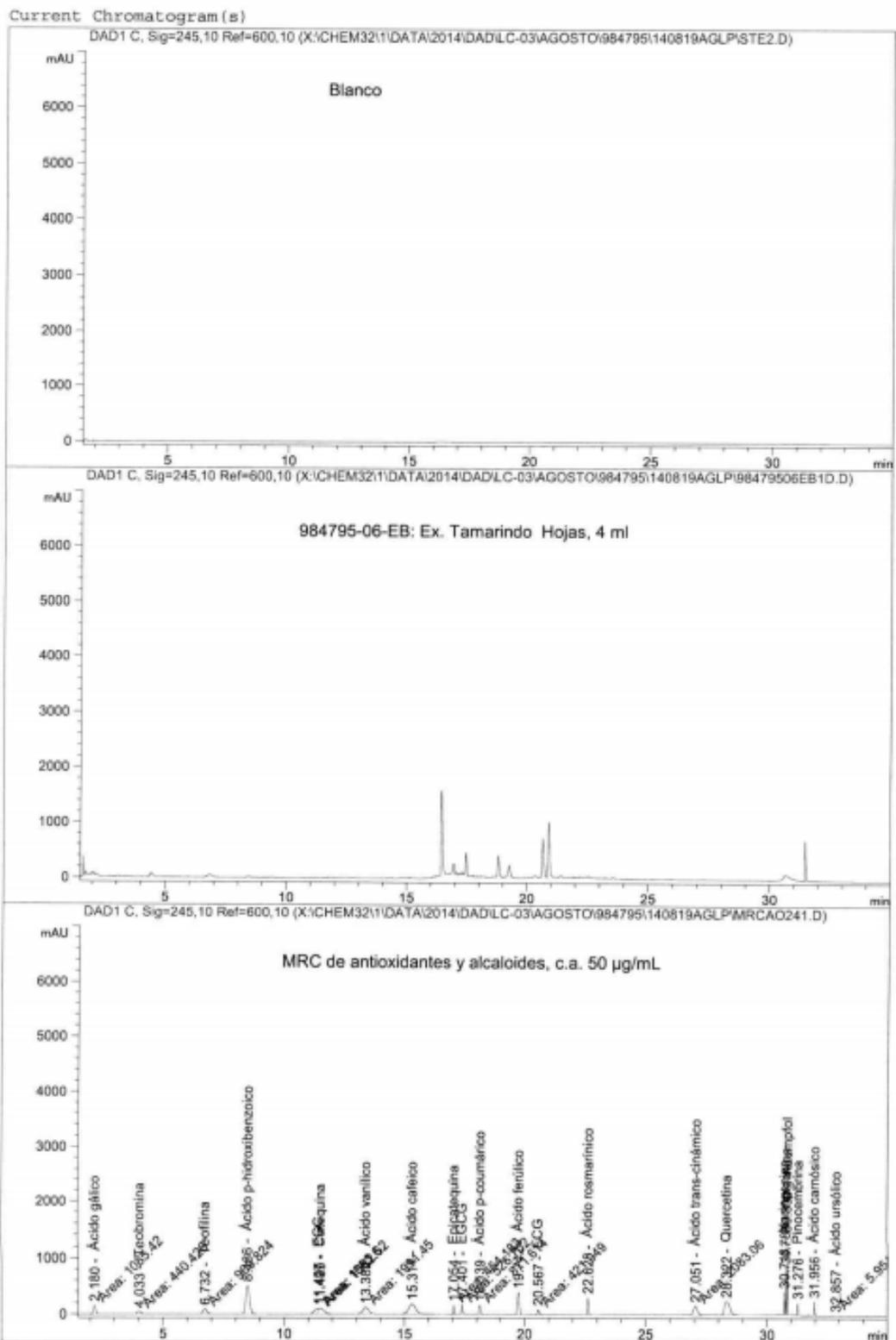
Anexo K. Cromatograma de la muestra de hojas de Guanábana (HPLC/DAD).



Anexo L. Cromatograma de la muestra de cascaras de Tamarindo (HPLC/DAD).

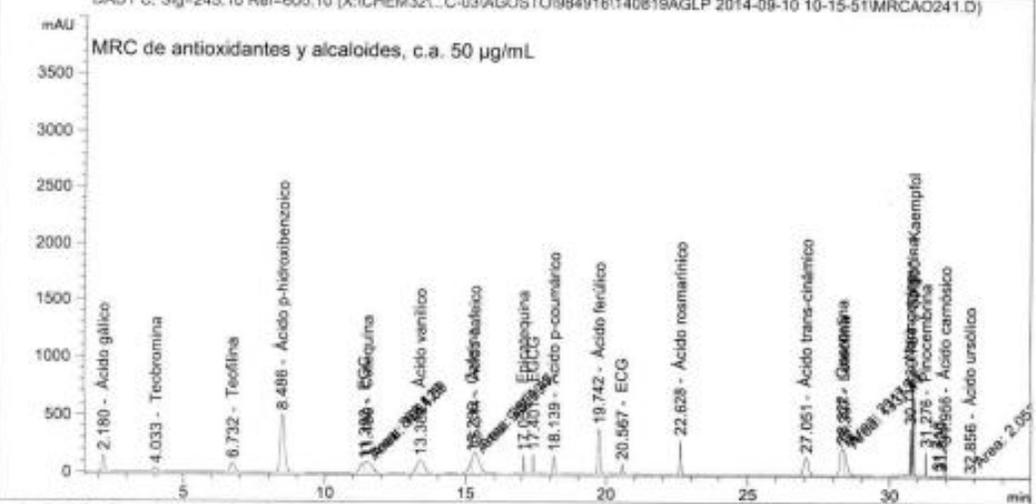
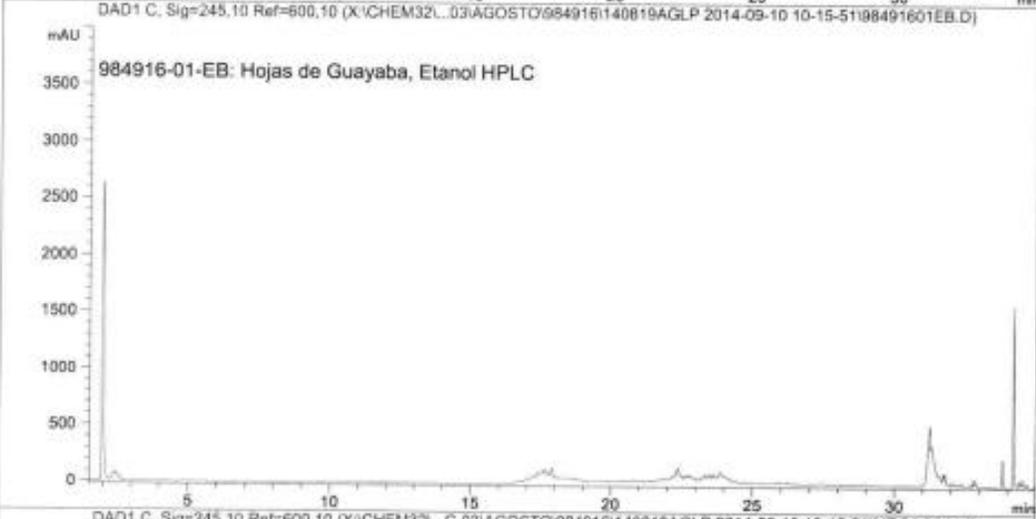
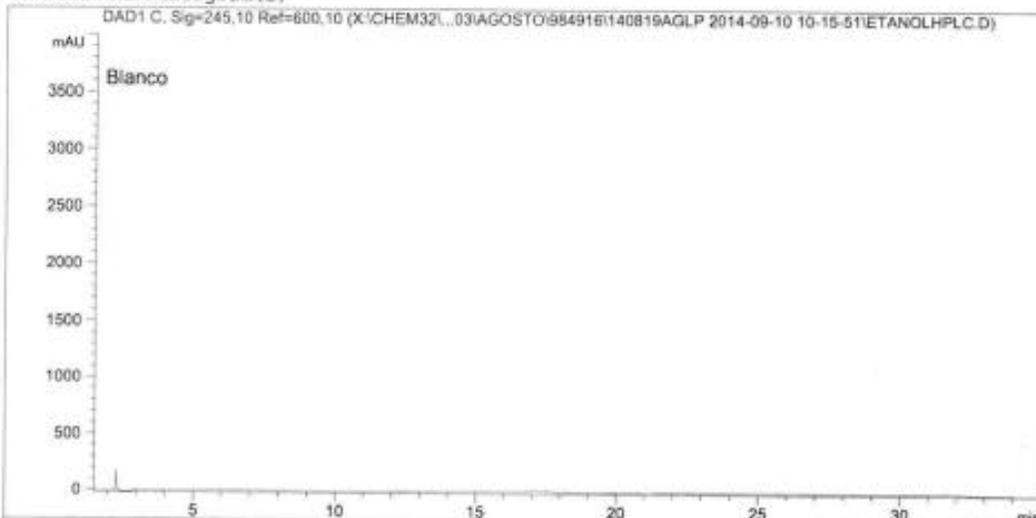


Anexo M. Cromatograma de la muestra de hojas de Tamarindo (HPLC/DAD).

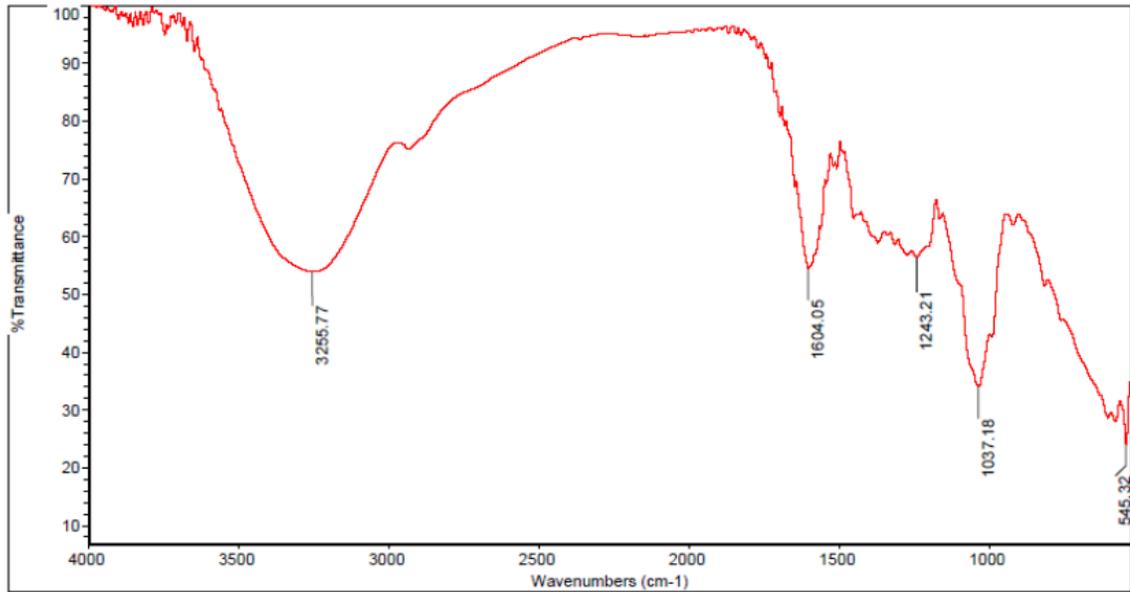


Anexo N. Cromatograma de la muestra de hojas de Guayaba (HPLC/DAD).

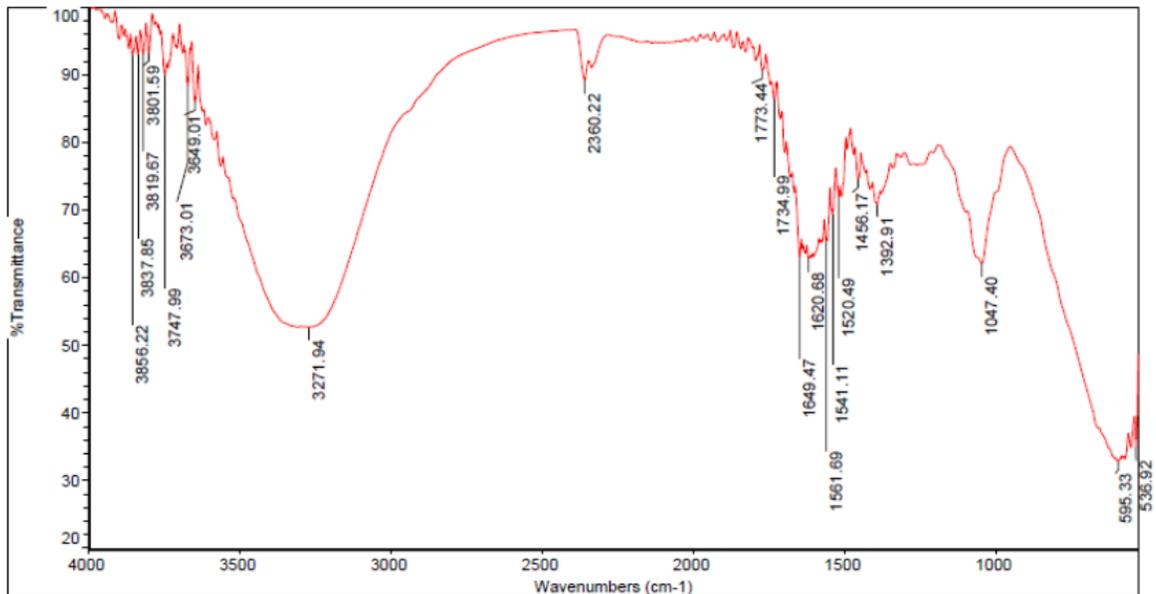
Current Chromatogram (s)



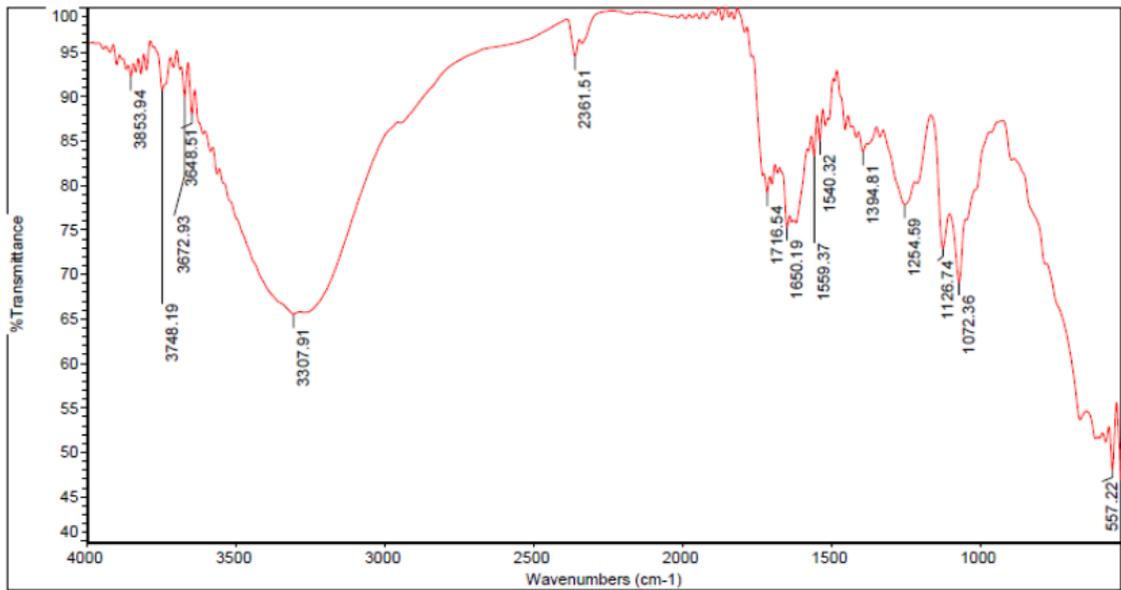
Anexo O. FTIR de extracto concentrado de hojas de Mango.



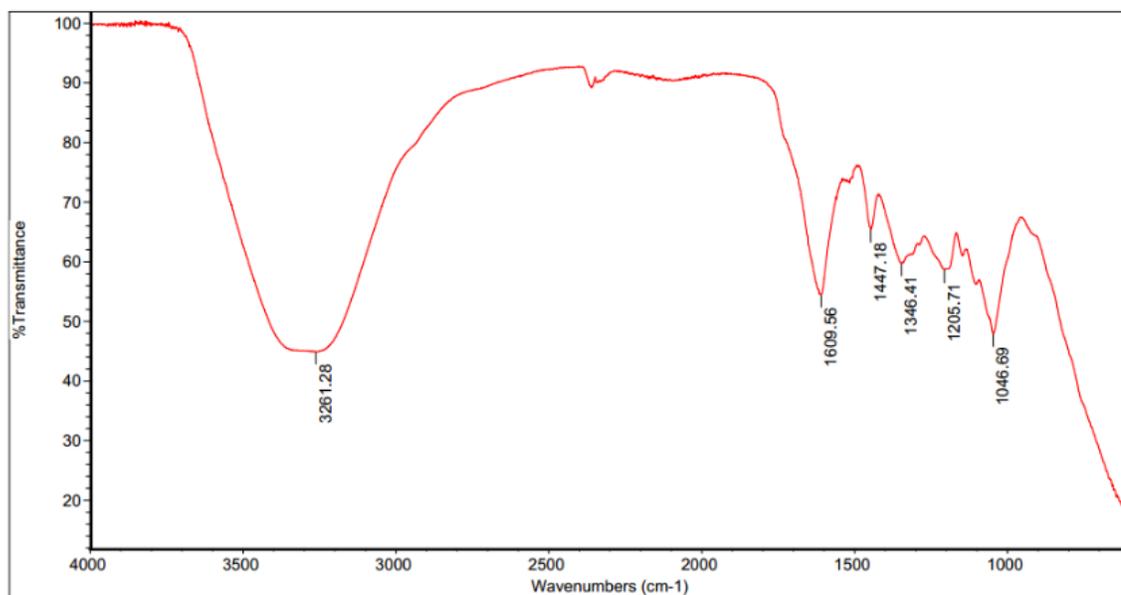
Anexo P. FTIR de extracto concentrado de hojas de Guanábana.



Anexo Q. FTIR de extracto concentrado de hojas de Tamarindo.



Anexo R. FTIR de extracto concentrado de hojas de Guayaba.



4

Prueba de Difusión por Disco

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Enumerar los pasos requeridos para realizar una prueba de difusión por disco.
- Mencionar las variables que deben ser controladas cuando se realiza la prueba.
- Reconocer los problemas que podrían ocurrir si las variables de la prueba no son controladas apropiadamente.
- Discutir los dos métodos básicos de preparación del inóculo y la aplicación de cada uno de ellos.
- Basado en las las recomendaciones de NCCLS, interpretar los diámetros de la zona de inhibición como sensible, intermedio o resistente para organismo/agente antimicrobiano específicos.

ANTECEDENTES

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. En ese tiempo, había tantos procedimientos diferentes en uso como microbiólogos.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio cimero describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

El NCCLS adoptó los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer como el método de referencia para difusión por disco. Estos pasos deben seguirse en **forma minuciosa** para obtener resultados precisos.

CÓMO REALIZAR LA PRUEBA – REVISIÓN

Una vez que se han aislado colonias de un organismo que ha sido identificado como patógeno potencial, es necesario proceder de la siguiente manera para realizar la prueba de susceptibilidad.

1. Seleccionar las colonias
2. Preparar una suspensión del inóculo
3. Estandarizar la suspensión del inóculo
4. Inocular la placa



Figura 4.1—Seleccionando colonias bien aisladas para el inóculo

5. Colocar discos de antimicrobiano
6. Incubar la placa
7. Medir las zonas de inhibición
8. Interpretar los resultados

Seleccionar las Colonias

Uno de los pasos más importantes en el proceso de la prueba es la preparación del inóculo. Esto involucra la selección de colonias apropiadas para la prueba, su suspensión en caldo y la estandarización de la suspensión.

Primero, seleccione varias colonias del organismo que esté analizando. Si selecciona entre 3–5 colonias, en vez de solo una, sus chances de detectar resistencia son mayores.

Nota: Utilizando una herramienta de inoculación (o un hisopo de algodón) recoja de la placa sólo colonias bien aisladas para evitar pruebas de cultivo mixto. Si no dispone de colonias bien aisladas, haga un subcultivo del organismo en una nueva placa.

Cómo Preparar y Estandarizar la Suspensión del Inóculo

Existen dos métodos para la preparación de inóculo: *suspensión directa de colonias* y *fase logarítmica de crecimiento*. Sólo el método de suspensión directa de colonias proveerá resultados precisos para ciertos organismos. En ambos métodos, la turbidez de la suspensión debe ser estandarizada (para que sea igual) al estándar 0,5 de McFarland (lo que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Las suspensiones así ajustadas deben utilizarse como inóculo dentro de los 15 minutos siguientes.

Nota: Los estándares de McFarland están hechos ya sea de sulfato de bario o partículas de látex. Si usa sulfato de bario, agite antes de usar, si usa látex, invierta para mezclar. Una fórmula para el estándar 0,5 de McFarland se encuentra en el Apéndice.

Suspensión Directa de Colonias

Para el método de suspensión directa de colonias, las colonias no deben sobrepasar las 18–24 horas de aislamiento. Estandarice el inóculo al mismo tiempo que prepara



Figura 4.2—Estandarización del Inóculo

la suspensión. Suspenda las colonias en solución salina o caldo (eje. Mueller-Hinton o soya tríptica). Luego, ajuste el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Puede comparar la turbidez de las suspensiones poniendo los tubos frente a un papel blanco o una tarjeta de archivo con líneas negras.

Use suspensión directa de colonias para los siguientes organismos:

- Todos los estafilococos
- Bacterias fastidiosas que tienen crecimiento impredecible en caldo: eje., estreptococos

Método de Fase Logarítmica

El método de fase logarítmica se usa con la mayoría de organismos que crecen rápidamente excepto estafilococos. Una vez que se han inoculado las colonias en un caldo, incuba a 35 °C para lograr un crecimiento en fase logarítmica. Una curva de crecimiento para una bacteria típica se muestra a continuación. El crecimiento de fase logarítmica ocurre después de 2–8 horas de incubación.

Después de la incubación, ajuste la turbidez para que sea igual al estándar 0,5 de McFarland. Asegúrese de conocer como ajustar y estandarizar el inóculo.

- ¿Qué haría si la suspensión de organismos es demasiado turbia?
- ¿Qué haría si la suspensión es demasiado clara para la suspensión directa de colonias?



Figura 4.3—Plot de un crecimiento de fase log



Figura 4.4—Removiendo el exceso de líquido del hisopo

- C. ¿Qué haría si la suspensión es demasiado clara para el método de fase logarítmica?

Respuestas correctas:

- A. Añada más caldo o solución salina para igualar la turbidez a 0,5 del estándar de McFarland.
- B. Tome más colonias y suspéndalas en el caldo.
- C. Re-incube la suspensión.

Nota: No use cultivos en medio líquido de la noche anterior ni tampoco inóculos no estandarizados para inocular las placas.

Cómo Prepararse para la Inoculación de la Placa

Retire el contenedor de discos del congelador o refrigerador. *Antes de abrir el contenedor*, permita que los discos se equilibren a la temperatura ambiente durante una a dos horas para minimizar la condensación y reducir la posibilidad de que la humedad afecte la concentración de los agentes antimicrobianos.

Permita que la placa de Agar Mueller-Hinton (MHA) se caliente a la temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad se absorba dentro del medio. Este proceso se puede acelerar poniendo las placas entreabiertas en el incubador por 10–15 minutos. Asegúrese que la placa de MHA tenga la profundidad adecuada de 4 mm.

Agite la suspensión del organismo para asegurarse que está bien mezclada. Luego, sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Remueva el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo.

Cómo Inocular la Placa

Empezando en la parte superior de la placa MHA inóculé la superficie con el hisopo. Cubra toda la placa frotando de ida y vuelta de un borde al otro. Rote la placa



Figura 4.5—Inoculación de la placa

aproximadamente 60° y repita el procedimiento de frotado. Rote otra vez la placa 60° y frote toda la placa por tercera vez. Esto garantizará que el inóculo sea distribuido homogéneamente.

Sugerencia técnica: Incube la placa dentro de los 15 minutos siguientes después de haber estandarizado el inóculo.

Cómo Aplicar los Discos de Antimicrobianos

Coloque los discos con los agentes antimicrobianos dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación de la placa MHA. Los discos pueden ser colocados uno a uno o con un dispensador de discos multi-canal como se observa en la Figura 4.6.

Típicamente, se pueden aplicar hasta 12 discos en una placa de 150 mm de diámetro o hasta 5 discos en una placa de 100 mm. Presione cada disco firmemente para asegurar el contacto completo con la superficie de agar. No se olvide de este paso o los discos pueden terminar en la tapa de la placa después de la incubación.

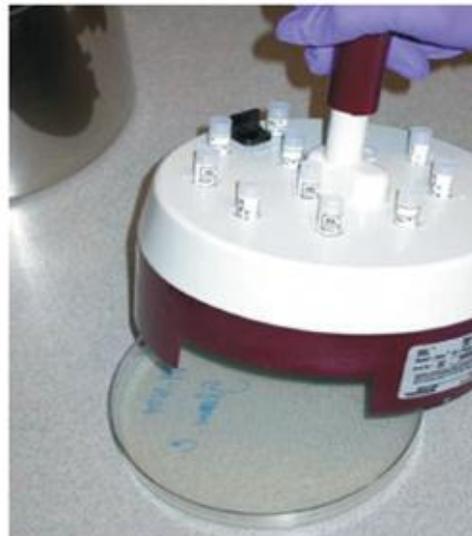


Figura 4.6—Aplicando discos con un dispensador



Figura 4.7—Presionando los discos para asegurar contacto

Puntos que hay que recordar sobre los discos de antimicrobianos:

- No use discos después de su fecha de caducidad.
- No almacene discos en un congelador libre de escarcha.
- Use productos aprobados por la FDA.
- Use discos con el contenido especificado en los estándares de NCCLS.
- No reubique un disco una vez que éste ha tocado la superficie del agar.

Cómo Incubar la Placa

- Invierta las placas e incúbelas .
- Para las bacterias no fastidiosas, incube (en aire ambiente) a 35°C por 16–18 horas.
- Para la prueba de difusión por disco de bacterias fastidiosas, use las condiciones de incubación recomendadas por el NCCLS, como se muestra en el siguiente cuadro.

Bacteria	Medio	Incubación	
		Tiempo (h)	Atmósfera
<i>Haemophilus</i> spp.	Medio de Prueba para <i>Haemophilus</i>	16–18	CO ₂ (5%)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Agar base GC + 1% sup.	20–24	CO ₂ (5%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MHA-5% sangre de cordero	20–24	CO ₂ (5%)
Otros <i>Streptococcus</i> spp.	MHA-5% sangre de cordero	20–24	CO ₂ (5%)

Cómo Medir las Zonas de Inhibición – Luz Reflejada

Después de retirar la placa de la incubadora:

- Examine detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano.

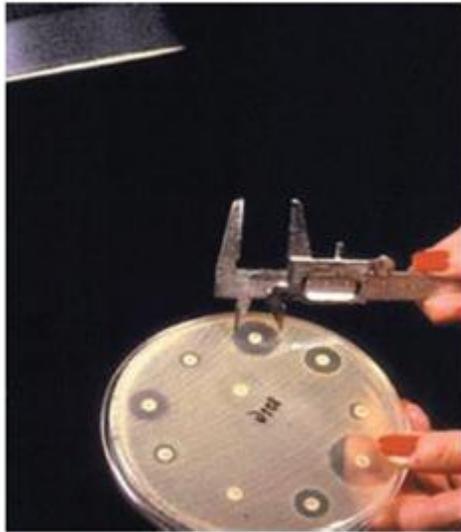


Figura 4.8—La luz reflejada es usada para medir las zonas desde la parte posterior de la placa

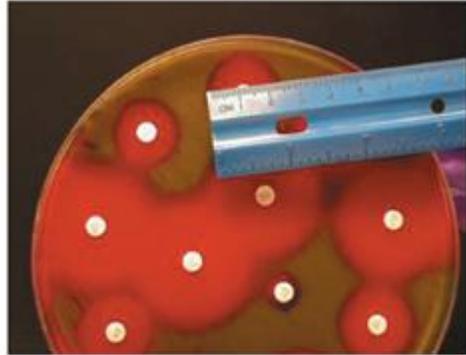


Figura 4.9—Midiendo zonas en una placa BA destapada

Para medir las zonas de inhibición desde la parte posterior de la placa usando luz reflejada:

- Sostenga la placa unos pocos centímetros sobre una superficie de color negro que no refleje la luz.
- Mida redondeando al milímetro más cercano con una regla o un calibrador.
- La luz reflejada es usada para *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, otros bacilos gram negativos, estafilococos y enterococos (excepto para oxacilina y vancomicina).
- La luz reflejada también es usada cuando se miden zonas de inhibición en agar Mueller-Hinton sangre

Sugerencia técnica: Cuando analice estreptococos en agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero, retire la tapa y mida las zonas desde la parte superior de la placa.

Cómo Medir las Zonas de Inhibición – Luz Transmitida

Use luz transmitida, en vez de luz reflejada, cuando mida zonas de:

- Estafilococos con oxacilina
- Enterococos con vancomicina



Figura 4.10—Zona doble de Inhibición

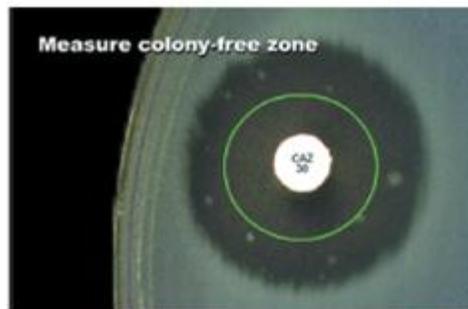


Figura 4.11—Zona con colonias internas y anillo verde que indica zona a ser leída

CÓMO INTERPRETAR LOS RESULTADOS

Cómo Medir Zonas de inhibición Inusuales

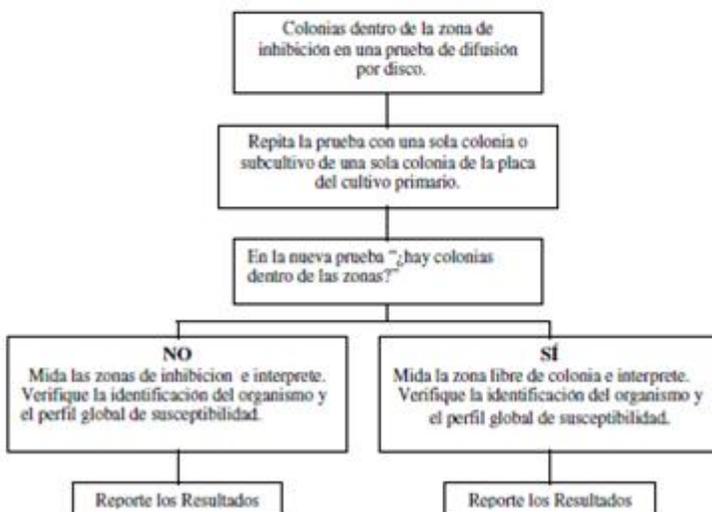
Algunas zonas podrían ser difíciles de medir. Las Figuras 4.10 4.11 y 4.12 presentan ejemplos de zonas inusuales.

Doble zona: Mida la zona más interna.

Colonias dentro de la zona: Esto puede deberse ya sea a un cultivo mixto, que por lo general es obvio, o a una subpoblación resistente de la bacteria analizada.

Cómo Interpretar Colonias dentro de las Zonas

A veces es difícil diferenciar un cultivo mixto de una subpoblación resistente.



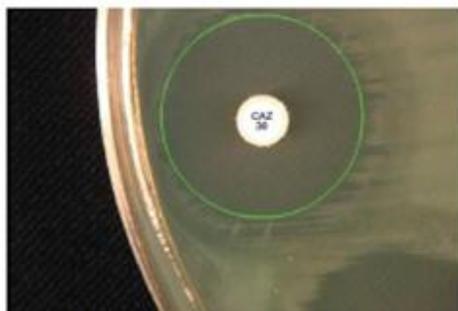


Figura 4.12—Zona afelpada alrededor del disco CAZ.

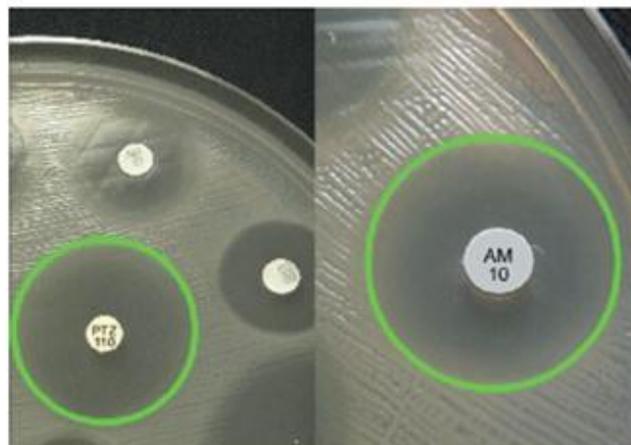


Figura 4.13—Zonas con brotes *Proteus mirabilis*

Cómo Interpretar la Zona de Inhibición con Bordes Difusos

Mida el punto en el cual se puede ver una demarcación obvia entre crecimiento y ausencia de crecimiento. Evite esforzarse para ver las colonias más diminutas.

Brotos debidos a *Proteus mirabilis*

Mida la zona que es obvia. Ignore el brote aún si este cubre la zona de inhibición.

Trimetoprima-Sulfamethoxazole (SXT)

Las zonas con trimetoprima-sulfamethoxazole (y también sulfonamidas, y trimetoprima solo) podrían ser difíciles de leer porque este agente podría no inhibir el crecimiento de las bacterias hasta que las bacterias hayan pasado por varias generaciones de crecimiento. Se podría observar un ligero crecimiento opaco dentro de la zona. Mida la zona en el punto en que haya una reducción del 80% en el crecimiento.

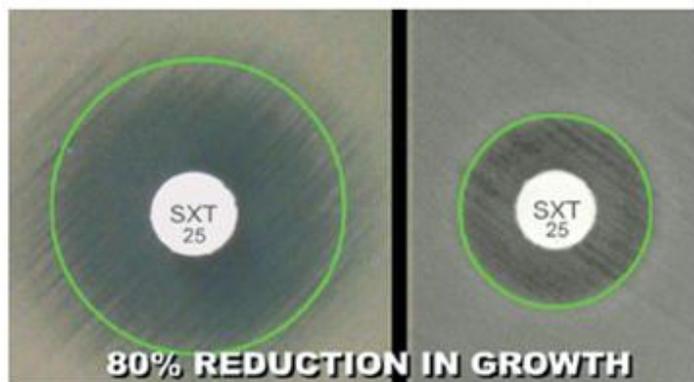


Figura 4.14—Dos cepas con zonas SXT



Figura 4.15—Resistencia heterogénea a oxacilina



Figura 4.16—Resistencia homogénea a oxacilina

Cómo Interpretar la Resistencia Heterogénea y Homogénea

Resistencia Heterogénea en *S. aureus*

A pesar de que ignoramos el crecimiento opaco que con frecuencia se observa alrededor de los discos dentro de las zonas de inhibición con brotes de *Proteus* spp. y alrededor de los discos de trimetoprima-sulfamethoxazole, la opacidad alrededor de un disco de oxacilina en una prueba de *S. aureus* es significativa y no debe ignorarse.

Resistencia Homogénea en *S. aureus*

El *S. aureus* con resistencia homogénea exhibe un crecimiento confluyente hasta el disco. Consulte el capítulo sobre Estafilococos para mayor información.

Cómo Controlar las Variables de la Prueba

Revise las variables enumeradas a continuación, las que deben ser controladas al realizar las pruebas de difusión por disco.

- Composición del medio de cultivo
- pH del medio
- Profundidad del agar
- Concentración del inóculo
- Procedimiento de inoculación
- Contenido del antimicrobiano en el disco
- Almacenamiento de los discos
- Número de discos en la placa
- Temperatura de incubación
- Atmósfera de incubación
- Tiempo de incubación
- Medición de la zona de inhibición

