

Síntesis biomimética de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) y su electrohilado polimérico

Ledezma A. *, Romero J., Hernández M., Moggio I., Arias E., Padrón G.
Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo Coahuila, México

Orozco V., Martínez A.
Centro de Investigación y de Materiales Avanzados, Chihuahua, Chihuahua, México

Martínez C.
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, Chih, México

Torres S.
Tamuse, Cd. Juárez, Chih, México
(Recibido: 30 de agosto de 2014; Aceptado: 2 de diciembre de 2014)

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) mediante una alternativa ambientalmente amigable, utilizando como agente reductor extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) en presencia de polímeros biocompatibles solubles en agua poli(vinil alcohol) [PVA] como agente de estabilización de las nanopartículas. La formación de nanopartículas de plata monitoreada mediante el análisis por espectroscopia UV-visible registró una banda de absorción altamente simétrica con un pico máximo a 421 nm. Esto indica la presencia de nanoestructuras de plata debida a la excitación de los plasmones superficiales típicos de las nanopartículas de plata. El análisis mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM), muestra la formación de nanopartículas de morfología esférica con un tamaño en el intervalo de 4 nm a 28 nm y un tamaño promedio de 10 nm. La incorporación de AgNPs en nanofibras de PVA obtenidas mediante electrohilado se caracterizó mediante microscopia SEM y difracción de rayos X (DRX). El tamaño promedio de diámetro de las nanofibras obtenidas fue de alrededor de 250 nm. La actividad antibacteriana y antifúngica de las AgNPs y de AgNPs/nanofibras, se evaluó utilizando cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*.

Palabras clave: Nanopartículas de plata; Nanofibras; Extracto de nopal; Electrohilado

Silver nanoparticles were synthesized by means a friendly environment and cost-effective alternative, using the nopal extract (*Opuntia* sp) as reducing agent in the presence of biocompatible water-soluble polymers such as poly(vinyl alcohol) [PVA], acting as stabilizing agent for this nanoparticles. The formation of silver nanoparticles was monitored by analysis UV-Vis spectroscopy showing highly symmetric single absorption band with peak maximum at ca. 421 nm. This indicates the presence of silver nanostructures, which is due to the excitation of surface plasmons; typical of silver nanoparticles. TEM analysis were used to determine the size and shape of nanoparticles, obtaining spherical nanoparticles with a size ranges from 4 to 28 nm, an average size of 10 nm. AgNps were incorporated into PVA nanofibers by electrospinning process and then were characterized by SEM and X-ray diffraction (XRD). The nanofibers average size was around 250 nm. Antibacterial and antifungal activity of the synthesized AgNPs and AgNps/nanofibers were challenge against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillum niger*.

Keywords: Silver nanoparticles; Nanofibers; Nopal extract; Electrospinning

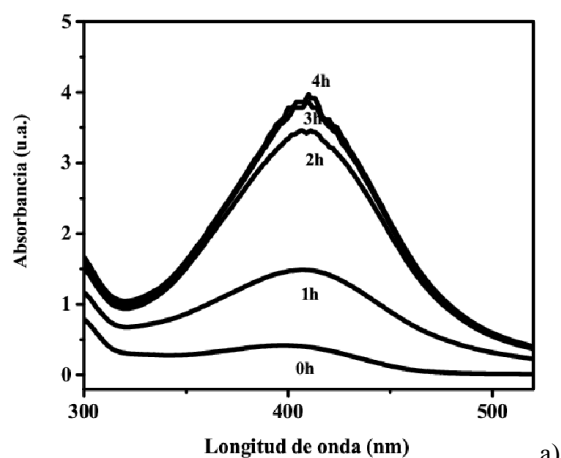
1. Introducción

Una de las áreas más importantes de la nanotecnología es la biomedicina, donde se han utilizado nanopartículas metálicas para diferentes aplicaciones tales como liberación controlada de fármacos, terapia génica, síntesis de nuevos medicamentos, detección de tumores celulares, entre otras [1]. En los últimos años las nanopartículas de plata han sido objeto de una variedad de estudios, principalmente debido a la relación que existe entre su tamaño con las propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas. En la escala nanométrica (10-100 nm), las AgNPs presentan un comportamiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas que es inusual en relación a las mismas partículas de mayor escala, además de su sorprendente actividad antimicrobiana [2]. En la actualidad, las AgNPs han encontrado aplicaciones

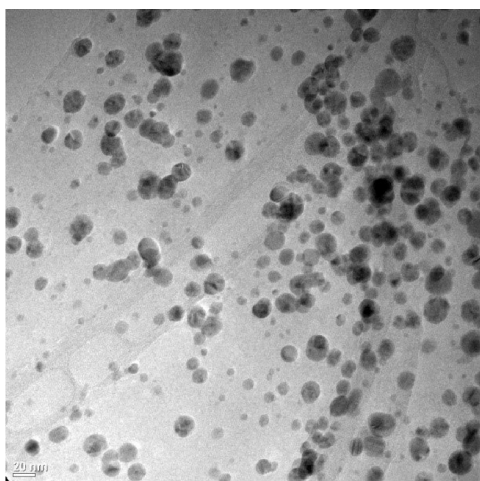
importantes en electrónica, marcadores celulares, en catálisis química, biosensores, biotecnología, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, tratamiento del agua y otros productos de consumo a base de plata [3]. Sin embargo una de las aplicaciones donde se han enfocado una buena parte de la investigación es en sus destacadas propiedades como agentes bactericidas o fungicidas. Debido a su fuerte actividad bactericida las AgNPs se han utilizado en el control de infecciones, recubrimientos de varios materiales textiles, además de usarse en el tratamiento de heridas y quemaduras [4,5].

Para la producción de nanopartículas metálicas, como en el caso de las nanopartículas de plata, se han propuesto diferentes estrategias de síntesis, entre las que se incluye, la síntesis química mediante microemulsión [6], reducción química [7], irradiación ultrasónica [8], síntesis electroquímica [9] y más recientemente la aplicación de

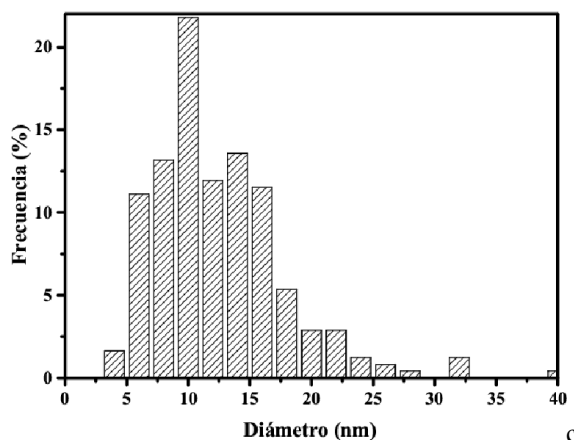
* antonio.ledezma@ciqua.edu.mx



a)



b)



c)

Figura 1. a) Espectro UV-visible en función del tiempo de reacción usando el extracto de nopal como agente reductor, b) Imagen TEM de las AgNPs, c) Histograma de distribución de tamaño de las AgNPs.

métodos biológicos que hacen uso de microorganismos plantas y sus extractos. La síntesis biológica de nanopartículas también denominada “síntesis verde” ha permitido la formación de nanoestructuras metálicas a partir del uso de bacterias [10,11], hongos [12,13], plantas o sus extractos [14-16], por lo que esta forma de síntesis representa una alternativa presumiblemente no tóxica, amigable con el medio ambiente y que además su uso en algunas ocasiones iguala o sobrepasa las expectativas de las nanopartículas sintetizadas por métodos físicos y químicos, en cuanto a costo y características de las nanopartículas obtenidas[17]. En contraste, en la reducción de sales de plata para la síntesis de nanopartículas de plata se requieren compuestos como el borohidruro de sodio, hidracina, hipofosfito y otros más [18,19]. Este tipo de reactivos por lo general son muy costosos y ecológicamente no compatibles. En muchas ocasiones, estas moléculas tóxicas se adsorben en la superficie de la nanopartícula durante el proceso de su síntesis y es posible que estos no se eliminen por completo, incluso repitiendo los procedimientos de lavado. Además, debido a la alta reactividad de las nanopartículas metálicas, originada por su gran área superficial se requiere tener especial cuidado durante el lavado y filtrado de las mismas para evitar una hidrólisis u oxidación indeseada. Incluso después del secado se requiere con frecuencia de procedimientos asistidos por vacío para evitar la oxidación de los materiales. Por lo anterior, en la síntesis por los métodos, así denominados verdes o de química verde, la síntesis y purificación de nanopartículas metálicas es simple, económicamente costeable, conveniente, compatible y ambientalmente segura. Razón por la cual varios grupos se han enfocado hacia el uso de la síntesis verde para la fabricación de nanopartículas metálicas con diferente tamaño y morfología. Esta tendencia también se ha favorecido por la alta eficiencia y la enorme cantidad de recursos biológicos tales como plantas, hongos, algas, bacterias, etc. Como fuente de agentes reductores [20-26].

Por otra parte, la incorporación de nanopartículas metálicas en matrices poliméricas esta despertando un gran interés en muchos campos de la ciencia, lo que ha permitido el desarrollo de materiales con mejores propiedades físicas y mecánicas [27]. Entre estos materiales, las nanofibras se caracterizan por presentar diámetros que se encuentran en la escala nanométrica, con una gran área superficial por unidad de volumen y tamaños de poro, lo cual hace posible su uso en aplicaciones muy variadas. El electrohilado es un proceso de fabricación novedoso, continuo y de bajo costo que puede utilizarse para preparar membranas de nanofibras como andamio o soporte de células y tejidos. La fabricación de fibras poliméricas mediante electrohilado, permite obtener nanofibras con diámetros que oscilan desde los micrones hasta los nanómetros, con una gran área superficial. Este método de procesamiento electrostático utiliza un campo eléctrico de alto voltaje para formar fibras sólidas a partir de una corriente de fluido polimérico (en solución o fundido) liberado a través de una boquilla de escala milimétrica [28]. Mediante el proceso de electrohilado se ha

Tabla 1. Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras obtenidas de la reacción “*in situ*” de AgNPs en presencia de PVA y expuestas a la bacteria *Escherichia coli* ATCC-25922.

MUESTRA	T ₀ (UFC/ML)	T ₂₄ UFC/ML	ACTIVIDAD ANTIMICROBIAN A	INHIBICIÓN (%)
PVA	23,478	46,977,778	0	0
PVA+ 25 ppm AgNPs	23,478	39	6.0	99.9
PVA+50 ppm AgNPs	23,478	0	8.7	100

logrado obtener nanofibras poliméricas con diferentes morfologías y diámetros ultradelgados dependiendo de las condiciones del proceso [29].

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la síntesis de nanopartículas de plata usando extracto acuoso de nopal (*Opuntia sp.*) como agente de reducción y en presencia de polímeros hidrosolubles y biocompatibles como el poli(vinil alcohol) [PVA], que a su vez actúa como agente estabilizante para las nanopartículas. Además se describen los resultados obtenidos del electrohilado y formación de fibras de poli(vinil alcohol) cargadas de nanopartículas de plata (PVA/AgNPs), la caracterización de las AgNps y PVA-nanofibras/AgNps por medio de espectroscopia Uv-Visible, microscopias SEM y TEM, difracción de rayos X (DRX) y la evaluación antibacteriana y antifúngica, con cepas de importancia clínica como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*.

2. Desarrollo Experimental

2.1. Obtención de extractos acuosos de nopal (*Opuntia sp.*)

Para la preparación de los extractos acuosos se emplearon cladodios de nopal frescos adquiridos en un mercado de la localidad. Los cladodios fueron cortados en trozos pequeños. Posteriormente, se mezclaron 143 g del material vegetal en un vaso de precipitado conteniendo 350 mL de agua destilada y se calentó a 95 °C durante 20 a 30 minutos. El extracto obtenido se enfrió a temperatura ambiente y se filtró utilizando gasa estéril como material filtrante. El extracto filtrado se secó a baja temperatura mediante liofilización utilizando un liofilizador Freeze Dry System/Freezone 4.5 marca LBCONCO. El extracto seco se depositó en un recipiente y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso. El extracto se caracterizó, determinando el contenido de sólidos totales [30] y sólidos solubles [31], azúcares totales [32] y reductores [33], grasa total [34], proteína total [35] y proteína soluble [36] y fenoles totales [37].

2.2. Biosíntesis de nanopartículas metálicas

La biosíntesis de nanopartículas de plata y la optimización de los diferentes parámetros de estudio se llevó a cabo en un reactor de vidrio con control de

temperatura y agitación mecánica. Para la síntesis de nanopartículas, se agregaron en un reactor enchaquetado de 250 mL, 60 mL de agua ultrapura y 4 mL de una solución de hidróxido de amonio al 30 %. La solución se mantuvo en agitación constante hasta alcanzar una temperatura de 80°C. Enseguida se adicionó un volumen de 8 mL de una solución de nitrato de plata (10 mM). La síntesis de nanopartículas de plata se inició con la adición de un volumen de 8 mL de una suspensión de extracto de nopal (0.2 g/8 mL). El volumen final de la reacción fue de 80 mL. La formación de las nanopartículas de plata se monitoreó mediante el cambio de absorción a 420 nm, utilizando un espectrofotómetro de UV-visible marca Shimadzu UV-2401 PC. Durante la obtención de los espectros se utilizó como referencia una mezcla con todos los reactivos a excepción del AgNO₃. En el estudio se evaluó el efecto de los parámetros de síntesis tales como la concentración del extracto, temperatura, concentración de AgNO₃, presencia de poli(vinil alcohol) como agente de estabilización y el tiempo de reacción sobre el tamaño, morfología y polidispersidad de las nanoestructuras metálicas obtenidas. El producto de reacción se caracterizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un equipo FEI, modelo TITAN 80-300kV, operado a 300 kV. Las imágenes se colectaron con una cámara CCD (Gatan de 1024 x 1024 pixeles) de resolución digital y se utilizó el software Digital Micrograph en ambiente Windows para determinar el tamaño y distribución de tamaño de las nanopartículas.

2.3. Preparación de nanofibras mediante electrohilado

En la preparación de las nanofibras de PVA/AgNPs se utilizó un equipo de electrohilado de fabricación casera y que consistió de una jeringa conteniendo la suspensión polimérica con las AgNP, el flujo volumétrico de esta suspensión se controló con una bomba de infusión, y para establecer el campo eléctrico, la aguja metálica de la jeringa se conectó a una fuente de alimentación de alto voltaje (ánodo). Las fibras se colectaron en un cátodo (conectado a tierra física) utilizando una lámina de aluminio, controlando la distancia entre el cátodo y el ánodo. Las nanofibras se obtuvieron a partir de soluciones acuosas de PVA al 10 %, con una mezcla de pesos moleculares de PVA de Mw 13,000-23,000 y Mw 126,000 en una relación 50:50. Se usaron diferentes cantidades de

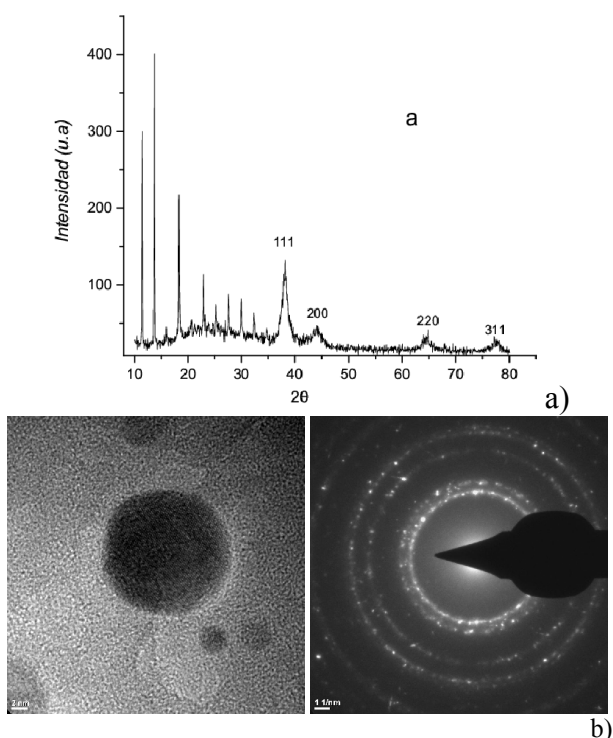


Figura 2. a) Patrón de difracción de rayos X de las AgNPs obtenidas empleando extracto de nopal como agente reductor, b) Imagen HR-TEM y patrón de difracción de las AgNPs.

nanopartículas de plata para formar las nanofibras. En la preparación de las nanofibras por electrohilado se utilizó un voltaje de 20 kV, distancia entre la punta de la aguja y el colector de 15 cm y un flujo volumétrico de la solución polimérica de 0.3 mL/h. Debido a que el PVA es un polímero hidrosoluble las membranas de nanofibras obtenidas se entrecruzaron sumergiendo la membrana de nanofibras en metanol durante 24 h. Las membranas poliméricas obtenidas se caracterizaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), microscopia electrónica de transmisión (TEM) para evaluar la morfología y tamaño de las fibras. También se cuantificó la distribución del tamaño de AgNPs en la dispersión y lo mismo se realizó con el diámetro de las nanofibras.

2.4. Actividad antimicrobiana de las AgNPs y membranas de nanofibras PVA/AgNPs

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las AgNPs obtenidas así como la de las membranas de nanofibras de poli(vinil alcohol) cargadas de nanopartículas de plata (PVA/AgNPs) se llevó a cabo usando cepas de microorganismos de importancia clínica. Para ello se utilizó el método conocido como de dilución en caldo [38]. Cada dispersión con diferente contenido de nanopartículas se evaluó contra las cepas de las bacterias *Escherichia coli* ATCC-25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC-29213 para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas de nanofibras se utilizó la Norma Industrial Japonesa Estándar Z2801 [39]. Para ello, se inocularon las membranas de nanofibras con cultivos de *Escherichia coli* ATCC-25922, *Staphylococcus aureus* ATCC-29213 y el hongo *Aspergillus Niger* ATCC-6275 para enseguida incubar durante un periodo de tiempo y establecer la actividad en base al porcentaje de inhibición mediante el recuento de células o esporas viables al final del ensayo. Para calcular la actividad antimicrobiana con este método se utilizó la siguiente ecuación (1):

$$R = [\log(B/A) - \log(C/A)] = [\log(B/C)] \tag{1}$$

En donde (R) es el valor de actividad antimicrobiana, (A) es el numero de células viables de la bacteria inmediatamente después de su inoculación en la muestra sin ningún tratamiento, (B) es el numero de células viables de la bacteria con la muestra sin tratamiento después de un periodo de exposición de 24 hs y (C) es el numero de células viables de la bacteria con la muestra conteniendo el agente antimicrobiano después de un periodo de exposición de 24 hs. El valor de actividad antimicrobiana de acuerdo al método no debe ser menor de 2.0 para el establecimiento de la eficiencia antimicrobiana del material [39].

3. Resultados y discusión.

Mediante el procesado de 3 kg de cladodios de nopal se obtuvieron 61 g de extracto seco de nopal. El análisis del extracto indica que los principales componentes presentes

Tabla 2. Comportamiento de la actividad antimicrobiana de membrana de nanofibras obtenidas de la reacción “in situ” de AgNPs en presencia de PVA y expuestas al hongo *Aspergillus niger* ATCC-9642.

MUESTRA	T ₀ (UFC/ML)	T ₂₄ UFC/ML	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	INHIBICIÓN (%)
PVA	22,022	19,989	0	0
PVA+ 25 ppm AgNPs	22,022	9,489	0.3	52.5
PVA+50 ppm AgNPs	22,022	0	5.3	100

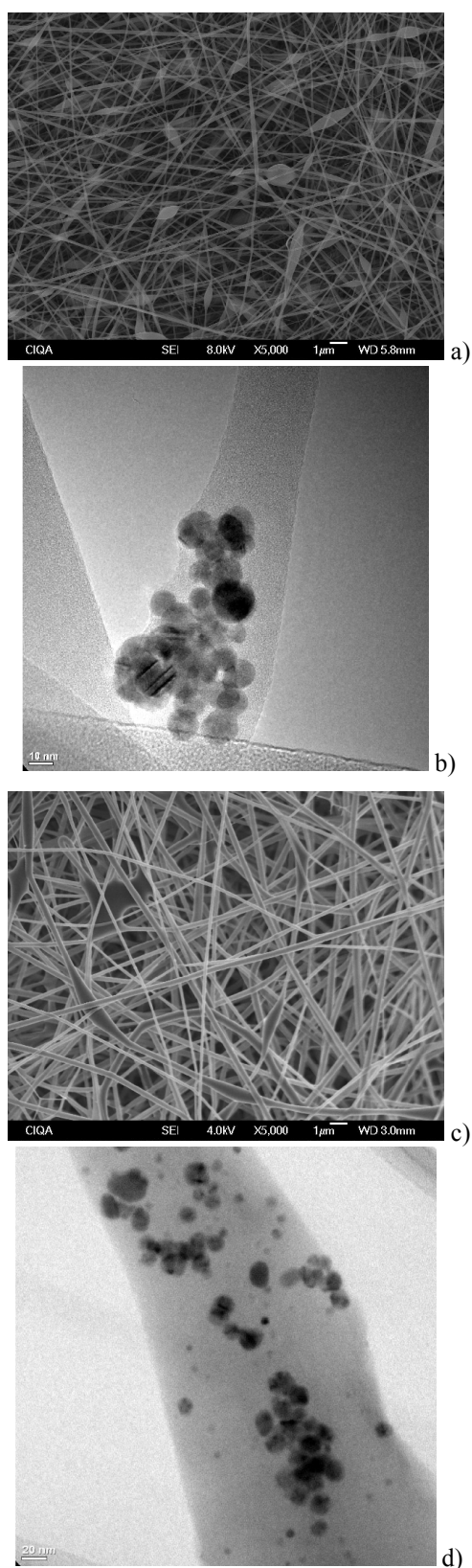


Figura 3. Imagen por a) SEM y b) TEM de nanofibras de PVA obtenidas a partir de la solución de AgNPs mezclada con una solución de PVA, Imagen por c) SEM y d) TEM de nanofibras de PVA obtenidas de una solución proveniente de la reacción “*in situ*” de AgNPs en presencia de PVA.

en una mayor proporción corresponden a 11.2 % de proteína total, 0.53 % de proteína soluble, 11.6 % de azúcares totales y 23.5 % de fenoles. Esta composición difiere de los trabajos reportados por otros autores [40-42], sin embargo estas diferencias pueden ser atribuidas a factores tales como la especie y estado de maduración del cladodio de nopal, variaciones climáticas y estacionales de su cultivo así como el método de extracción utilizado.

La figura 1, muestra el monitoreo de la reacción de biosíntesis de AgNPs mediante espectroscopia UV-visible así como el análisis por TEM de las nanopartículas obtenidas. En la figura 1a, se muestra el espectro de absorción UV-vis de la reacción de biosíntesis durante un periodo de tiempo de 4 h. En el espectro se observa una sola banda con un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 421 nm, la intensidad de este se va incrementando en función del tiempo de reacción. Este comportamiento, de acuerdo a la literatura se atribuye a la excitación de los plasmones de superficie de las nanopartículas de plata, los cuales originan una fuerte dispersión de la luz mediante un campo eléctrico a longitudes de onda en el intervalo de 400 a 450 nm [43,44]. La caracterización por TEM de las nanopartículas de plata obtenidas de la reacción empleando el extracto de nopal como agente reductor (Fig. 1b), permitió observar que la mayoría de las AgNPs obtenidas registran una morfología predominantemente esférica. La figura 1c, muestra el histograma de distribución de tamaño de las AgNPs. Como se muestra en el histograma el tamaño promedio de las AgNPs fue de 10 nm dentro de un intervalo de 4 a 28 nm. En la literatura se ha reportado la obtención de AgNPs con tamaños de 2 hasta 75 nm empleando extractos vegetales como agentes reductores [45-47]. A diferencia de lo que reportamos en este estudio, utilizando otros extractos de plantas para la síntesis de AgNPs se presenta una mezcla de morfologías al final de la reacción. En nuestro caso con el uso del extracto de nopal como agente reductor, logramos obtener partículas de orden nanométrico y con morfología uniforme de tipo esférica. Al igual que otros estudios previos donde se han utilizado extractos de diferentes fuentes vegetales para la síntesis de AgNPs, aparentemente, los azúcares y fenoles presentes en el extracto de nopal pueden estar actuando como agentes reductores en la formación de AgNPs [45, 48].

La figura 2, muestra el patrón de difracción de rayos X de las AgNPs sintetizadas, en la misma figura también se presenta a una micrografía TEM en su modalidad de alta resolución, donde se muestran los planos de crecimiento cristalino y sus distancias interplanares. En el difractograma de rayos X (Fig.2a) se aprecia la posición angular de las reflexiones localizadas a $2\theta = 38^\circ, 44^\circ, 65^\circ$ y 78° , indexadas como (111), (200), (220) y (311) respectivamente, que corresponde a los planos de difracción de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) de la plata elemental y estos concuerdan con el estándar de la ficha de difracción de polvos del JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, silver file No. 04-0783) [49]. La presencia de otras señales presentes en el difractograma puede corresponder a la

presencia del estabilizador y/o también a la presencia de alguno de los componentes del extracto de nopal, posiblemente asociado a las nanopartículas de plata. Se está investigando cual o cuales son los posibles candidatos. La micrográfica obtenida por HR-TEM (Fig.2b) muestra nanopartículas completamente aisladas, mientras que la imagen insertada muestra el patrón de difracción. Los patrones de difracción con distancias interplanares de 2.36 Å, 2.06 Å, 1.47 Å, 1.25 Å, que son consistentes con las familias de planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras de la plata metálica [50].

Para la obtención de nanofibras mediante electrohilado, los métodos de preparación evaluados fueron la preparación a partir de la solución de AgNPs mezclada con una solución de PVA y una solución proveniente de la reacción “*in situ*” de AgNPs en presencia de PVA. Las figuras 3a y 3b, muestran micrografías comparativas obtenidas por microscopía SEM y TEM de las nanofibras obtenidas mediante la mezcla de una solución de PVA con AgNPs (120 ppm). En la mezcla de la solución de PVA con las AgNPs (Fig. 3a) pudimos apreciar la formación de nanofibras, sin embargo en estas se visualizan la presencia de defectos tipo gota, los cuales se incrementaron conforme se aumentó la concentración de AgNPs, en nuestro caso estos defectos se pueden asociar a un aumento de carga eléctrica de la solución polimérica, lo que induce una mayor rapidez para vencer la tensión superficial en el cono de Taylor. Esto se traduce en un aumento considerable en el campo eléctrico, originando una mayor fuerza de estiramiento del chorro de la solución polimérica que impide la total evaporación del solvente formándose las gotas o defectos al depositarse las fibras en el colector de aluminio [51]. Asimismo, es posible observar que las AgNPs se encuentran pobremente distribuidas en el interior de la nanofibras, esto se puede atribuir a la formación de aglomerados de partículas distribuidas a lo largo de la fibra, que posiblemente ocurran durante el mezclado de las AgNPs con el polímero. El análisis de la distribución de tamaño promedio del diámetro de las fibras fue de 200 nm. Analizando estos resultados se puede establecer que el tamaño y la presencia de defectos en las fibras dependen considerablemente de la concentración de AgNPs en la solución polimérica. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos por Kim y colaboradores [52] donde establece que el aumento de concentración de nanopartículas de plata origina un incremento en la conductividad de la solución polimérica debido al aumento de las fuerzas de repulsión entre las cargas positivas que las nanopartículas poseen en su superficie. Este aumento genera un estiramiento del chorro de la solución que provoca por consiguiente una disminución del diámetro de las fibras. El análisis por microscopía SEM de las nanofibras con AgNPs (120 ppm), estas últimas preparadas directamente en la solución de PVA, y su posterior electrohilado presenta una morfología uniforme con un diámetro promedio de 250 nm y también una apreciable disminución en los defectos de estas nanoestructuras (Fig 3c). La figura 3d muestra una micrografía por TEM donde

se observan las AgNPs embebidas en el interior las nanofibras de PVA. Mediante este procedimiento de síntesis “*in situ*” de las AgNPs, utilizando una solución de PVA y su posterior electrohilado es indudable que se logró una mejor dispersión de las nanopartículas con la presencia de una menor proporción de aglomerados de AgNPs. En base a estos resultados fue posible establecer que mediante la estrategia de reacción “*in situ*” se lograron obtener membranas fibrosas con una distribución del diámetro de fibra uniforme y buena dispersión de las AgNPs en el interior de las nanofibras.

El análisis de la actividad antimicrobiana de las AgNPs con el método de dilución en caldo [38], los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para *E. coli*, tanto para la CMI así como para la CMB, fue de 185 ppm, mientras que en *S. aureus* estos valores de actividad antimicrobiana CMI y CMB fueron de 40 ppm y 67 ppm respectivamente. Estas diferencias entre ambos microorganismos se han atribuido principalmente a la diferencia en la estructura y composición de la pared celular, existente entre los microorganismos gram positivos y gram negativos [53].

El comportamiento de la actividad antimicrobiana de membranas de nanofibras conteniendo AgNPs obtenidas de la reacción “*in situ*”, expuestas a la bacteria *E. coli* se muestra en la tabla 1. En esta tabla se observa que las membranas de PVA sin AgNPs experimentaron un incremento considerable de la población de *E. coli*, pero a medida que se incrementó la concentración de AgNPs hasta una concentración de 50 ppm esta población tiende a disminuir a valores muy bajo e incluso se elimina totalmente. Valores de actividad antimicrobiana mayores a 2.0 se observaron a concentraciones de 25 y 50 ppm, alcanzando una inhibición del 99.9 % y 100 % respectivamente cuando el microorganismo se incubó por un periodo de 24 h en presencia de las membranas cargadas con AgNPs, para el caso de una concentración de 25 ppm, así como una inhibición total (100 % de inhibición) de las membranas con una concentración de 50 ppm de AgNPs a un periodo de exposición de 24 hs. En tanto que la actividad antimicrobiana frente a la cepa de *S. aureus*, una concentración de 20 ppm fue suficiente para lograr una inhibición total del crecimiento de este microorganismo. La evaluación de la actividad antifúngica con la cepa de *Aspergillus niger* se realizó utilizando las esporas de este microorganismo, efectuando el conteo de esporas por placa y determinando el porcentaje de inhibición de la germinación de las mismas. La tabla 2, muestra el comportamiento de la actividad antimicrobiana de nanofibras expuestas al hongo *A. niger*. El contenido de esporas tiende a disminuir a medida que se incrementó el contenido de AgNPs, logrando una inhibición total de las esporas del hongo a una concentración de 20 ppm. Debido a que se trabajó a nivel de esporas, no se registró en el caso de la membrana de nanofibras de PVA un número de esporas mayor al valor inicial después de un periodo de exposición de 24 h. Hasta la fecha no se ha propuesto ningún mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre los hongos. Por lo que en este trabajo sugerimos la

hipótesis de que las nanopartículas de plata presentan un efecto durante la etapa de formación del micelio. El crecimiento del hongo surge mediante la germinación de la espora, provocando la formación de un tubo germinal que crece linealmente convirtiéndose eventualmente en una hifa. La hifa puede estar dividida, según su composición citoplasmática de organelos, en tres regiones principales: apical, subapical y distal. Al exceder una cierta longitud se forma una nueva extremidad o rama a lo largo de la hifa. El incremento en las ramificaciones de las hifas origina la formación del micelio [54]. Durante la formación del tubo germinal, la pared de la hifa es más delgada y frágil en la parte apical, proponiendo que éste sea el momento que permita la interacción de las nanopartículas de plata en la pared celular, provocando un efecto similar al que ocurre con las células de bacterias, en las cuales se incrementa la permeabilidad de la membrana y con ello la liberación de componentes esenciales para el metabolismo de la célula.

4. Conclusiones

Utilizando extractos acuosos de cladodios de nopal como agente reductor de los iones plata fue posible fabricar nanopartículas de plata con una morfología predominante esférica con tamaños que oscilan entre 4-28 nm, y un tamaño promedio de 10 nm. Mediante espectroscopia UV-visible fue posible detectar la presencia del plasmon con absorción alrededor de 420 nm y mediante DRX se obtuvieron los patrones de difracción con distancias interplanares de 2.36 Å, 2.06 Å, 1.47 Å, 1.25 Å, que corresponden a las familias de planos (111), (200), (220) y (311) típica de la estructura cúbica centrada en las caras de la plata cero o metálica. Los mejores resultados para la preparación de membranas de nanofibras de PVA cargadas con AgNPs, obtenidas a través de electrohilado se obtuvieron cuando estas nanoestructuras se prepararon “*in situ*”, en donde la síntesis se realizó en la solución de PVA, previo al electrohilado de este polímero. De esta forma se obtuvieron AgNPs con una buena dispersión en el interior de las nanofibras de PVA. Además, se logró obtener nanofibras homogéneas con un tamaño promedio de diámetro de 250 nm. Las membranas de estas nanofibras mostraron propiedades antimicrobianas, capaces de inhibir cepas de importancia clínica, como son *E. coli*, *S. aureus* y el hongo *A. niger*. Concentraciones de 50 ppm, 20 ppm fueron suficientes para inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* respectivamente y para el hongo *A. niger* fue de 20 ppm.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero por parte del CONACYT a través del proyecto titulado “Development of new nanocomposites using materials from mining industry” dentro de la convocatoria del programa Unión Europea/CONACYT FP7-NMP-2010-EU. Agradecemos a la M.C. Mónica Ceniceros por su apoyo técnico durante la realización del proyecto. También agradecemos al L. N M. G. por el apoyo financiero a través del Proyecto CONACYT, número 232753

Referencias

- [1]. Mozafari, M.R. Nanomaterials and Nanosystems for biomedical Applications. **1**, 2 (2007).
- [2]. Chen. X., Schuluesener, H. Toxicology Letters. **176**, 1 (2008).
- [3]. Khaydarov, R., Gapurova, O., Estrin, Y. Nanostructured materials for advanced Technology Applications, Springer Science. 215 (2009).
- [4]. Necula, B., Fratila-Apachitei, L., Zaat, S., Apachitei, I., Duszczyn, J. Acta Biomater. **5**, 3573 (2009).
- [5]. Madhumathi, K., Kumar, P., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., Nair, S., Jayakumar, R. J. Mater Sci Mater Med. **21**, 807 (2010).
- [6]. Xie Y., Ye R., Liu H. Colloids and Surfaces, **A279**, 175 (2006).
- [7]. Guzman, M.G., Dille J., Godet S. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. **33**, 367 (2008).
- [8]. Selker R.A., Jeevanandam P., Aruna S.T., Koltypin Y., Gedanken A. J. Mater. Chem., **9**, 1333 (1999).
- [9]. Zhu J.J., Liao X.H., Zhao X.N., Hen H.Y., Material Letters. **49**, 91 (2001).
- [10]. Dickson D.P.E., J. Mag. Mater. **203**, 46 (1999).
- [11]. Klaus T., Joerger R., Olsson E., Granqvist C.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**, 13611 (1999).
- [12]. Duran N., Marcato P.D., Alves, O.L., DeSousa G.I., Esposito E. J. Nanobiotech. **3**, 8 (2005).
- [13]. Sastry M., Ahmed A., Khan M.I., Kumar R., Current Science. **8**, 162 (2003).
- [14]. Gardea-Torresdey J.L., Gomez E., Peralta-Videa J.R., Parsons J.G., Troiani H., Yacaman J., Langmuir. **19**, 1357 (2003).
- [15]. Armendariz B., Herrera I., Peralta-Videa J.R., Yacaman J., Troiani H., Santiago P., Gardea-Torresdey J.L., J. Nanoparticle Res. **6**, 377 (2004).
- [16]. Shankar S.S., Rai A., Ahmed A., Sastry M., J. Colloid Interf. Sci. **275**, 496 (2004).
- [17]. Chen H., Yang W., Zhang Q., Wang Y., Controlled Release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats. **73**, 75 (2009).
- [18]. Park B.K., Jeong S., Kim D., Moon J., Lim S., Kim J.S., J. Colloid Interf. Sci. **311**, 417 (2007).
- [19]. Zhu H.T., Lin Y.S., Yin Y.S., J. Colloid Interf. Sci. **277**, 100 (2004).
- [20]. Ahmad A., Senapati S., Khan M.I., Kumar R. and Sastry M., J. Biomed Nanotechnol. **1**, 47 (2006).
- [21]. Ahmad A., Senapati S., Khan M.I., Kumar R. and Sastry M., Langmuir, **19**, 3550 (2003).
- [22]. Mandal D., Bolander E.M., Mukhopadhyay D., Sarkar G. and Mukherjee P., Appl. Microbiol. Biotechnol. **69**, 485 (2006).
- [23]. Govindaraju K., Basha S.K., Kumar V.J. and Singaravelu G., J. Mater. Sci., **43**, 5115 (2008).
- [24]. Shankar S.S., Ahmad A., Pasricha R. and Sastry M., J. Mater. Chem., **13**, 1822 (2003).
- [25]. Shukla R., Nune K.S., Chanda N., Katti K., Mekapothula S., Kulkarni R.R., Welshons V.W., Kannan R. and Katti K.V., Small **4**(9), 1425 (2008).
- [26]. Nurul Amal Nadhirah Mohamad, Nur Afiqah Arham, Junaidah Jai, Abdul Hadi, 2014. Adv. Matter. Resch. **832**, 350 (2014).
- [27]. Pomogailo A.D., Kestelman V.N., Metallopolymer nanocomposites in Springer series Material Science. **81**, 131 (2005).
- [28]. Ramakrishna S., Fujihara K.F., Teo. W.E., Lim T. Ch., Ma Z., (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2005).

- [29]. Pomogailo A.D., Kestelman V.N., Matallopolymer nanocomposites in Springer series Material Science **81**, 125 (2005).
- [30]. NOM-AA34-1976, Método de Determinación de sólidos totales.
- [31]. NOM-AA20-1980, Método de Determinación de sólidos disueltos.
- [32]. Herbert D., Philips P.J., Strange R.E. "Chemical análisis of Microbial cells. Methods in Microbiology", Academic Press, London. **5B**, 209 (1971)
- [33]. Somogyi M. J. Biol. Chem. **200**, 245 (1952).
- [34]. AOAC-14.062. First edition. 232 (1975).
- [35]. ASTM, 1968, **28**, 1278 (1968).
- [36]. Bradford M., Anal. Biochem., **72**, 248 (1976).
- [37]. Graca M.A.S., Barlocher F., Gessner M.O. Methods to study litter decomposition: A practical guide. Springer. Chapter **13**, 97 (2005).
- [38]. Ledezma A.S., Romero J., Padron G., Comunicación Personal. Centro de Investigación en Química Aplicada. BP-008-07 (2007).
- [39]. JIS Z 2801: 2000 (E).
- [40]. Hernandez- Urbiola M., Pérez-Torrero E., Rodriguez-García M., Int. J. Environ. Res. Public Health, **5**, 1287 (2011).
- [41]. Cntwell M., Rodriguez-Felix A., Plants Food for Human Nutrition. **38**, 83 (1988).
- [42]. Lee J.C., Kim H.R., Kim J., Jang Y.S., J. Agric. Food Chem. **50**, 6490 (2002).
- [43]. Cruz D., Rodriguez M., Lopez J., Herrera V., Orive A., Creus A., Av. Cien. Ing., **3**, 67 (2012).
- [44]. Hu B., Wang S., Wang K., Zhang M., Yu S., J. Phys. Chem. C., **112**, 11169 (2008).
- [45]. Huang J., Li Q., Sun D., Lu Y., Su Y., Yang X., Wang H., Wang Y., Shao W., He N.H., Chen J., Nanotechnology, **18**, 105104 (2007).
- [46]. Chandran S.P., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmed A., Sastry M., Biotechnology progress. **22(2)**, 577 (2006).
- [47]. Mukherjee A., Tripathy A., Raichur A., Chandrasekaran N., Prathna T., J. Nanopart. Res., **12**, 237 (2010).
- [48]. Rico A., Vilchis A., Sánchez V., Superficies y Vacío, **23(S)**, 94 (2010).
- [49]. He D., Hu B., Yao Q., Wang K., Yu S., **3**, 3993 (2009).
- [50]. Guzman M., Dille J., Godet S., International Journal of Chemical and Biological Engineering, **2**, 104 (2009).
- [51]. Hagh A.K. and Gennady E. Zaikov. Production of electrospun nanofibers: An Investigation on governing parameters, in Nanopolymers and Modern Materials: preparation, Properties and Applications., (CrC Press, Boca Raton FL, USA, 347 2014).
- [52]. Kim E., Kim S., Lee C., Macromolecular Reserch **18**, 215 (2010).
- [53]. Baron S., Medical Microbiology (4^a Edición, Chapter 12, 1996).
- [54]. Carpenter P., Microbiología, 2.s.1 (Interamericana, 139 1969).