



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



SÍNTESIS BIOASISTIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AGNP), ÓXIDO DE ZINC (ZNO-NP) Y ÓXIDO DE COBRE (CUO-NP) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EMPLEANDO EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ORGÁNICA

PRESENTA:

M.C. JORGE LUIS TORRES LÓPEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. CARLOS ERNESTO LOBATO GARCÍA

EN CODIRECCIÓN CON:

**DR. ABRAHAM GÓMEZ RIVERA
DR. SERGIO ALBERTO GÓMEZ CORNELIO**

CUNDUACÁN, TABASCO, JUNIO DE 2026

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

En la ciudad de Cunduacán, Tabasco, el día 06 del mes de agosto del año 2026, el que suscribe Jorge Luis Torres López, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias con Orientación en Materiales, Nanociencias y Química Orgánica (DCOMNQO), con número de matrícula 222A25001, adscrito a la División Académica de Ciencias Básicas (D.A.C.B.) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la tesis presentada para la obtención del grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Química Orgánica (DCOQO), titulada:

“SÍNTESIS BIOASISTIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP), ÓXIDO DE ZINC (ZnO-NP) Y ÓXIDO DE COBRE (CuO-NP) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EMPLEANDO EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES”,

dirigida por el **Dr. Carlos Ernesto Lobato García** y codirigida por el **Dr. Abraham Gómez Rivera** y el **Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio**.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la **Ley Federal del Derecho de Autor** —Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 1 de julio de 2020, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia—, en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la tesis presentada, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Cunduacán, Tabasco, a 06 de agosto de 2026.

Atte:



M.C. Jorge Luis Torres López
Nombre y firma



UJAT

UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Básicas



2026
año de
Margarita
Maza

DIRECCIÓN

24 de junio de 2026

M.C. JORGE LUIS TORRES LÓPEZ
EGRESADO DOCTORADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ORGÁNICA
PRESENTE

Por medio del presente y de la manera más atenta, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que se le **AUTORIZA** la impresión del trabajo de Tesis titulado "**SÍNTESIS BIOASISTIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP), ÓXIDO DE ZINC (ZnO-NP) y ÓXIDO DE COBRE (CuO-NP) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EMPLEANDO EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES**" bajo la Dirección de Dr. Carlos Ernesto Lobato García, Dr. Abraham Gómez Rivera y Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio.

La Comisión revisora conformada por el **Dr. Ever Arquímedes Blé González, Dr. Adrián Cervantes Uribe, Dr. Miguel Ángel Vilchis Reyes, Dr. Luis Fernando Roa de la Fuente, Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dr. Raúl García Morales** aprobó el documento en virtud de reunir los requisitos para el **EXAMEN PROFESIONAL** y obtener el grado de **Doctor en Ciencias con orientación en Química Orgánica** bajo la modalidad de titulación por Tesis.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.C.P.- Archivo.

Dir'Dra.HPV/JP'Dra.LAR/jkal** *J*

Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6702,6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Cunduacán, Tabasco, a 06 de agosto de 2026.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como **AUTOR(A) y/o AUTORES(AS)** en la producción, creación y/o realización de la obra denominada:

“SÍNTESIS BIOASISTIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP), ÓXIDO DE ZINC (ZnO-NP) Y ÓXIDO DE COBRE (CuO-NP) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EMPLEANDO EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES”.

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor, y toda vez que la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100 % la titularidad de los derechos patrimoniales por un periodo de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

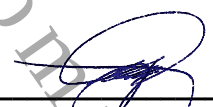
COLABORADORES



M.C. Jorge Luis Torres López
Alumno o egresado



Dr. Carlos Ernesto Lobato García
Director



Dr. Abraham Gómez Rivera
Codirector



Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio
Codirector

TESTIGOS



Eric Jaziel Medrano Sánchez
Nombre y firma del testigo



Dra. Nancy Romero Ceronio
Nombre y firma del testigo

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en los laboratorios de Química Orgánica de la División Académica de Ciencias Básicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT); así como también en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica del Centro (UPC) bajo la dirección del Dr. Sergio Gómez Cornelio. Además, de la colaboración especial de la Dra. Patricia Quintana y de la estudiante de doctorado Stephania Lázaro-Mass del departamento de Física Aplicada del Cinvestav-Merida; así como de la Dra. Aranzazu Sierra-Fernández del Centro de Investigación Cooperativa en Nanociencias y del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural - Centro de Investigación en Corrosión de la Universidad Autónoma de Campeche (UAC) quienes contribuyeron en la caracterización de los nanomateriales.

Se contó aparte con el apoyo económico recibido por Secihti antes CONACyT con No. 828086.

DEDICATORIA:

Al Hijo de Dios, mi Señor Jesús, el Santo, el Verdadero, el que abre y ninguno cierra, y cierra y ninguno abre. Por darme la vida, las fuerzas y una segunda oportunidad para vivir y alcanzar este propósito de ver culminado este trabajo. Eres mi más grande tesoro, mi perla de gran precio. A ti dedico todos mis logros y mi corazón.

A mi amada esposa Clara Solis Vicente, bien dijo Dios: “No es bueno que el hombre esté solo” y tú haz sido el medio de gracia que mi Señor usó para mostrarme su amor. Gracias por nunca dejarme solo, por apoyarme en los duros momentos que nos tocó vivir, por estar a mi lado y alentarme a seguir adelante, solo tú sabes lo mucho que me ha costado y dar por concluido este trabajo, a ti te lo dedico con todo mi amor, te ama, tu amor precioso.

A mis padres Tilo del Carmen Torres Martínez y Marbella López Pérez, por siempre estar y apoyarme. Por su aliento, su amor y su fe que me iba a levantar de mi enfermedad, este trabajo es un testimonio y fruto de ello. Todo es posible para el que cree.

Finalmente, a mis hijos Elian y Jorgito mi motor y mi herencia en este mundo, mis hermanos Mauricio y Karina por ser mis hermanos y quererme tanto, mi suegra doña Angela y mis cuñados (Flor, Alfredo, Bartola, Nayi, Matea, y los que me faltaron), que son como una familia más que el Señor me regaló. Y a todos y cada una de las personas que han creído en mí y me han impulsado a seguir adelante. A ustedes también dedico este trabajo. Gracias de todo corazón.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios una vez más por darme la vida, las fuerzas y la entereza para concluir con este trabajo.

Al Dr. Sergio Gómez Cornelio por su valioso apoyo, tanto académico como personal y su paciencia y compromiso a lo largo de todo el proceso de este trabajo de tesis, mucho se lo debo a usted, en verdad gracias por todo.

A la universidad Politécnica del Centro (UPC) por brindarme las facilidades para la realización y culminación de esta tesis.

Al laboratorio de Microbiología Aplicada de la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT, bajo la dirección de la Dra. Susana De la Rosa-García.

Al Dr. Carlos Ernesto Lobato García, pues es un ejemplo para mí de dedicación y pasión por el trabajo. Aprendí mucho de usted a lo largo de mi formación académica.

Al Dr. Abraham por sus valiosos consejos y por ser ejemplo de constancia, dedicación y amor por la ciencia.

A la Dra. Nancy Romero por ser mi maestra en los años de formación profesional y ayudarme a trabajar con calidad y a valorar la vida y la familia como un regalo de Dios

Al Dr. Luis Fernando Roa de la Fuente, quien me alentó día a día, siempre recordaré con mucho cariño las pláticas en su cubículo y todas sus atenciones. Descanse en paz.

A mis amigos, por ser grandes personas que han influenciado positivamente en mí. A mis compañeros de laboratorio y a la DACB por ser mi casa por tantos años, por todas las facilidades y apoyos recibidos.

**SÍNTESIS BIOASISTIDA DE NANOPARTÍCULAS
DE PLATA (AgNP), ÓXIDO DE ZINC (ZnO-NP) Y
ÓXIDO DE COBRE (CuO-NP) CON ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA EMPLEANDO EXTRACTOS
DE PLANTAS MEDICINALES**

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	14
1.1. Generalidades sobre metabolitos secundarios en plantas medicinales.	15
1.2. Plantas medicinales con actividad antibacteriana.	17
1.2.1. <i>Acalypha arvensis</i> (hoja de araña).	17
1.2.2. <i>Hampea rovirosae</i> (majagua).	18
1.2.3. <i>Inga jinicuil</i> (Cuijinicuil).	18
1.3. Generalidades sobre síntesis de NP.	19
1.3.1. Papel de los metabolitos secundarios en la síntesis bioasistida de NP.	22
1.3.2. Aspectos termodinámicos de la síntesis bioasistida de NP de base metálicas.	25
1.3.3. Cloruros presentes en el medio de reacción y su rol en la síntesis bioasistida.	27
1.3.4. Síntesis bioasistida de NP mediante extractos de plantas.	28
1.3.5. Tratamiento térmico	32
1.4. Caracterización de NP.	34
1.4.1. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis).	34
1.4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	36
1.4.3. Difracción de rayos X (DRX).	37
1.4.4. Dispersión de luz dinámica (DLS).	39
1.4.5. Potencial Z.	41
1.4.6. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).	43
1.4.7. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).	44
1.5. Métodos para determinar la actividad antibacteriana.	46
1.5.1. Actividad antibacteriana por método de difusión en agar.	46
1.5.2. Actividad antibacteriana por método de microdilución.	48
1.6. Correlación de Pearson.	50
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN	52
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	55
CAPÍTULO IV: OBJETIVOS	57
4.1. Objetivo General.	58
4.2. Objetivos Específicos.	58
CAPÍTULO V: METODOLOGÍA	59

5.1. Obtención y caracterización de los extractos acuosos de las tres plantas medicinales.	61
5.1.1. <i>Preparación de extractos acuosos y caracterización mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).</i>	61
5.1.2. <i>Determinación del contenido de polifenoles, flavonoides y cloruros totales.</i>	61
5.2. Síntesis bioasistida de NP.	63
5.2.1. <i>Síntesis de NP de plata (AgNP).</i>	63
5.2.2. <i>Síntesis de NP de óxido de zinc (ZnO-NP).</i>	63
5.2.3. <i>Síntesis de NP de óxido de cobre (CuO-NP).</i>	64
5.3. Caracterización de las NP de Ag, ZnO y CuO.	65
5.3.1. <i>Caracterización de las NP de Ag.</i>	65
5.3.2. <i>Caracterización de las NP de ZnO.</i>	66
5.3.3. <i>Caracterización de las NP de CuO.</i>	66
5.4. Actividad antibacteriana de extractos y NP.	67
5.4.1. <i>Ensayo de difusión en disco.</i>	67
5.4.2. <i>Método de microdilución en caldo.</i>	67
5.5. Correlación de Pearson.	68
CAPÍTULO VI: RESULTADOS	70
6.1. Caracterización de los extractos acuosos de <i>A. arvensis</i>, <i>H. rovirosae</i> e <i>I. jinicuil</i>.	71
6.1.1. <i>Caracterización mediante FTIR.</i>	71
6.1.2. <i>Cuantificación de flavonoides, polifenoles y cloruros totales de los extractos.</i>	72
6.2. Rendimiento de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP.	73
6.3. Caracterización de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP.	74
6.3.1. <i>Caracterización de las AgNP.</i>	74
6.3.2. <i>Caracterización de las ZnO-NP.</i>	85
6.3.3. <i>Caracterización de las CuO-NP.</i>	97
6.4. Actividad antibacteriana de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP	110
6.4.1. <i>Evaluación del actividad antibacteriano de las AgNP.</i>	110
6.4.2. <i>Evaluación de las propiedades antibacterianas de las ZnO-NP.</i>	113
6.4.3. <i>Evaluación de las propiedades antibacterianas de las CuO-NP.</i>	116
6.5. Análisis de correlación de Pearson.	117
6.5.1. <i>Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos, el rendimiento, la temperatura y las propiedades de las AgNP.</i>	117
6.5.2. <i>Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos, el rendimiento, la temperatura y las propiedades de las ZnO-NP.</i>	118
6.5.3. <i>Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos, el rendimiento, la temperatura y las propiedades de las CuO-NP.</i>	119

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN DE RESULTADOS	121
CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	131
BIBLIOGRAFÍA	134
ANEXOS	152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios importantes en la síntesis de NP de base metálica.	24
Tabla 2. Potenciales de reducción de Ag^+ , Cu^{2+} y Zn^{2+} frente al potencial de oxidación de polifenoles y su diferencia termodinámica (ΔE).	26
Tabla 3. Concentración de polifenoles, flavonoides y de cloruros totales de los extractos acuosos de las plantas medicinales: <i>A. arvensis</i> , <i>H. rovirosae</i> e <i>I. jinicuil</i> .	72
Tabla 4. Rendimiento de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.	73
Tabla 5. Estimación del tamaño teórico de cristalito mediante ecuación de Scherrer.	78
Tabla 6. Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de las AgNP obtenidas mediante extractos de plantas medicinales.	79
Tabla 7. Composición elemental de las AgNP (60°C y 500°C) determinada mediante EDS.	83
Tabla 8. Estimación del tamaño teórico de cristalito mediante ecuación de Scherrer.	89
Tabla 9. Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de las ZnO-NP obtenidas mediante extractos de plantas medicinales.	90
Tabla 10. Composición elemental de las ZnO-NP (60°C y 500°C) determinada mediante EDS.	94
Tabla 11. Estimación del tamaño teórico de cristalito mediante ecuación de Scherrer.	101
Tabla 12. Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de las CuO-NP obtenidas mediante extractos de plantas medicinales.	103
Tabla 13. Composición elemental de las CuO-NP (60°C y 500°C) determinada mediante EDS.	107
Tabla 14. Actividad antibacteriana (valores MIC y MBC en mg/mL) y modo de acción de las AgNP contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	112
Tabla 15. Actividad antibacteriana (MIC y MBC en mg/mL) y modo de acción de las ZnO-NP contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	115
Tabla 16. Actividad antibacteriana (valores MIC y MBC en mg/mL) y modo de acción de las CuO-NP contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	116
Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados obtenidos de las AgNP.	117
Tabla 18. Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados obtenidos de las ZnO-NP.	118
Tabla 19. Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados obtenidos de las CuO-NP.	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de compuestos bioactivos representativos de las tres clases principales: alcaloides (cafeína), terpenos (eugenol) y polifenoles (miricetina).	16
Figura 2. Plantas medicinales empleadas en el presente trabajo: <i>Acalypha arvensis</i> (Hierba de Araña) Voucher No. 036228, <i>Hampea rovirosae</i> (Majagua) Voucher No. 36665 e <i>Inga Jinicuil</i> (Cuijinicuil) Voucher No. 36576.	17
Figura 3. Principales métodos de síntesis de NP de base metálicas mediante enfoques <i>bottom-up</i> y <i>top-down</i> , incluyendo métodos físicos, químicos y biológicos.	20
Figura 4. Esquema representativo de los enfoques <i>bottom-up</i> y <i>top-down</i> para la síntesis de NP de base metálicas.	21
Figura 5. Proceso de síntesis de NP metálicas por reducción de iones metálicos y estabilización con agentes protectores.	23
Figura 6. Esquema general del proceso de síntesis bioasistida de NP de base metálica utilizando extractos de plantas medicinales. La figura muestra las etapas clave en la síntesis bioasistida de NP. Imagen propia	29
Figura 7. a) Espectrofotómetro modelo VE-8000A (VELAB, México), utilizado para mediciones en el rango ultravioleta-visible. b) Esquema de los componentes básicos de la técnica de espectrofotometría UV-Vis de doble haz, mostrando la trayectoria de la luz desde las fuentes UV y visible, el monocromador, los espejos y semiespejos, las cubetas de referencia y muestra, y los detectores correspondientes.	35
Figura 8. a) Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) marca Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.); b) Esquema de los componentes principales de un FTIR, incluyendo fuente de luz coherente, divisor de haz, espejos (estacionario y móvil), muestra y detector.	36
Figura 9. I) Difractómetro D8 Advance (Bruker, MA, USA) con radiación Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). II) a) Interferencias destructivas, b) interferencias constructivas entre los rayos X y la estructura cristalina. El refuerzo de la señal ocurre en los ángulos que cumplen con la ley de Bragg. c) Diagrama de un difractómetro, que presenta la muestra en polvo y los haces incidentes y difractados.	38
Figura 10. a) Esquema básico del principio de funcionamiento de la técnica DLS, mostrando la interacción de un haz láser con la muestra termostatizada y la detección de la luz dispersada a un ángulo θ . b) Equipo de DLS modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) utilizado para la caracterización de NP.	40
Figura 11. a) Electrodo ZEN1002-Zeta Dip Cell utilizado para la determinación del potencial zeta de las NP en suspensiones coloidales. b) Representación esquemática de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula y la definición del plano de deslizamiento, potencial superficial y potencial zeta.	41
Figura 12. a) Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM JEOL JSM-7600F) usado en la caracterización morfológica de NP y b) Esquema de los componentes principales de un microscopio electrónico de barrido (SEM), mostrando la trayectoria del haz de electrones desde la fuente hasta la muestra, y la disposición de los detectores y sistemas de control.	44
Figura 13. a) Espectrómetro de fotoelectrones K-Alpha (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) utilizado para análisis de espectroscopía de fotoelectrones excitados por rayos X (XPS). b) Principio de funcionamiento del XPS, mostrando la interacción del haz incidente con los electrones de la muestra y la emisión de fotoelectrones desde diferentes niveles de energía.	45

Figura 14. Representación esquemática del ensayo de difusión en disco para evaluar la actividad antibacteriana. a) Disposición inicial de los discos con agentes antibacterianos sobre el agar antes de la incubación. b) Placa de Petri después de 24-48 h de crecimiento, mostrando las zonas de inhibición (sin crecimiento bacteriano) y las áreas con crecimiento bacteriano.	47
Figura 15. Esquema de una microplaca de 96 pocillos utilizada en el método de microdilución para la determinación de la MIC de agentes antibacterianos. Las columnas representan diluciones seriadas 1:2 obtenidas mediante transferencia sucesiva con micropipeta, mientras que las filas corresponden a distintas condiciones experimentales, incluyendo controles positivo y negativo.	49
Figura 16. Representación Gráfica de la Correlación de Pearson según el Coeficiente 'r'. Donde $r = 1$ indica una correlación positiva perfecta, $r = -1$ indica una correlación negativa perfecta y $r = 0$ indica ausencia de correlación lineal.	51
Figura 17. Esquema metodológico general para la síntesis bioasistida de NP de Ag, ZnO y CuO usando extractos de plantas medicinales, incluyendo su evaluación antibacteriana y el análisis estadístico de los resultados.	60
Figura 18. Espectros FTIR de los extractos acuosos de <i>A. arvensis</i> , <i>H. rovirosae</i> e <i>I. jinicuil</i> .	71
Figura 19. Espectros FTIR: (a) extracto de <i>A. arvensis</i> vs Ag-Aa-60 vs Ag-Aa-500 b) <i>H. rovirosae</i> vs Ag-Hr-60 vs Ag-Hr-500 y c) <i>I. jinicuil</i> vs Ag-Ij-60 vs Ag-Ij-500 .	75
Figura 20. Espectro de UV-Vis de las AgNP obtenidas mediante el extracto de plantas medicinales.	76
Figura 21. Patrones de DRX de AgNP sintetizadas utilizando extractos de <i>A. arvensis</i> , <i>H. rovirosae</i> e <i>I. jinicuil</i> , a 60 °C (a) y a 500 °C (b).	77
Figura 22. Distribución del tamaño hidrodinámico de las AgNP sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).	79
Figura 23a. Micrografías FESEM de las AgNP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. a) Ag-Aa-60 , b) Ag-Hr-60 y c) Ag-Ij-60 .	80
Figura 23b. Micrografías FESEM de las AgNP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. d) Ag-Aa-500 , e) Ag-Hr-500 y f) Ag-Ij-500 .	81
Figura 24. Comparación del tamaño promedio de las AgNP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.	82
Figura 25. Espectros XPS de AgNP sintetizadas utilizando extractos de plantas medicinales. Espectros de alta resolución de Ag 3d a) 60 °C y c) 500 °C. Espectros de barrido general b) 60 °C y d) 500 °C.	84
Figura 26. Espectros FTIR: (a) extracto de <i>A. arvensis</i> vs Zn-Aa-60 vs Zn-Aa-500 b) <i>H. rovirosae</i> vs Zn-Hr-60 vs Zn-Hr-500 y c) <i>I. jinicuil</i> vs Zn-Ij-60 vs Zn-Ij-500 .	86
Figura 27. Espectros UV-Vis de las ZnO-NP sintetizadas con extractos de plantas medicinales.	87
Figura 28. Patrones de DRX de ZnO-NP sintetizadas utilizando extractos de <i>A. arvensis</i> , <i>H. rovirosae</i> e <i>I. jinicuil</i> , a 60 °C (a) y a 500 °C (b).	88
Figura 29. Distribución del tamaño hidrodinámico de las ZnO-NP sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales, secadas a 60 °C (a) y calcinadas a 500 °C (b).	89
Figura 30a. Micrografías FESEM de las ZnO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. a) Zn-Aa-60 , b) Zn-Hr-60 y c) Zn-Ij-60 .	91

Figura 30b. Micrografías FESEM de las ZnO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. d) Zn-Aa-500 , e) Zn-Hr-500 y f) Zn-Ij-500 .	92
Figura 31. Comparación del tamaño promedio de las ZnO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.	93
Figura 32. Espectros XPS de ZnO-NP sintetizadas utilizando extractos de plantas medicinales. Espectros de alta resolución de Zn 2p a) 60 °C y c) 500 °C. Espectros de barrido general b) 60 °C y d) 500 °C.	95
Figura 33. Espectros FTIR: a) extracto de <i>A. arvensis</i> comparadas con Cu-Aa-60 vs Cu-Aa-500 b) <i>H. rovirosae</i> vs Cu-Hr-60 vs Cu-Hr-500 y c) <i>I. jinicuil</i> vs Cu-Ij-60 vs Cu-Ij-500 .	98
Figura 34. Espectros UV-Vis de las CuO-NP sintetizadas con extractos de plantas medicinales.	99
Figura 35. Patrones de DRX de CuO-NP sintetizadas utilizando extractos de <i>A. arvensis</i> , <i>H. rovirosae</i> e <i>I. jinicuil</i> , a 60 °C (a) y a 500 °C (b).	100
Figura 36. Distribución del tamaño hidrodinámico de las CuO-NP sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).	102
Figura 37a. Micrografías FESEM de las CuO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. a) Cu-Aa-60 , b) Cu-Hr-60 y c) Cu-Ij-60 .	104
Figura 37b. Micrografías FESEM de las CuO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. d) Cu-Aa-500 , e) Cu-Hr-500 y f) Cu-Ij-500 .	105
Figura 38. Comparación del tamaño promedio de las Cu-Aa-60 , Cu-Hr-60 , Cu-Ij-60 , Cu-Aa-500 , Cu-Hr-500 y Cu-Ij-500 sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.	106
Figura 39. Espectros XPS de CuO-NP sintetizadas utilizando extractos de plantas medicinales. Espectros de alta resolución de Cu 2p a) 60 °C y c) 500 °C. Espectros de barrido general b) 60 °C y d) 500 °C.	108
Figura 40. Actividad antibacteriana de AgNP obtenidas de extractos vegetales contra a) <i>S. aureus</i> y b) <i>E. coli</i> . Control positivo: Amikacina (100 µg/mL).	110
Figura 41. Actividad antibacteriana de ZnO-NP obtenidas de extractos vegetales contra a) <i>S. aureus</i> y b) <i>E. coli</i> . Control positivo: Amikacina (100 µg/mL).	113

RESUMEN

La resistencia antibacteriana representa uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel global, debido al incremento de patógenos resistentes a antibióticos convencionales. En este contexto, la síntesis bioasistida de nanopartículas (NP) metálicas y óxidos metálicos surge como una alternativa sostenible y prometedora para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, al combinar eficiencia biológica con menor impacto ambiental.

Por ello se sintetizaron NP de base metálica: de plata (AgNP), óxido de zinc (ZnO-NP) y óxido de cobre (CuO-NP) mediante síntesis bioasistida empleando extractos acuosos de *Acalypha arvensis* Poepp. & Endl., *Hampea rovirosae* Standl. e *Inga jinicuil* Schltdl. & Cham. ex G. Don, como agentes de síntesis y estabilización. Los extractos fueron caracterizados mediante FTIR y análisis colorimétricos para la cuantificación de polifenoles, flavonoides y cloruros totales, compuestos asociados con los procesos de formación y estabilización de NP. Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales obtenidos, las NP fueron sometidas a dos condiciones: secado a 60 °C y calcinación a 500 °C.

La formación de las NP se confirmó mediante espectroscopía UV-Vis, mientras que la difracción de rayos X (DRX) mostró que el tratamiento térmico incrementó el tamaño de cristalito observado en de las AgNP ($\approx 20 - 50$ nanómetros (nm)) y favoreció la formación de fases cristalinas definidas en ZnO-NP y CuO-NP. La microscopía FESEM evidenció cambios en la morfología asociados al tratamiento térmico, y los análisis DLS y potencial zeta permitieron evaluar el tamaño hidrodinámico y la estabilidad coloidal de las suspensiones. La composición elemental y los estados químicos superficiales fueron corroborados mediante EDS y XPS.

Los rendimientos de síntesis oscilaron entre 63 % y 92 %, siendo mayores cuando se empleó extracto de *A. arvensis*. En ensayos de difusión en disco, las NP secadas a 60 °C presentaron halos de inhibición de hasta 15 mm frente a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*), mientras que el tratamiento a 500 °C influyó en su actividad antibacteriana. En microdilución, algunas muestras calcinadas de ZnO-NP y AgNP mostraron MIC entre 0.156 y 0.312 mg mL⁻¹. El análisis de correlación de Pearson reveló que la temperatura se correlaciona positivamente con el tamaño de cristalito ($r > 0.96$) y negativamente con el halo de inhibición, mientras que el contenido de flavonoides se relaciona con un mayor potencial zeta y estabilidad coloidal.

En conjunto, los resultados muestran que la composición fitoquímica de los extractos y el tratamiento térmico influyen significativamente en el rendimiento, tamaño, morfología, estabilidad coloidal y actividad antibacteriana de las NP obtenidas.

Futuras investigaciones deberán enfocarse en la optimización del diseño de las NP y en la evaluación de su uso combinado con antibióticos convencionales para potenciar su eficacia y reducir la resistencia bacteriana. Además, se recomienda el uso de técnicas avanzadas como HPLC-MS o UHPLC-QTOF para identificar los metabolitos clave involucrados en la formación y funcionalidad de las NP.

Palabras clave: Síntesis bioasistida; nanopartículas de base metálica; propiedades fisicoquímica; tratamientos térmicos; actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Antibacterial resistance represents one of the main challenges to global public health due to the increasing prevalence of pathogens resistant to conventional antibiotics. In this context, the bio-assisted synthesis of metallic and metal oxide nanoparticles (NP) has emerged as a sustainable and promising alternative for the development of new antibacterial agents, combining biological efficiency with reduced environmental impact.

Therefore, metal-based NP—silver (AgNP), zinc oxide (ZnO-NP), and copper oxide (CuO-NP)—were synthesized via bio-assisted methods using aqueous extracts of *Acalypha arvensis* Poepp. & Endl., *Hampea rovirosae* Standl., and *Inga jinicuil* Schltdl. & Cham. ex G. Don as reducing and stabilizing agents. The extracts were characterized by FTIR and colorimetric analyses to quantify polyphenols, flavonoids, and total chlorides, compounds associated with NP formation and stabilization processes. To evaluate the effect of thermal treatment on the physicochemical properties of the obtained materials, the NPs were subjected to two conditions: drying at 60 °C and calcination at 500 °C.

NP formation was confirmed by UV–Vis spectroscopy, while X-ray diffraction (XRD) analysis showed that thermal treatment increased the crystallite size in AgNP (≈ 20 –50 nanometers (nm)) and promoted the formation of well-defined crystalline phases in ZnO-NP and CuO-NP. FESEM analysis revealed morphology changes associated with thermal treatment, whereas DLS and zeta potential analyses allowed the evaluation of hydrodynamic size and colloidal stability of the

suspensions. Elemental composition and surface chemical states were corroborated by EDS and XPS.

Synthesis yields ranged from 63% to 92%, with higher values obtained when using *A. arvensis* extract. In disk diffusion assays, NPs dried at 60 °C exhibited inhibition zones of up to 15 mm against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*), while treatment at 500 °C influenced their antibacterial activity. In microdilution assays, some calcined ZnO-NP and AgNP samples showed MIC between 0.156 and 0.312 mg mL⁻¹. Pearson correlation analysis revealed that temperature was positively correlated with crystallite size ($r > 0.96$) and negatively correlated with inhibition zone diameter, whereas flavonoid content was associated with higher zeta potential and improved colloidal stability.

Overall, the results demonstrate that the phytochemical composition of the extracts and thermal treatment significantly influence the yield, size, morphology, colloidal stability, and antibacterial activity of the synthesized NP.

Future research should focus on optimizing NP design and evaluating their combined use with conventional antibiotics to enhance efficacy and mitigate bacterial resistance. Additionally, the use of advanced techniques such as HPLC-MS or UHPLC-QTOF is recommended to identify key metabolites involved in NP formation and functionality.

Keywords: Bio-assisted synthesis; metal-based nanoparticles; physicochemical properties; thermal treatments; antibacterial activity.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

En las regiones tropicales de México, existe una alta biodiversidad de plantas con usos medicinales tradicionales, entre las que se encuentran *Acalypha arvensis* Poepp. & Endl. (*A. Acalypha*), *Hampea rovirosae* Standl. (*H. rovirosae*) e *Inga jinicuil* Schltdl. & Cham. ex G. Don (*I. jinicuil*); para las cuales su actividad antiinflamatoria y antibacteriana se ha reportado contra microorganismos de interés clínico.^{1,2}

Actualmente, las especies vegetales con propiedades terapéuticas son de interés en la síntesis bioasistida de NP y óxidos metálicos, ya que se ha demostrado que los metabolitos secundarios, como los polifenoles y flavonoides presentes en estas plantas, pueden mediar la formación de estos nanomateriales;³⁻⁵ Además, estos metabolitos secundarios desempeñan un papel clave como agentes estabilizadores, influyendo en la morfología y el tamaño de las NP. Dependiendo del tratamiento aplicado, estos fitoquímicos pueden permanecer adheridos a la superficie de las partículas, lo que podría contribuir a mejorar su actividad biológica.⁶⁻⁹ Por lo que, la síntesis bioasistida de NP mediante extractos de plantas ofrece ventajas significativas frente a métodos convencionales, como son la menor toxicidad asociada al uso de reactivos químicos fuertes (p. ej. NaBH₄, hidrazina y solventes orgánicos) que generan subproductos peligrosos y residuos difíciles de manejar, así como un menor impacto ambiental.

Por otro lado, la resistencia antibacteriana representa hoy en día uno de los mayores desafíos para la salud pública a nivel mundial, ya que reduce la eficacia de los tratamientos convencionales y aumenta la mortalidad asociada a infecciones difíciles de tratar.¹⁰ Ante esta situación, se ha intensificado la búsqueda de alternativas más eficaces y sostenibles. Entre ellas, destacan las NP basadas en metales, principalmente las que se obtienen mediante síntesis bioasistida con extractos vegetales, debido a su amplio potencial de aplicación en el ámbito biomédico y en áreas relacionadas con la salud.¹¹

Considerando lo anterior, el tratamiento térmico posterior a la síntesis constituye un factor importante en control de propiedades fisicoquímicas de NP. Condiciones de secado a bajas temperaturas, como 60 °C, favorecen la conservación de compuestos orgánicos derivados de los extractos vegetales, lo que puede contribuir a una mayor estabilidad coloidal, menor tamaño hidrodinámico y mejor dispersión de las partículas.¹² En contraste, tratamientos a altas

temperaturas, como la calcinación a 500 °C, promueven el incremento de la cristalinidad, la eliminación de recubrimientos orgánicos y la formación de fases más definidas, aunque también pueden inducir el crecimiento de partícula y la agregación.^{12,13} Estas diferencias estructurales y superficiales influyen directamente en la interacción de las NP con sistemas biológicos, particularmente en su actividad antibacteriana.

Las NP metálicas y de óxidos metálicos como las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP han demostrado una destacada actividad biológica contra las bacterias mediante mecanismos como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la alteración de la integridad de la membrana celular y la interacción directa con proteínas y ácidos nucleicos.¹⁴ Estos efectos provocan estrés oxidativo, desnaturalización de biomoléculas esenciales y, en última instancia, la muerte celular.¹⁵ Gracias a estas múltiples vías de acción, estas NP han mostrado eficacia incluso frente a cepas bacterianas resistentes a antibióticos convencionales.¹⁶⁻¹⁸

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antibacteriana de AgNP, ZnO-NP y CuO-NP, obtenidas mediante un enfoque de síntesis bioasistida, utilizando extractos acuosos de tres plantas medicinales: *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*. Adicionalmente, se evaluó la influencia del contenido de polifenoles, flavonoides y cloruros, así como el efecto de la temperatura de secado, sobre el tamaño, morfología, estabilidad coloidal y propiedades antibacterianas de las NP mediante difusión en disco y microdilución. Para ello, las NP fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas, de microscopía y difracción, como espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), difracción de rayos X (DRX), dispersión dinámica de la luz (DLS), microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). Finalmente, se establecieron correlaciones estadísticas entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antibacteriana, con el fin de identificar los factores determinantes en la funcionalidad de las NP sintetizadas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades sobre metabolitos secundarios en plantas medicinales.

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos producidos por las plantas que no participan directamente en sus procesos fisiológicos básicos, pero desempeñan funciones cruciales en la defensa contra herbívoros, patógenos, y condiciones de estrés ambiental. Estos compuestos adquieren especial relevancia en las plantas medicinales, ya que muchos de ellos tienen propiedades terapéuticas y son el fundamento de los usos tradicionales y actuales en la medicina¹⁹.

Los metabolitos secundarios se dividen en tres categorías principales: alcaloides, terpenoides y polifenoles (Figura 1).

1. **Alcaloides:** Son compuestos nitrogenados derivados de aminoácidos. Tienen una gran diversidad estructural y son conocidos por sus efectos fisiológicos y farmacológicos en los humanos. Ejemplos comunes incluyen la morfina, quinina, atropina y codeína. Se ha demostrado que muchos alcaloides tienen propiedades anticancerígenas, antimicrobianas y antiinflamatorias.^{19,20}
2. **Terpenoides:** También conocidos como isoprenoides, son los metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza. Están compuestos por unidades de isopreno y juegan un papel en la defensa de la planta, así como en la atracción de polinizadores. Entre los más conocidos se incluyen el mentol, el limoneno, y el taxol, que es utilizado en quimioterapia. Además, algunos terpenoides han mostrado propiedades antivirales, antipalúdicas y antioxidantes.^{19,20}
3. **Polifenoles:** Son una amplia clase de compuestos que contienen uno o más grupos hidroxilo adjuntos a un anillo aromático. Los fenoles incluyen flavonoides, taninos y ligninas, todos ellos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Diversos estudios^{19,20} han documentado la presencia de flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos en especies pertenecientes a las familias botánicas estudiadas en este trabajo, los cuales presentan actividad antioxidante y capacidad reductora. Estos metabolitos pueden desempeñar un papel relevante en la formación y estabilización de NP durante los procesos de síntesis bioasistida.^{19,20}

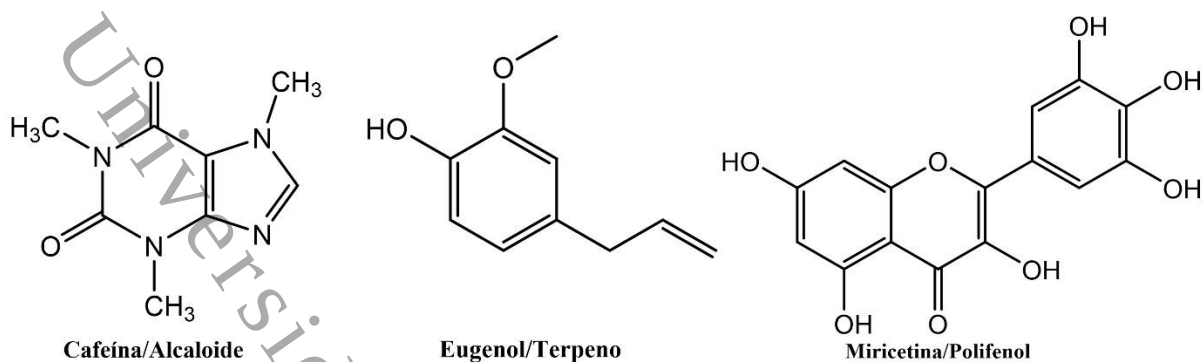


Figura 1. Ejemplos de compuestos bioactivos representativos de las tres clases principales: alcaloides (cafeína), terpenos (eugenol) y polifenoles (miricetina).

El estudio de los metabolitos secundarios ha revelado su importante rol en la medicina tradicional y moderna. Los extractos de plantas medicinales, ricos en estos compuestos, han sido empleados durante siglos para tratar diversos tipos de padecimientos.²¹ Por ejemplo, diversos metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos (incluyendo taninos y flavonoides) presentan actividad antimicrobiana. Estos compuestos han demostrado inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como de hongos y virus, lo que los convierte en candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en el contexto de la creciente resistencia microbiana.^{20,22} Además, los fenoles y polifenoles, en particular, tienen fuertes propiedades antioxidantes; estas sustancias ayudan a neutralizar los radicales libres y prevenir el daño oxidativo a las células, lo que ha sido vinculado con la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.^{19,23} Y por último, varias clases de metabolitos secundarios, especialmente los alcaloides y terpenoides, han sido objeto de investigación por su capacidad para inhibir la proliferación de células cancerígenas,²⁰ como el timol (un terpenoide), que es utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.²⁴

El interés por los metabolitos secundarios ha crecido de forma notable en farmacología y biotecnología, tanto para el descubrimiento de nuevos fármacos como para la obtención de nanomateriales con propiedades antibacterianas.⁸

1.2. Plantas medicinales con actividad antibacteriana.

Aunque se conocen una alta diversidad de plantas medicinales, para el presente trabajo se seleccionaron las plantas, *A. arvensis* (Hierba de Araña), *H. rovirosae* (Majagua) y *I. Jinicuil* (Cuijinicuil) de las cuales existen reportes de sus perfiles fitoquímicos y se ha documentado su actividad antibacteriana y antiinflamatoria (Figura 2).^{1,2,25}

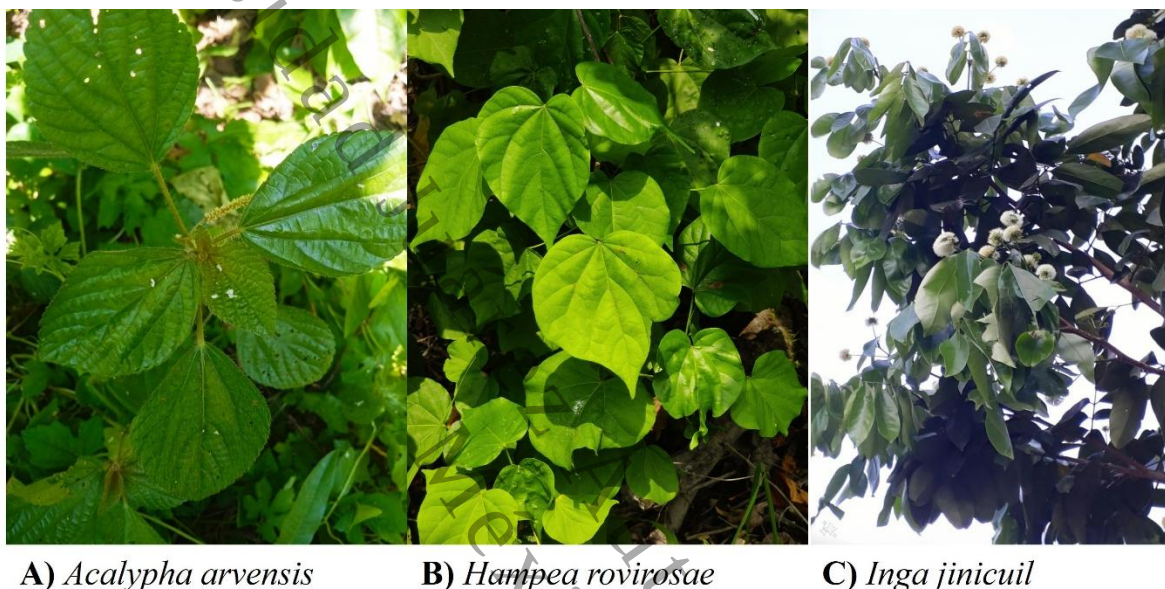


Figura 2. Plantas medicinales empleadas en el presente trabajo: *Acalypha arvensis* (Hierba de Araña) Voucher No. 036228, *Hampea rovirosae* (Majagua) Voucher No. 36665 e *Inga Jinicuil* (Cuijinicuil) Voucher No. 36576. (Imagen propia)

1.2.1. *Acalypha arvensis* (hoja de araña).

La especie *A. arvensis*, conocida como hoja de araña es una planta del sur de México que se extiende hasta Sudamérica tropical. Cuenta con una altitud máxima de 70 cm, se considera una maleza y planta de la vegetación secundaria en el trópico.² A lo largo del tiempo se le ha atribuido propiedades curativas, principalmente para el tratamiento de los piquetes de araña, utilizando los compuestos extraídos de la planta, además, en combinación de esta especie con *Aristolochia pentandra* conocido como el guaco es utilizada para la mordedura de serpiente.²⁶ En las comunidades del estado de Tabasco y en Latinoamérica, *A. arvensis* ha sido utilizada como un potente antiinflamatorio.^{2,26}

En 2022, Blé González y et. al (2022) evaluaron la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de extractos de esta planta. Para estas pruebas se trituró homogéneamente el material vegetal seco y posteriormente se obtuvieron los extractos con los siguientes disolventes: hexano, acetato de etilo, metanol y agua. La actividad biológica se determinó mediante el método dilución en placa y el método bioautográfico respectivamente, donde encontraron que el extracto metanólico presentó un 85% de actividad antiinflamatoria y además un elevado porcentaje de inhibición antibacteriana al inhibir el crecimiento de *S. aureus*.² Otro resultado importante fue el aislamiento cromatográfico a partir de las fracciones más activas del elagitanino perteneciente a la familia de los polifenoles, compuesto que fue identificado por primera vez en esta planta y al cual se atribuye la actividad antibacteriana.²

1.2.2. *Hampea rovirosae* (majagua).

H. rovirosae es una especie de tierras bajas que se encuentra en los bosques tropicales húmedos del extremo sur de Veracruz, Tabasco, el noroeste de Chiapas y el suroeste de Campeche, pero también se reporta en la región del Soconusco de la costa del Pacífico de Chiapas cerca de Puerto Madero. Específicamente, sus hojas son usadas comúnmente por la población para tratar males como: heridas, calentamiento, dolor de cabeza, papéras e inflamación.^{27,28}

El análisis de los metabolitos secundarios de las hojas de *Hampea rovirosae* fue reportado por Barredo Hernández (2023),²⁵ mediante la aplicación de técnicas cromatográficas avanzadas como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y cromatografía en capa fina (CCF), así como cuantificaciones por espectrofotometría UV-Vis, se logró caracterizar de manera detallada el perfil químico de extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad. Se identificaron diversos metabolitos secundarios, destacando terpenoides, polifenoles y flavonoides, lo cual permitió establecer una posible correlación entre este perfil químico y las propiedades antiinflamatorias y antibacterianas atribuidas tradicionalmente a la planta.

1.2.3. *Inga jinicuil* (Cuijinicuil).

La especie tropical *Inga jinicuil*, es una planta que pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae y está clasificada como un árbol de usos múltiples en las comunidades indígenas mesoamericanas.²⁹ El Cuijinicuil llega a alcanzar entre 15 y 20 m de altura, los frutos son vainas,

y sus semillas están rodeadas de un arilo carnoso, algodonoso, blanco y dulce.³⁰ Es originario de América tropical y está distribuido desde México, Guatemala y Ecuador. En el estado de Tabasco, México, es una especie propia de sombra (ornamental), es común verlo en los patios de las casas, de la planta se consume el arilo carnoso y la semilla cocida.^{29,30} De los usos más comunes de la planta está la madera como combustible o construcciones rurales y gastronómico.²⁹ Además, se ha encontrado en investigaciones realizadas propiedades antiinflamatorias y antibacterianas por parte de la planta.

Gallegos García et. al (2022)¹ describieron el perfil fitoquímico de los extractos orgánicos de la corteza y las hojas del *I. jinicuil* y evaluaron las propiedades antiinflamatorias y antibacterianas de estos extractos. El perfil de ambos órganos llevó a la identificación de 42 compuestos tales como: polifenoles, flavonoides, triterpenos, lípidos tipo prenol y ésteres alifáticos y no alifáticos, lo que proporciona a la planta propiedades antiinflamatorias moderadas y una excelente actividad biológica. En cuanto a la actividad antibacteriana, el extracto metanólico de la corteza mostró los mejores resultados, inhibiendo el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) con zonas de inhibición de hasta 18.3 ± 1.5 mm y 20.7 ± 1.2 mm, respectivamente. Y respecto a la actividad antiinflamatoria, medida mediante la inhibición del edema inducido por carragenina en oreja de ratón, el extracto etanólico de la corteza también fue el más efectivo, con una inhibición del edema de $79.3 \pm 2.1\%$, comparable al diclofenaco sódico como control positivo.

Como se demostró, las especies *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil* poseen un notable interés etnobotánico y tradicional, respaldado por estudios que evidencian sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas debido a su riqueza fitoquímica. Estas características, justifican su empleo en el presente estudio como agentes bioactivos para la obtención de NP.

1.3. Generalidades sobre síntesis de NP.

Una NP se define generalmente como una entidad con dimensiones inferiores a 100 nm, lo que le confiere propiedades físico-químicas distintivas en comparación con los materiales a granel (bulk materials). Según su composición, las NP pueden clasificarse en cuatro categorías principales: (a) a base de carbono, (b) metálicas, (c) compuestas (composites) y (d) dendriméricas.^{31,32} En esta sección nos centraremos en las NP de base metálica, de acuerdo con los objetivos del presente trabajo.

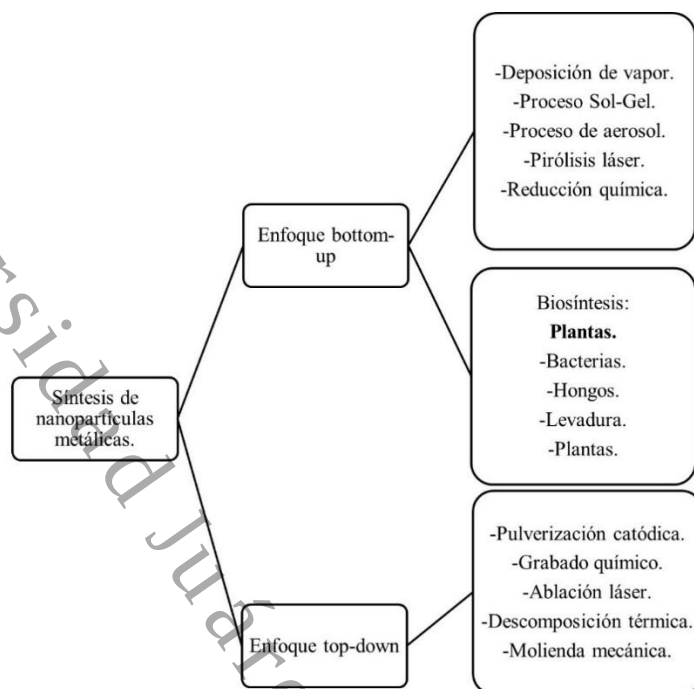


Figura 3. Principales métodos de síntesis de NP de base metálicas mediante enfoques *bottom-up* y *top-down*, incluyendo métodos físicos, químicos y biológicos. Imagen modificada de Jadoun et al, 2021.⁹

Existen tres rutas de síntesis para obtener NP de base metálicas, las cuales son: métodos químicos, métodos físicos y métodos biológicos³³. Estas a su vez se pueden dividir en dos grupos principales según el enfoque del método de síntesis (Figura 3), estos son:

- Enfoque de “abajo hacia arriba” o *bottom-up*.
- Enfoque de “arriba hacia abajo” o *top-down*.

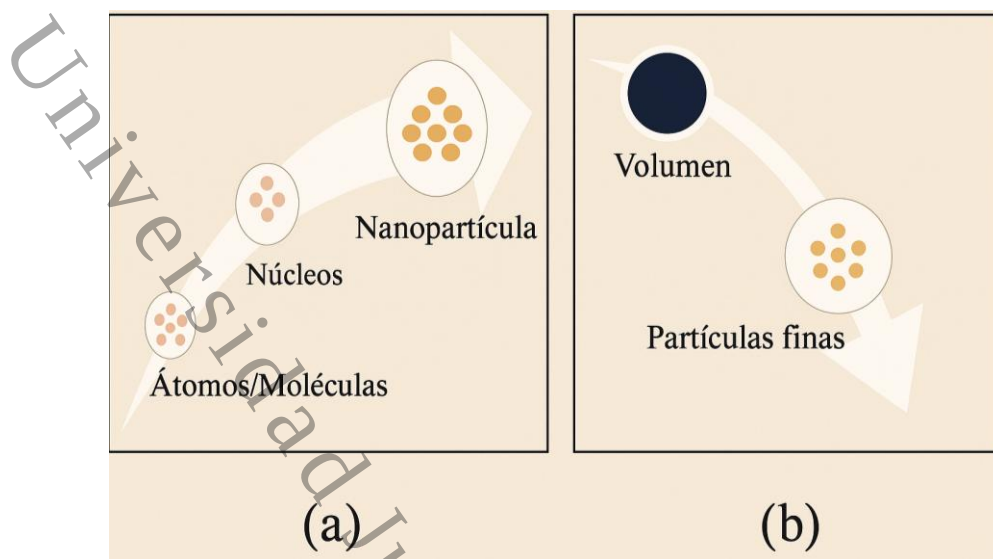


Figura 4. Esquema representativo de los enfoques *bottom-up* y *top-down* para la síntesis de NP de base metálica. Imagen tomada de Jadoun et al. (2021).⁹

El enfoque *bottom-up* se inicia a partir de átomos o moléculas, que mediante procesos de autoensamblaje de los átomos forman núcleos nuevos, que a su vez permiten después la formación de las NP de base metálicas. Por otro lado, el enfoque *top-down* parte del material a granel para luego mediante métodos litográficos reducir el tamaño del material hasta que se vuelvan partículas finas del mismo (Figura 4).⁹

Toda síntesis de NP requiere, como mínimo, a) un medio de reacción compatible con el ambiente, b) un agente que favorezca la formación del nanomaterial a partir del precursor metálico, y c) un estabilizante que evite la agregación.⁹ En este sentido, los métodos basados en extractos vegetales han cobrado gran relevancia, ya que permiten integrar simultáneamente estas tres funciones mediante compuestos naturales presentes en las plantas. A diferencia de los enfoques físico-químicos convencionales, que suelen requerir condiciones drásticas de temperatura, presión o el uso de reactivos tóxicos, la síntesis bioasistida ofrece una alternativa sustentable, económica y escalable. Por ello, en la presente investigación se optó por emplear extractos de plantas medicinales como agentes bioactivos en la síntesis de NP.³

1.3.1. Papel de los metabolitos secundarios en la síntesis bioasistida de NP.

En la síntesis bioasistida, los compuestos presentes en los extractos vegetales desempeñan un papel crucial en los procesos de formación y en la estabilización de las NP, favoreciendo su nucleación, controlando su crecimiento y confiriéndoles propiedades funcionales, como actividad antioxidante y antimicrobiana mejoradas.^{6,34} Entre los metabolitos secundarios con mayor relevancia en este proceso destacan los polifenoles y flavonoides, debido a su estructura química rica en grupos funcionales capaces de interactuar con los metales.^{35,36} Compuestos como quercetina, catequina, luteolina o hesperidina, entre otros (Tabla 1) no solo participan en la formación de las NP, sino que además potencian sus propiedades bioactivas, haciéndolas más eficaces frente a patógenos y estrés oxidativo.⁸

Estos compuestos actúan mediante un mecanismo dual: por un lado, sus grupos hidroxilo y carbonilo les permiten quelar iones metálicos, favoreciendo los procesos de nucleación y formación de nanomateriales; por otro lado, pueden adsorberse sobre la superficie de las NP, actuando como agentes de recubrimiento superficial que previenen la agregación.^{5,37}

Lo anterior se puede resumir de manera general, es decir, el mecanismo de formación de NP metálicas mediante síntesis bioasistida puede dividirse en tres fases principales, en las cuales los polifenoles y flavonoides cumplen funciones específicas.⁹ Este modelo, propuesto por Keat et al. (2015),³⁴ se explica a continuación (Figura 5):

- **Fase de activación:** Durante esta etapa inicial, los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales (como polifenoles y flavonoides) interactúan con los iones metálicos (M^{n+}). En algunos casos, estos compuestos pueden favorecer su transformación a la forma metálica neutra (M^0), generando átomos metálicos libres que posteriormente se autoensamblan mediante procesos de nucleación e inician la formación de NP. Sin embargo, dependiendo del metal precursor y de las condiciones de síntesis, esta etapa también puede conducir a la formación de óxidos metálicos, en lugar de especies metálicas elementales.
- **Fase de crecimiento:** Una vez nucleadas, las NP tienden a crecer mediante fenómenos de coalescencia, es decir, la unión de partículas adyacentes. En esta fase, los metabolitos secundarios también actúan como agentes de recubrimiento (capping agents), revistiendo

la superficie de las NP y brindándoles estabilidad estérica y electrostática, lo que evita su agregación y favorece un crecimiento controlado.

- **Fase de terminación:** Finalmente, las NP adquieren su forma, tamaño y morfología final, determinada por factores como la naturaleza de los metabolitos presentes, la concentración de los reactivos, el pH y la temperatura del sistema.

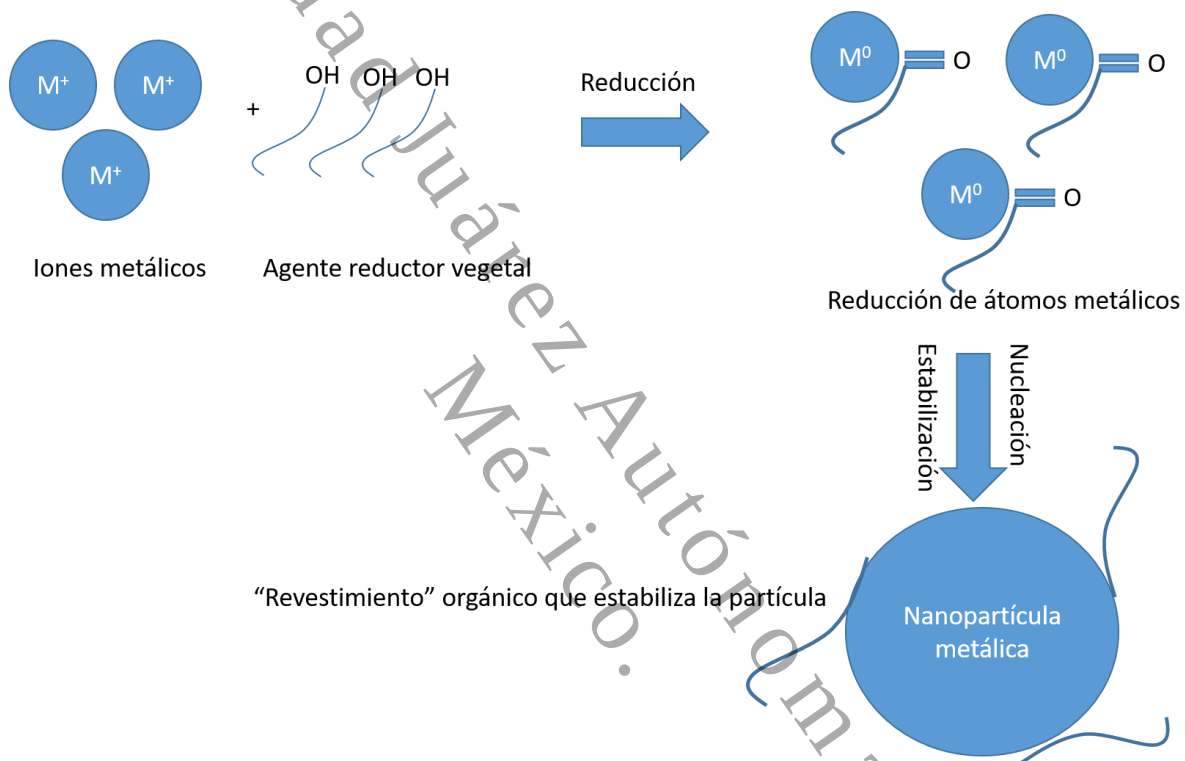


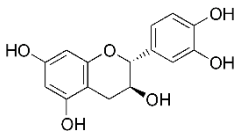
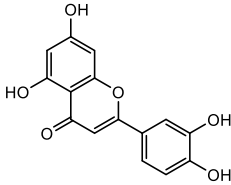
Figura 5. Proceso de síntesis de NP metálicas por reducción de iones metálicos y estabilización con agentes protectores. Esquema modificado de Keat et al. (2015).³⁴

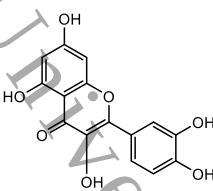
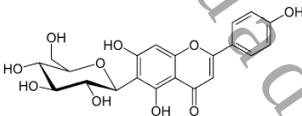
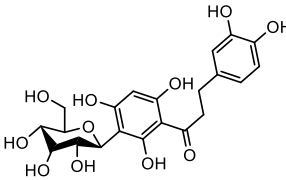
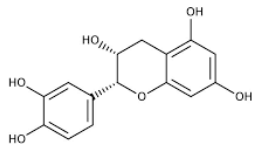
Por otra parte, la formación de NP de óxidos metálicos como de ZnO y CuO³⁸⁻⁴⁰ ocurre mediante un mecanismo de hidrólisis–condensación del precursor metálico, en el cual los iones M^{2+} reaccionan con especies hidroxilo del medio, favorecidas por el incremento del pH, para precipitar inicialmente como hidróxidos metálicos amorfos. Estos precursores intermedios experimentan posteriormente procesos de deshidratación y cristalización térmica que conducen a la formación de óxidos metálicos. Este mecanismo difiere del proceso redox característico de la síntesis de NP metálicas, donde ocurre la reducción de iones metálicos a su estado elemental. Como lo reporta

Azizi, donde propusieron un mecanismo general mediante extractos obtenidos a partir de *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad donde un polifenol como la isovitexina juega un papel crucial para la obtención de ZnO-NP.³⁸

De acuerdo con Marslin et al (2018).⁸ estos compuestos, y en particular los flavonoides (subgrupo de los polifenoles), son los metabolitos secundarios más frecuentemente reportados en la síntesis bioasistida (Tabla 1). De acuerdo con la información recopilada por los autores,⁸ los polifenoles y flavonoides constituyen aproximadamente 74 de los metabolitos reportados ($\approx 65\%$), mientras que los terpenos y alcaloides representan alrededor de 12 ($\approx 11\%$) y 9 casos ($\approx 8\%$), respectivamente. Esta marcada diferencia sugiere la relevancia de los polifenoles en los procesos de formación y estabilización de NP. Si bien los terpenos y alcaloides también pueden intervenir en estos mecanismos, la evidencia disponible destaca el papel predominante de los compuestos fenólicos, particularmente por su capacidad reductora y su afinidad por los iones metálicos. En este contexto, la cuantificación de polifenoles totales y flavonoides se considera un parámetro pertinente para evaluar el potencial reductor y estabilizante de los extractos vegetales analizados en el presente estudio.

Tabla 1. Metabolitos secundarios importantes en la síntesis de NP de base metálica.

Metabolito Secundario Flavonoide/Polifenol	Planta	NP producida	Referencia
 <u>Catequina</u>	<i>Withania somnifera.</i> (hierba mayor)	<i>Int.</i> mora AgNP	41
 <u>Luteolina.</u>	<i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca dulce)	AgNP	42

 <u>Quercetina</u>	<i>Cuscuta reflexa</i>, <i>Azadirachta indica</i> (L.)	CuNP, ZnO-NP	16,43
 <u>Isovitexina</u>	<i>Citrullus colocynthis</i>, Manzana amarga (Pepino amargo, Calabaza amarga)	ZnO-NP	38
 <u>Aspalatina</u>	<i>Aspalathus linearis</i>, rooibos (o arbusto rojo)	ZnO-NP	44
 <u>Epicatequina</u>	<i>Tamarix gallica</i>, Tamarisco (taray en español)	CuO-NP	40

1.3.2. Aspectos termodinámicos de la síntesis bioasistida de NP de base metálica.

Otro aspecto a destacar es que los polifenoles y flavonoides, además de ser los metabolitos más reportados en la síntesis bioasistida de NP, poseen potenciales de oxidación más bajos que terpenos y alcaloides, lo que les otorga una ventaja electroquímica clara y respalda la pertinencia de priorizar su cuantificación para anticipar el desempeño reductor de los extractos vegetales. En este sentido, los polifenoles (por ejemplo, la quercetina) exhiben potenciales de oxidación de 0.20–

0.60 V vs Ag/AgCl¹¹ (los cuales corresponden aproximadamente a 0.40–0.80 V vs SHE)⁴⁵. Estos valores son, en promedio, unos 300 mV más negativos que los reportados para monoterpenoides fenólicos como el timol (0.81 V vs Ag/AgCl; $\approx$ 1.01 V vs SHE);⁴⁶ y aproximadamente 1.0 V más negativos que los de alcaloides típicos como la cafeína (1.60 V vs Ag/AgCl; $\approx$ 1.80 V vs SHE)⁴⁷ su aporte electrónico resulta termodinámica y cinéticamente más favorable para la reducción de iones metálicos.

Sin embargo, es importante señalar que la viabilidad de la reducción depende de los potenciales redox de cada metal y de los metabolitos vegetales presentes en los extractos.⁴⁸ Es decir, cuando el salto de potencial (ΔE) es positivo, la transferencia electrónica ocurre de forma espontánea; cuando es negativo, los iones metálicos siguen rutas alternativas que conducen a la formación de óxidos metálicos (Tabla 2).

Tabla 2. Potenciales de reducción de Ag⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ frente al potencial de oxidación de polifenoles y su diferencia termodinámica (ΔE).

Par redox	E° / V (vs SHE)	E_{ox} polifenoles* / V (vs SHE)	ΔE / V
Ag ⁺ / Ag ⁰	+0.80	+0.64 – 0.68	+0.16 $\pm$ 0.02
Cu ²⁺ / Cu ⁰	+0.34	+0.64 – 0.68	–0.30 $\pm$ 0.02
Zn ²⁺ / Zn ⁰	–0.76	+0.64 – 0.68	–1.40 $\pm$ 0.02

*Valores medidos frente a Ag/AgCl (+0.44 – 0.48 V) y convertidos a la escala SHE añadiendo +0.197 V.

En este contexto, los polifenoles presentan potenciales de oxidación en el intervalo aproximado de 0.40–0.80 V vs SHE⁴¹, aunque bajo condiciones experimentales específicas se han reportado valores más acotados en torno a +0.64–0.68 V vs SHE⁴⁹ En consecuencia, estos compuestos pueden ceder electrones a Ag⁺ ($E^\circ = +0.80$ V)⁵⁰ y promover la formación de Ag⁰, mientras que su fuerza reductora resulta insuficiente para desplazar el equilibrio de Cu²⁺ (+0.34 V)⁵⁰ o Zn²⁺ (–0.76 V)⁵⁰ hacia los estados metálicos, favoreciendo en estos casos la precipitación de óxidos.³⁸ En estos casos, la presencia de metabolitos como polifenoles no solo actúa como agente reductor, sino también como modulador del pH y agente complejante, favoreciendo la generación de condiciones ligeramente alcalinas en el medio. Esto promueve la formación de hidróxidos metálicos, como

Zn(OH)_2 , los cuales posteriormente pueden deshidratarse y transformarse en óxidos metálicos (ZnO).³⁸

Por tanto, estos aspectos termodinámicos no solo anticipan el tipo de productos formados durante la síntesis, sino también es posible optimizar las condiciones experimentales (pH, temperatura, concentración de extracto) y seleccionar el tipo de metal o sal precursora de acuerdo con el potencial reductor de los metabolitos presentes.

1.3.3. Cloruros presentes en el medio de reacción y su rol en la síntesis bioasistida.

Otro aspecto a considerar es el cloruro presente en el medio de reacción, lo que resulta relevante, ya que la presencia de iones cloruro puede modificar profundamente la ruta de formación y las propiedades finales de los nanomateriales obtenidos por síntesis bioasistida; sin embargo, la magnitud del efecto depende del metal implicado y de la cantidad efectiva de Cl^- en el medio.

Por ejemplo, en la síntesis de AgNP con extracto de *Oedera genistifolia*,⁵¹ el análisis mediante EDX y XRD confirmó un contenido de Cl de aproximadamente 9.5 % en las partículas y evidenció que la fase inicial formada corresponde a AgCl. Esta formación se atribuye a la reacción entre los iones Ag^+ provenientes del AgNO_3 y especies cloruro presentes en el extracto vegetal. Hallazgos similares han sido reportados en sistemas que emplean extractos de *Chara vulgaris* y otras algas, donde la presencia de Cl^- en el medio conduce a la obtención de materiales Ag/AgCl sin necesidad de añadir sales cloruradas externas.⁵²

Inclusive, se ha reportado que en la síntesis de ZnO, el cloruro puede incorporarse como dopante o adsorberse en facetas específicas: al aumentar su concentración (5–20 %), el tamaño cristalino disminuye, el band-gap baja de 3.42 a 2.59 eV y la degradación fotocatalítica de azul de metileno se acelera.⁵³ En el caso de CuO comparaciones entre precursores muestran que partir de CuCl_2 (y, por tanto, un medio rico en Cl^-) produce partículas más finas y catalíticamente activas que las obtenidas desde $\text{Cu(NO}_3)_2$, debido a la formación intermedia de CuCl que regula la nucleación.⁵⁴

Este tipo de consideraciones sobre la influencia del precursor químico y del medio de reacción en la morfología y propiedades de las NP son igualmente relevantes en la síntesis bioasistida. En este caso, aunque la fuente metálica sigue siendo un factor determinante, la presencia de metabolitos propios de los extractos vegetales introduce mecanismos adicionales de control sobre la nucleación, el crecimiento y la estabilización de las partículas.

1.3.4. Síntesis bioasistida de NP mediante extractos de plantas.

Se puede establecer una metodología general para la síntesis de NP metálicas mediante el uso de extractos vegetales, la cual suele involucrar las siguientes etapas fundamentales ^{6,8} (Figura 6):

1. **Preparación del extracto vegetal:** Se selecciona la parte vegetal de interés (hojas, frutos, flores, raíces o tallos), la cual se lava con agua corriente y posteriormente se enjuaga con agua destilada para su esterilización. Luego, se deja secar a temperatura ambiente, se pesa y se tritura finamente. A partir de este material procesado se obtiene el extracto vegetal, generalmente mediante maceración o infusión, seguido de filtración para obtener un extracto clarificado.
2. **Preparación de la solución precursora metálica:** Se prepara una solución acuosa del precursor metálico (por ejemplo: AgNO_3 , ZnSO_4 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, etc.), cuya naturaleza dependerá del tipo de NP que se desea obtener.
3. **Mezcla de los reactivos:** El extracto vegetal se mezcla con la solución del precursor metálico en proporciones definidas, generalmente bajo agitación constante o sonicación. Durante esta etapa, se controlan variables críticas como el pH de la mezcla, la temperatura de reacción, el tiempo de agitación y la relación volumétrica entre el extracto y la solución metálica, ya que estos parámetros influyen directamente en los procesos de nucleación y crecimiento del nanomaterial, así como en las propiedades fisicoquímicas de las NP obtenidas.
4. **Monitoreo de la formación de NP:** El cambio de color de la solución se considera un indicador visual preliminar de la formación de NP. Para su confirmación, se realiza un análisis espectroscópico UV-Vis, en el cual se observa la aparición de bandas de absorción características asociadas a la formación de los nanomateriales; en el caso de las NP metálicas, estas bandas corresponden a resonancia de plasmones de superficie localizada (LSPR), un tipo de resonancia de plasmones de superficie (SPR) mientras que para los óxidos metálicos es una banda de absorción asociadas a transiciones electrónicas propias del material.
5. **Separación y recuperación de las NP:** Finalmente, las NP formadas se separan mediante centrifugación o filtración, y pueden ser lavadas con agua destilada o etanol para eliminar impurezas antes del secado o posterior caracterización.



Figura 6. Esquema general del proceso de síntesis bioasistida de NP de base metálica utilizando extractos de plantas medicinales. La figura muestra las etapas clave en la síntesis bioasistida de NP. Imagen propia.

Diversos estudios han documentado la síntesis bioasistida de AgNP, ZnO-NP y CuO-NP empleando extractos vegetales, y explorando cómo el material vegetal influye en la morfología, tamaño, estabilidad coloidal y propiedades antimicrobianas. A continuación, se presentan algunos casos representativos que evidencian la versatilidad de este enfoque.

Banerjee et al (2014).⁵⁵ emplearon extractos acuosos de hojas frescas de *Musa balbisiana*, *Azadirachta indica* y *Ocimum tenuiflorum* para reducir AgNO_3 a 1 mM mediante irradiación por microondas. Los extractos, ricos en flavonoides y terpenoides, originaron AgNP con morfología dependiente de la planta utilizada: esféricas (banana), triangulares (neem) y cuboidales (tulsi), con tamaños de hasta 200 nm. Las partículas mantuvieron estabilidad coloidal por hasta 4 semanas y mostraron alta actividad antibacteriana contra *Bacillus* sp. y *E. coli*, destacando las obtenidas con banana (~80 nm) por su mayor eficacia.

Por otro lado, Selvaraj et al (2019).⁵⁶ sintetizaron AgNP utilizando extractos acuosos de hojas de *Alternanthera sessilis* (ASL) y raíces de orégano (OR). Los picos UV-Vis (433 y 425 nm) y los patrones DRX confirmaron la formación de partículas con estructura cúbica centrada en las caras (ccc) y tamaños cristalinos de 19 nm (ASL) y 10 nm (OR). En SEM, se observó morfología esférica y lisa, mientras que por FTIR se identificó grupos funcionales atribuidos a compuestos como polifenoles, terpenos y aminas como responsables de la reducción y estabilización. Las pruebas

antimicrobianas indicaron que las AgNP de ASL fueron más efectivas contra *S. aureus*, y las de OR contra *P. aeruginosa*.

Khanal et al. (2022)⁵⁷ desarrollaron un método de síntesis bioasistida de AgNP empleando extracto acuoso de raíces de *Rubus ellipticus*. La caracterización por espectroscopía UV–Vis mostró un pico de SPR en el rango de 416–420 nm, mientras que las imágenes TEM revelaron una morfología predominantemente esférica con tamaños entre 13.85 y 34.30 nm. Las AgNP sintetizadas presentaron una destacada actividad antibacteriana, con altas zonas de inhibición frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, lo que sugiere un amplio espectro de acción y potencial para aplicaciones antimicrobianas.

Respecto a la síntesis bioasistida de ZnO-NP, Bala et al. (2015)⁵⁸ reportaron la síntesis bioasistida de ZnO-NP utilizando extracto acuoso de hojas de *Hibiscus sabdariffa*. El análisis UV–Vis mostró una banda de absorción característica alrededor de 377 nm. Las imágenes de HRTEM evidenciaron que las muestras secadas a 60 °C (PZN60) presentaron partículas esféricas y en ocasiones agregadas, con tamaños de 12–46 nm, mientras que a 100 °C (PZN100) exhibieron una morfología tipo “mancuerna” de 200–230 nm de largo y 30–60 nm de ancho. En las pruebas antibacterianas contra *E. coli* y *S. aureus*, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y bactericidas (MBC) para ambas muestras. En el caso de PZN60, los valores de MIC fueron aproximadamente 25 µg mL⁻¹ para *E. coli* y 50 µg mL⁻¹ para *S. aureus*, mientras que los valores de MBC fueron de 50 µg mL⁻¹ y 100 µg mL⁻¹, respectivamente, observándose diferencias de eficacia entre PZN60 y PZN100, lo que evidencia que la morfología y el tamaño de las ZnO-NP influyen de manera significativa en su desempeño antimicrobiano.

Selim et al. (2020)⁵⁹ sintetizaron ZnO-NP mediante un método bioasistido utilizando extracto acuoso de *Deverra tortuosa*. La caracterización por espectroscopía UV–Vis mostró una banda de absorción en 374 nm, mientras que el análisis de DRX confirmó una estructura cristalina tipo wurtzita. Las imágenes TEM revelaron una morfología predominantemente esférica con tamaños que oscilaron entre 9.26 y 31.18 nm, con un promedio aproximado de 15.22 nm. Aunque el estudio no incluyó pruebas antibacterianas, se evaluó la citotoxicidad de las ZnO-NP sobre líneas celulares humanas como Caco-2, A549 y WI38, lo que permitió explorar su potencial para aplicaciones biomédicas distintas al control microbiano.

López González et al. (2024)⁶⁰ obtuvieron ZnO-NP mediante síntesis bioasistida utilizando extracto acuoso de *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua). Las imágenes FESEM mostraron NP en forma de hojuelas triangulares con tamaños entre 80 y 300 nm. El análisis por DLS reveló tamaños hidrodinámicos de 202, 244 y 313 nm para las diferentes muestras, con valores de índice de polidispersidad (PDI) de 0.214, 0.146 y 0.249, respectivamente, y potencial zeta de -21.3, -25.9 y -22.1 mV, lo que indica una buena estabilidad coloidal. En las pruebas antibacterianas mediante microdilución, las ZnO-NP presentaron MIC de 0.08 mg/mL frente a *S. aureus* y *E. coli*, salvo la muestra ZnOE25 en *E. coli*, que requirió 0.165 mg/mL. La MBC fue de 1.25 mg/mL contra *S. aureus* y 2.5 mg/mL contra *E. coli* para ZnOE25. Se determinó que esta muestra tuvo acción bactericida, mientras que el ZnO comercial mostró un efecto bacteriostático, destacando así la eficacia antimicrobiana mejorada del material bioasistido.

Finalmente, con respecto a CuO-NP, Rajeshwari Sivaraj et al. (2014)⁶¹ sintetizaron CuO-NP mediante un enfoque verde usando extracto acuoso de hojas de *Tabernaemontana divaricata* al 50 % p/v. La caracterización por UV-Vis mostró una banda de absorción en la región UV (220–225 nm); el análisis por DRX reveló estructura monoclinica y un tamaño cristalino promedio de 46 ± 4 nm, confirmado por TEM y SEM, donde las partículas aparecieron bien dispersas, esféricas y cristalinas. FTIR indicó la presencia de grupos funcionales como alcoholes, fenoles, aminas y amidas, asociados a biomoléculas de la planta. El análisis EDX confirmó la composición de CuO. La evaluación antibacteriana por difusión en pozo mostró que *E. coli* presentó una zona de inhibición de 17 ± 1 mm a 25 µg/mL, superando al control positivo (tetraciclina, 7 ± 0.56 mm), evidenciando una notable actividad antimicrobiana y su potencialidad como agente antibacteriano eco amigable.

Melkamu et. al (2022)⁶² sintetizaron CuO-NP mediante un enfoque bioasistido utilizando extracto acuoso de *Justicia schimperiana*. La síntesis se realizó mezclando el extracto con una solución de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y hacia condiciones alcalinas (pH 8-10) con NaOH para favorecer la formación de las NP. La formación de CuO-NP se confirmó mediante espectroscopía UV-Vis, mostrando una banda de absorción en 282 nm. El análisis por DRX confirmó la fase monoclinica del CuO, con un tamaño de cristalito promedio de 17.2 nm. Las imágenes SEM y TEM mostraron una morfología cuasiesférica, con tamaños de partícula en el rango de 3 a 85 nm. El análisis por FTIR identificó grupos funcionales como -OH (fenoles), C=O y C-O, presentes en el extracto de *J.*

schimperiana. Las pruebas antibacterianas realizadas, evidenciaron actividad contra *S. aureus* y *E. coli*, con zonas de inhibición de 14.5 mm y 11.5 mm, respectivamente (a 100 mg/mL). El efecto antimicrobiano fue atribuido a la liberación de iones Cu^{2+} y a la generación de ROS, las cuales provocan daños irreversibles en las membranas y estructuras celulares de los patógenos.

Bhavika Turakhia et al.(2020)⁶³ llevaron a cabo la síntesis bioasistida de CuO-NP empleando extracto acuoso de hojas de *Carica papaya*. Las hojas frescas se lavaron, molieron y filtraron para preparar el extracto, el cual se mezcló con una solución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y se calentó bajo agitación hasta la formación de un precipitado negro, posteriormente calcinado a 400 °C durante 2 h. La caracterización por UV-Vis mostró una banda de absorción a 270 nm, mientras que el análisis por DRX confirmó una estructura monoclinica con tamaño cristalino promedio de 28 nm. Las imágenes SEM y TEM revelaron partículas de morfología esférica con tamaños en el rango de 20–35 nm. El análisis FTIR evidenció la presencia de grupos funcionales atribuidos a compuestos fenólicos y flavonoides, responsables de la estabilización de las CuO-NP. En cuanto a la actividad biológica, las NP mostraron una notable eficacia antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*, con zonas de inhibición superiores a las de los controles, igualmente atribuida a la liberación de iones Cu^{2+} y a la generación de ROS que provocan daño en la membrana celular bacteriana.

En conjunto, estos estudios evidencian que la elección del material vegetal y sus metabolitos secundarios influye de manera decisiva en la morfología, tamaño, estabilidad y actividad antibacteriana de las NP, resaltando el potencial de la síntesis bioasistida como una estrategia versátil, económica y ambientalmente amigable.

1.3.5. Tratamiento térmico

Por otro lado, el tratamiento térmico también constituye un factor crítico en la síntesis de NP, ya que influye directamente en sus propiedades estructurales, morfológicas y superficiales. En sistemas de síntesis asistida por extractos vegetales, la temperatura determina tanto la estabilidad de los compuestos orgánicos presentes como la evolución de las fases cristalinas del material.^{12,64,65}

En este contexto, las temperaturas bajas corresponden a etapas de secado o tratamiento térmico entre 60–100 °C. Bajo estas condiciones, el proceso se limita principalmente a la eliminación de solventes y a la estabilización de las NP formadas.^{66,67} A estas temperaturas, se preserva una fracción significativa de compuestos orgánicos provenientes del extracto vegetal, como se

mencionó en apartados anteriores.⁶⁸ Esta capa orgánica favorece la dispersión coloidal, reduce la agregación y puede mejorar la interacción de las NP con sistemas biológicos. No obstante, estas condiciones térmicas restringen el desarrollo de una estructura cristalina altamente ordenada, lo que se traduce en menor cristalinidad y posible presencia de fases intermedias o precursores.^{64,66,68}

Por otro lado, la calcinación se refiere a un tratamiento térmico aplicado generalmente a temperaturas en el rango de 400–800 °C, con el objetivo de inducir transformaciones fisicoquímicas en el material.^{65,69} En este estudio, la temperatura de 500 °C se considera dentro del rango de calcinación. Durante este proceso, los compuestos orgánicos residuales son eliminados mediante descomposición térmica, dando lugar a superficies con menor contenido de especies orgánicas adsorbidas y a una mayor pureza del material.^{70,71} Asimismo, el incremento de temperatura favorece la reorganización atómica y el crecimiento de dominios cristalinos, promoviendo la formación de fases estables.^{64,72} Este proceso conlleva generalmente un aumento en el tamaño de cristalito y una disminución en la dispersidad.⁷³

Por tanto, la selección de condiciones térmicas responde a un equilibrio entre la preservación de componentes orgánicos funcionales y el desarrollo de propiedades cristalinas del material. Es decir, que tratamientos térmicos suaves favorecen la estabilidad coloidal y la funcionalización superficial, la calcinación mejora la cristalinidad y la pureza estructural, modificando de manera significativa las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las NP. En consecuencia, el efecto del tratamiento térmico debe entenderse como un proceso fenómeno de interdependencia, dependiente tanto de la temperatura como de la naturaleza del metal y de la composición del extracto vegetal empleado.

1.4. Caracterización de NP.

La caracterización de NP es un paso fundamental para comprender sus propiedades fisicoquímicas, estructurales y superficiales, ya que estas determinan en gran medida su comportamiento y desempeño en aplicaciones específicas. Mediante el uso combinado de técnicas analíticas es posible determinar su naturaleza: la espectroscopía UV-Vis permite monitorear su formación y estimación indirecta sobre su tamaño y dispersión óptica; la espectroscopía FTIR identifica los grupos funcionales presentes en su superficie; la DRX revela la fase cristalina y el tamaño de cristalito; el análisis de DLS determina el tamaño hidrodinámico y la distribución de tamaños; la medición del potencial zeta evalúa la estabilidad coloidal; la FESEM permite observar su morfología y tamaño con alta resolución; y el EDS y XPS proporcionan información detallada sobre la composición elemental y los estados químicos superficiales.

1.4.1. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis).

La espectroscopía UV-Vis es una técnica analítica ampliamente utilizada para estudiar las propiedades ópticas de diversos materiales, incluidas las NP metálicas y de óxidos metálicos (Figura 7). Esta técnica mide la absorción de luz en el rango ultravioleta-visible (200-800 nm) por una muestra, correlacionando la posición/intensidad de las bandas con el tamaño, la forma y el entorno de las NP.⁷⁴

Por ejemplo, las AgNP exhiben una característica distintiva en sus espectros UV-Vis asociada al fenómeno LSPR. Este fenómeno ocurre cuando los electrones libres en la superficie de las NP oscilan colectivamente en resonancia con la luz incidente. La LSPR para AgNP típicamente se manifiesta como una banda de absorción aguda en el rango de 380-450 nm.⁷⁵ La posición exacta y la intensidad de esta banda pueden variar dependiendo del tamaño, forma, estado de agregación y entorno dieléctrico de las NP. Es decir, a medida que el tamaño aumenta, la banda de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más largas (rojo).⁷⁶ Además, las NP esféricas tienden a tener una única banda LSPR, mientras que formas anisotrópicas (como barras o prismas) pueden mostrar múltiples bandas.⁷⁷

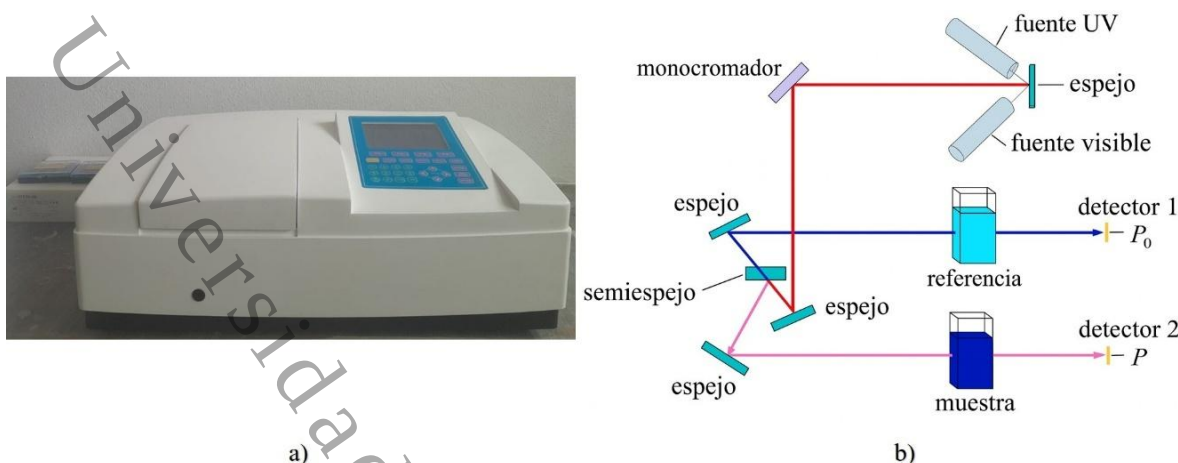


Figura 7. a) Espectrofotómetro modelo VE-8000A (VELAB, México), utilizado para mediciones en el rango ultravioleta-visible. b) Esquema de los componentes básicos de la técnica de espectrofotometría UV-Vis de doble haz, mostrando la trayectoria de la luz desde las fuentes UV y visible, el monocromador, los espejos y semiespejos, las cubetas de referencia y muestra, y los detectores correspondientes. Imagen **b)** tomada de Álvarez Macías, 2013.⁷⁸

A diferencia de las NP metálicas puras, las ZnO-NP, que son semiconductoras, no exhiben LSPR, sino que muestran una fuerte absorción en la región UV del espectro (generalmente alrededor de 360 nm).⁷⁹ Esta absorción está relacionada con la brecha de energía del material (band gap), que es la energía necesaria para excitar un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción. Al igual que en los otros casos, la posición de la banda de absorción puede cambiar con el tamaño de las partículas debido al efecto de confinamiento cuántico. A medida que disminuye el tamaño de las NP de ZnO, la banda de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más cortas (azul) y la presencia de defectos o el dopaje con otros elementos pueden introducir características adicionales en el espectro, como picos de absorción adicionales o un cambio en la banda de absorción principal.

En el caso del CuO-NP, se espera observar una banda de absorción característica asociada a las transiciones electrónicas del Cu^{2+} .⁸⁰ Generalmente, estas NP presentan un pico en el rango de 250–350 nm, atribuido a las transiciones de carga del metal y los estados de valencia-conducción. El tamaño de las NP influye en la posición de la banda de absorción: partículas menores a 10 nm pueden experimentar un desplazamiento hacia el azul debido al efecto de

confinamiento cuántico,⁸¹ mientras que partículas más grandes pueden presentar un corrimiento hacia el rojo. Sin embargo, en el caso de la síntesis bioasistida es posible que compuestos orgánicos residuales generen bandas adicionales en la región ultravioleta (200–280 nm), lo que puede superponerse con las señales del CuO y afectar la interpretación del espectro.⁸²

1.4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La FTIR es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de materiales orgánicos e inorgánicos, permitiendo la identificación de grupos funcionales en moléculas (Figura 8).^{83,84} Su principio de funcionamiento se basa en la absorción de radiación infrarroja por los enlaces químicos de una muestra, lo que provoca vibraciones moleculares específicas que pueden analizarse para identificar la presencia de determinados grupos funcionales y compuestos.⁸⁵

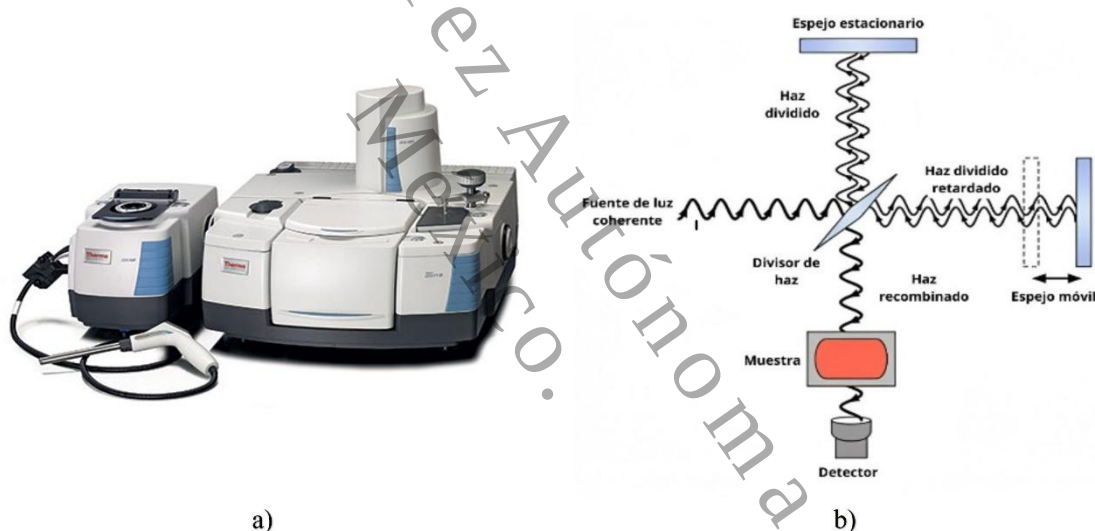


Figura 8. a) Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier marca *Nicolet iS50* (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.); b) Esquema de los componentes principales de un FTIR, incluyendo fuente de luz coherente, divisor de haz, espejos (estacionario y móvil), muestra y detector. Imagen **b)** Modificada de Pam-Xiamen, 2018.⁸⁶

Cuando una muestra es irradiada con radiación infrarroja en un rango de aproximadamente 10,000 a 100 cm^{-1} , parte de esta radiación es absorbida por los enlaces químicos presentes en la muestra, mientras que otra parte atraviesa el material sin interacción significativa. La absorción se traduce en la excitación de modos vibracionales característicos, los cuales

dependen de la naturaleza de los enlaces químicos y de la estructura molecular del material. Estas interacciones se registran en un espectro infrarrojo, generalmente en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} , el cual constituye una huella molecular única para cada sustancia.⁸⁷

Un espectrómetro FTIR está compuesto por varios elementos clave, incluyendo una fuente de radiación infrarroja, un interferómetro de Michelson, una celda de muestra, un detector, un amplificador, un convertidor analógico-digital (A/D) y un sistema computacional para el procesamiento de datos. La radiación proveniente de la fuente atraviesa el interferómetro, donde se modula antes de incidir sobre la muestra. Posteriormente, el detector capta la señal resultante, que es amplificada y convertida en datos digitales. Finalmente, mediante la aplicación de la transformada de Fourier, se obtiene el espectro final, representado en función del número de onda (cm^{-1}).^{83,88}

El análisis FTIR no solo permite analizar materiales desconocidos y detectar impurezas o contaminantes, sino que también es fundamental en la caracterización de procesos de oxidación, degradación y funcionalización superficial. Alteraciones en los patrones de absorción pueden indicar cambios en la composición química de un material, permitiendo evaluar la estabilidad a lo largo del tiempo y bajo distintas condiciones ambientales.⁸⁴

1.4.3. Difracción de rayos X (DRX).

La DRX es una técnica analítica fundamental para el estudio de materiales cristalinos (Figura 9).⁸⁹ Se basa en la interacción de un haz de rayos X con la disposición periódica de los átomos, generando un patrón de difracción característico. Cuando la radiación incide sobre un cristal, los átomos dispersan el haz en distintas direcciones y, bajo ángulos específicos, se produce interferencia constructiva, lo que permite obtener información sobre el espaciado interplanar, el tamaño de cristalito, las fases presentes y posibles deformaciones en la red (Figura 9a y b). El fenómeno de difracción sigue la ley de Bragg, que establece que la condición para que se produzca una interferencia constructiva está dada por la ecuación (Ecuación 1).⁸⁹

$$\text{Sen } \theta = \frac{\lambda}{2d_{hkl}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde θ es el ángulo entre el haz incidente y el haz difractado, λ es la longitud de onda del haz de rayos X y d_{hkl} es el espaciado interplanar del sistema cristalino. Cuando un material en forma de polvo es analizado por DRX, las partículas de polvo contienen múltiples orientaciones cristalográficas, lo que permite la detección de los ángulos θ que cumplen con la ley de Bragg. En un difractómetro, un detector registra los ángulos 2θ en los que se produce la difracción, generando un patrón característico de la estructura del material (Figura 9c).⁹⁰

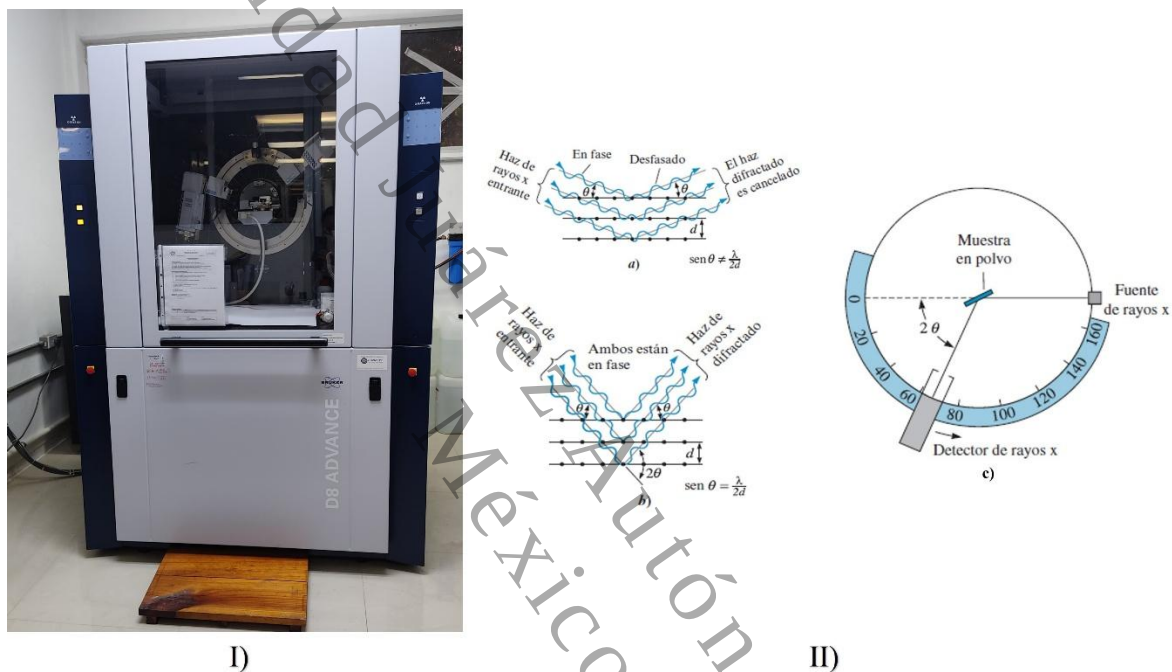


Figura 9. I) Difractómetro D8 Advance (Bruker, MA, USA) con radiación Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). II) a) Interferencias destructivas, b) interferencias constructivas entre los rayos X y la estructura cristalina. El refuerzo de la señal ocurre en los ángulos que cumplen con la ley de Bragg. c) Diagrama de un difractómetro, que presenta la muestra en polvo y los haces incidentes y difractados. Imagen II) adaptada de Askeland, 2017.⁹¹

En los análisis convencionales, los rayos X se generan mediante el bombardeo de un blanco metálico con electrones de alta energía. Para estudios estructurales se emplea comúnmente radiación Cu-K α ($\lambda \approx 1.5406 \text{ \AA}$), adecuada para evaluar con precisión parámetros cristalográficos.^{89,90}

En muestras en polvo, la presencia de múltiples orientaciones cristalográficas permite registrar los ángulos 2θ que satisfacen esta condición, generando un patrón característico del material (Figura 9c).⁹⁰

La DRX permite identificar las fases presentes mediante la comparación de los picos experimentales con patrones de referencia (por ejemplo, bases de datos como el Powder Diffraction File, PDF).⁹²

También el tamaño de cristalito de los materiales, que es una medida de las dimensiones de las regiones coherentemente difractantes, se puede estimar a partir del ensanchamiento de los picos en el patrón de difracción utilizando la ecuación de Scherrer (Ecuación 2).⁹³

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde D es el tamaño de cristalito en nm, k es la constante de Scherrer, β es el ancho total a la mitad del máximo de intensidad (FWHM, en radianes), λ representa la longitud de onda de la radiación utilizada y θ es el ángulo de difracción de Bragg (en radianes).

Otros aspectos importantes a destacar son que la DRX puede determinar si el material a estudiar tiene un tamaño nanométrico pequeño al observar un ensanchamiento en los picos de difracción. Un mayor ensanchamiento indica partículas más pequeñas.^{90,93}

1.4.4. Dispersión de luz dinámica (DLS).

La DLS (Dynamic Light Scattering) es una técnica para determinar el tamaño de partículas en suspensión a partir de la variación de la luz dispersada en función del tiempo.⁹⁴ Su principio se basa en la interacción de un haz láser con la muestra, lo que genera fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada debido al movimiento Browniano de las partículas.⁹⁵ Dicho movimiento, resultado de las colisiones con las moléculas del medio dispersante, es más rápido en partículas pequeñas y más lento en partículas grandes.⁹⁵

A partir de estas fluctuaciones, se calcula el coeficiente de difusión traslacional, el cual está inversamente relacionado con el tamaño de las partículas.⁹⁶ Utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, es posible determinar el tamaño hidrodinámico (En este estudio, el término tamaño se refiere al diámetro hidrodinámico obtenido mediante DLS), que representa el tamaño de la partícula junto con cualquier capa de solvente o moléculas adsorbidas que la rodeen. Este

parámetro es fundamental en la caracterización de sistemas coloidales, ya que permite evaluar su estabilidad y comportamiento en diferentes condiciones (Ecuación 3).⁹⁶

$$R_H = \frac{KT}{6\pi\eta D} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde D es el coeficiente de difusión, K la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad y R_H radio hidrodinámico. En este trabajo, el término “tamaño hidrodinámico” se utilizará para referirse al diámetro hidrodinámico ($d_H = 2R_H$)

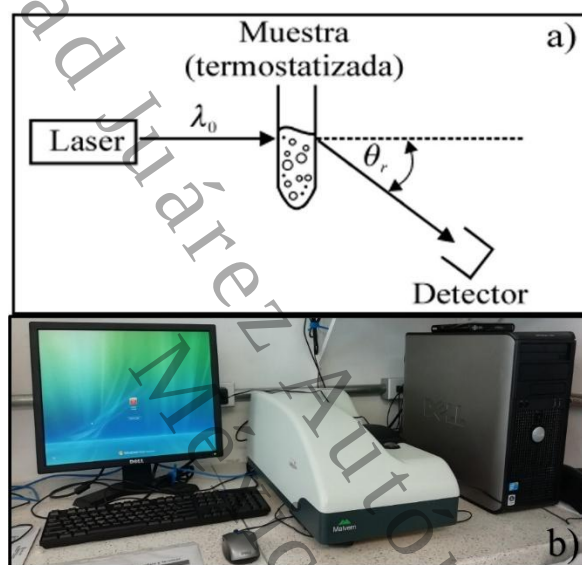


Figura 10. a) Esquema básico del principio de funcionamiento de la técnica DLS, mostrando la interacción de un haz láser con la muestra termostatizada y la detección de la luz dispersada a un ángulo θ . b) Equipo de DLS modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) utilizado para la caracterización de NP. Imagen a) adaptada de Bruce J. et al, 2000.⁹⁵

Los resultados obtenidos mediante DLS incluyen el tamaño hidrodinámico de las partículas, la distribución de tamaños (PSD) y PDI.⁹⁷ La PSD puede expresarse en función de la intensidad, volumen o número de partículas, ofreciendo distintas perspectivas sobre la homogeneidad de la muestra. Por su parte, el PDI es un indicador de la dispersión de tamaños; un valor cercano a 0.1 sugiere una muestra monodispersa, mientras que valores superiores a 0.4 indican una distribución amplia de tamaños y la posible presencia de agregados.⁹⁸

Entre sus ventajas, DLS destaca por ser un método rápido, no invasivo y altamente sensible, capaz de analizar una gran cantidad de partículas en cuestión de minutos sin necesidad de estándares de calibración.⁹⁹ No obstante, su precisión puede verse afectada en muestras polidispersas o en presencia de impurezas, lo que hace recomendable realizar mediciones a múltiples ángulos para mejorar la interpretación de los datos.⁹⁹

En conjunto, la DLS permite obtener una estimación confiable del diámetro hidrodinámico y del grado de dispersión de las partículas en suspensión, aportando información complementaria sobre su comportamiento coloidal en medios líquidos.

1.4.5. Potencial zeta.

El potencial zeta es un parámetro fundamental en la caracterización de NP en suspensión, ya que proporciona información clave sobre su estabilidad coloidal y sus interacciones superficiales en un medio líquido. Este potencial eléctrico se genera en la interfaz entre la superficie de la NP y el medio circundante, específicamente en la capa de deslizamiento, donde las moléculas del solvente comienzan a moverse junto con la partícula en presencia de un campo eléctrico (Figura 11).¹⁰⁰

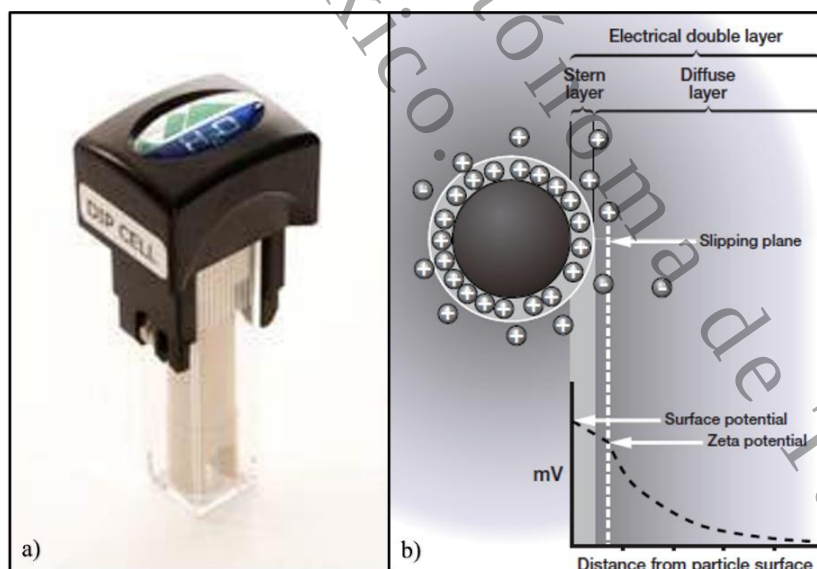


Figura 11. a) Electrodo ZEN1002-Zeta Dip Cell utilizado para la determinación del potencial zeta de las NP en suspensiones coloidales. b) Representación esquemática de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula y la definición del plano de deslizamiento, potencial superficial y potencial zeta. Imagen b) tomada de Malvern Instruments, 2013.¹⁰¹

Cuando una NP se encuentra en un medio líquido, su superficie adquiere una carga eléctrica, la cual es compensada por la acumulación de iones con carga opuesta en su entorno inmediato, formando así una doble capa eléctrica. Esta doble capa consta de una capa interna de iones fuertemente adsorbidos sobre la superficie de la partícula y una capa difusa de iones móviles. La diferencia de potencial entre la capa difusa y el fluido circundante define el potencial zeta (Figura 11b), el cual influye directamente en la estabilidad de la suspensión coloidal.¹⁰²

El potencial zeta se determina experimentalmente mediante electroforesis en combinación con técnicas de dispersión de luz, un método conocido como electroforesis de dispersión de luz (ELS). En este procedimiento, se aplica un campo eléctrico a la suspensión coloidal y se mide la velocidad de movimiento de las NP mediante el desplazamiento Doppler de la luz dispersada.¹⁰² La relación entre la velocidad de la partícula (v), la viscosidad del medio (η) y la intensidad del campo eléctrico aplicado (E) permite calcular el potencial zeta mediante la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski (Ecuación 4):

$$\xi = \frac{\eta v}{\epsilon E} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde ϵ es la permitividad dieléctrica del medio y ξ el potencial zeta.

El potencial zeta es un indicador clave de la estabilidad coloidal de una dispersión de NP. Un valor alto del potencial zeta, ya sea positivo o negativo, sugiere una suspensión estable, ya que la repulsión electrostática entre partículas con cargas similares evita la agregación. En contraste, valores bajos del potencial zeta indican una menor repulsión electrostática, lo que aumenta la probabilidad de que las partículas se agreguen y precipiten. De acuerdo con la magnitud del potencial zeta, la estabilidad coloidal se clasifica en los siguientes rangos⁸⁸:

- 1) 0 a ± 5 mV: Las partículas tienden a agregarse rápidamente.
- 2) ± 5 a ± 20 mV: Estabilidad mínima, con tendencia a la floculación.
- 3) ± 20 a ± 40 mV: Estabilidad coloidal moderada.
- 4) $>|\pm 40|$ mV o $\geq \pm 40$ mV: Alta estabilidad coloidal debido a una fuerte repulsión electrostática.

Además de la carga superficial inherente de las NP, el potencial zeta puede verse influenciado por factores externos como el pH y la fuerza iónica del medio. A un pH específico, conocido como el punto isoelectrico, el potencial zeta se reduce a cero, lo que implica una pérdida de repulsión electrostática y una mayor tendencia a la agregación de las partículas. Este fenómeno es particularmente relevante en la formulación de NP, ya que permite ajustar las condiciones de dispersión para maximizar su estabilidad.⁸⁸

1.4.6. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

El SEM utiliza un haz de electrones que barre la superficie de la muestra.¹⁰³ Los electrones interactúan con los átomos de la muestra y producen señales (como electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X) que se utilizan para formar imágenes de alta resolución de la superficie de la muestra. Lo que se traduce en diversas aplicaciones como una resolución en el rango de nanómetros, permitiendo la observación detallada de la morfología superficial de las NP, además que mediante acoplamiento con EDX (espectroscopía de dispersión de energía de rayos X), es posible determinar la composición elemental de las NP.^{104,105}

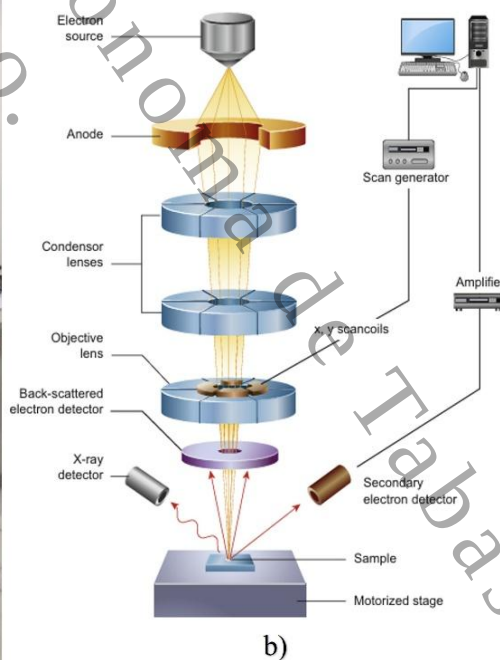


Figura 12. a) Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM JEOL JSM-7600F) usado en la caracterización morfológica de NP y b) Esquema de los componentes principales de un microscopio electrónico de barrido (SEM), mostrando la trayectoria del haz de electrones desde la fuente hasta la muestra, y la disposición de los detectores y sistemas de control. Imagen **b)** tomada de Fernández Martínez, 2025.¹⁰⁶

Por otro lado, la microscopía FESEM es una variante avanzada del SEM (Figura 12a) que utiliza un fuerte campo eléctrico para emitir electrones desde una punta muy afilada, lo que proporciona una mayor resolución y permite obtener imágenes con mayor claridad y detalle.¹⁰⁷ En este método, un haz de electrones incidentes, acelerados con una energía de 5-30 keV, viaja a través de una columna al vacío ($\sim 10^{-4}$ Pa) que al interactuar con la muestra genera diferentes tipos de señales, que son captadas por diversos detectores.¹⁰⁸ Los detectores de electrones retrodispersados permiten obtener información sobre la composición química y la topografía de la muestra, mientras que los detectores de electrones secundarios proporcionan imágenes con alto nivel de detalle de la morfología superficial. Adicionalmente, un detector de rayos X recoge la radiación emitida durante la interacción de los electrones con la muestra, lo que permite realizar un análisis composicional mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS o EDX). Finalmente, la información recolectada por los detectores es procesada por un generador de escaneo, amplificada y enviada a un ordenador, donde se genera y visualiza la imagen final de la muestra en tiempo real, lo que permite ampliaciones de 10 a 1 000 000 veces (Figura 12b). Comparado con el SEM convencional, el FESEM ofrece una mejor resolución, especialmente útil para el análisis de NP menores a 10 nm, además de proporcionar un contraste superior, facilitando la distinción entre diferentes morfologías o fases en la muestra. También presenta una mayor profundidad de campo y minimiza la carga sobre el espécimen, reduciendo el daño en muestras sensibles al haz de electrones.¹⁰⁵

1.4.7. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).

La espectroscopía de fotoelectrones por rayos X (XPS) es una técnica analítica utilizada para la caracterización de la composición química y los estados electrónicos de los materiales en su superficie (Figura 13a). Se trata de un método cuantitativo que permite determinar la proporción de los elementos presentes, sus estados de oxidación y la naturaleza de los enlaces

químicos. Debido a su capacidad para proporcionar información detallada a nivel superficial, XPS es ampliamente empleada en la caracterización de NP y óxidos metálicos.⁸⁸

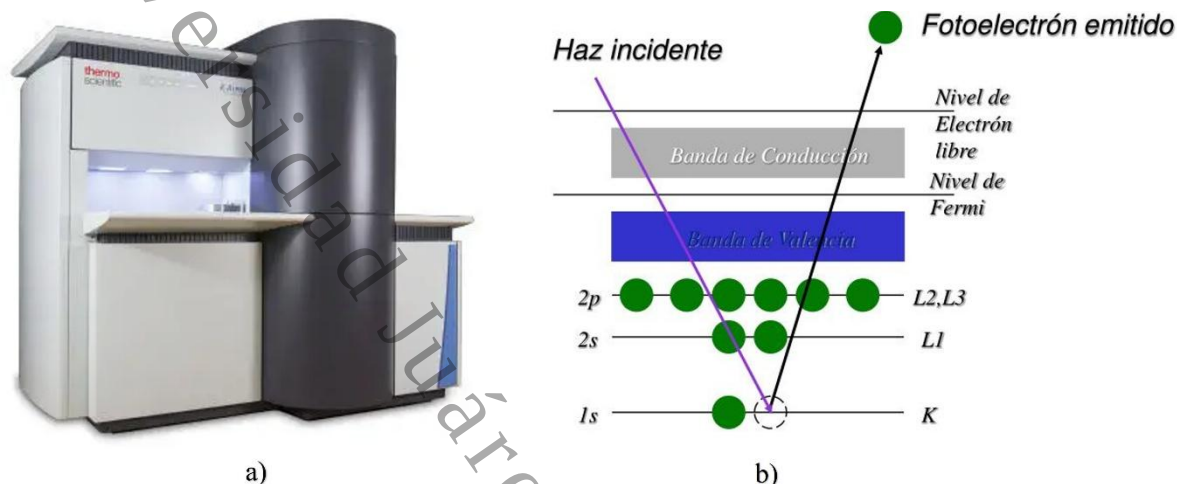


Figura 13. a) Espectrómetro de fotoelectrones K-Alpha (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) utilizado para análisis de espectroscopía de fotoelectrones excitados por rayos X (XPS). b) Principio de funcionamiento del XPS, mostrando la interacción del haz incidente con los electrones de la muestra y la emisión de fotoelectrones desde diferentes niveles de energía. Imagen **b)** tomada de L. Brito, 2015.¹⁰⁹

XPS se basa en el efecto fotoeléctrico, donde una muestra es irradiada con rayos X bajo condiciones de ultra alto vacío (UHV), provocando la emisión de electrones desde los niveles internos (core levels) de los átomos presentes en la superficie del material.^{88,110} Estos electrones emitidos poseen una energía cinética característica que es detectada y analizada para calcular su energía de enlace (binding energy, E_b), la cual proporciona información sobre el estado químico y de oxidación de los elementos en la superficie (Figura 13b).¹¹¹ La relación entre la energía cinética y la energía de enlace se expresa mediante la ecuación (Ecuación 5):

$$E_b = h\nu - E_k - \Phi \quad (\text{Ec. 5})$$

donde:

E_b es la energía de enlace del electrón emitido, $h\nu$ es la energía del fotón de rayos X incidente, E_k es la energía cinética del electrón emitido y Φ es la función de trabajo del espectrómetro.

Además, el XPS es una técnica fundamental para la detección de contaminantes superficiales o compuestos extraños en las NP que puedan afectar su funcionalidad y estabilidad, por lo que es clave para evaluar la pureza del material y optimizar sus propiedades.¹¹¹

1.5. Métodos para determinar la actividad antibacteriana

Ante la problemática de la resistencia bacteriana, la obtención de NP metálicas y de óxidos metálicos mediante extractos vegetales ha cobrado gran importancia, ya que combinan las propiedades del nanomaterial, la acción antibacteriana intrínseca del núcleo inorgánico con la actividad biológica de metabolitos secundarios presentes en el extracto.¹¹² En este sentido, se ha reportado que AgNP sintetizadas con extracto de *Azanza garckeana* lograron inhibir eficazmente el crecimiento de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), alcanzando valores de MIC de 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.¹¹³ Asimismo, AgNP y ZnO-NP obtenidas con extracto de *Moringa oleifera* mostraron halos de inhibición cercanos a 17 mm contra ambos patógenos,¹¹⁴ y CuO-NP producidas con extracto de *Azadirachta indica* han mostrado valores de MIC entre 62.5 y 125 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* resistente a meticilina y *E. coli*.¹¹⁵

Estos antecedentes respaldan la pertinencia de evaluar la actividad antibacteriana de las NP sintetizadas mediante síntesis bioasistida frente a modelos bacterianos, aplicando métodos estandarizados como la difusión en disco y la microdilución en caldo. Cabe destacar que los modelos deben incluir tanto una bacteria Gram positiva como una Gram negativa, lo que permite valorar de manera más completa el espectro y la eficacia de las NP frente a diferentes tipos de pared celular bacteriana.

1.5.1. Actividad antibacteriana por método de difusión en agar.

El método de difusión en agar es una técnica ampliamente utilizada en microbiología para evaluar la actividad antibacteriana de compuestos químicos, incluidos antibióticos, extractos naturales y nanomateriales.¹¹⁶ Este método implica la difusión de una sustancia en un medio sólido, generalmente agar, donde se ha inoculado previamente una suspensión bacteriana. La

actividad antibacteriana se evalúa midiendo la zona de inhibición, que es el área alrededor del sitio de aplicación donde el crecimiento bacteriano se ve impedido.^{116,117}

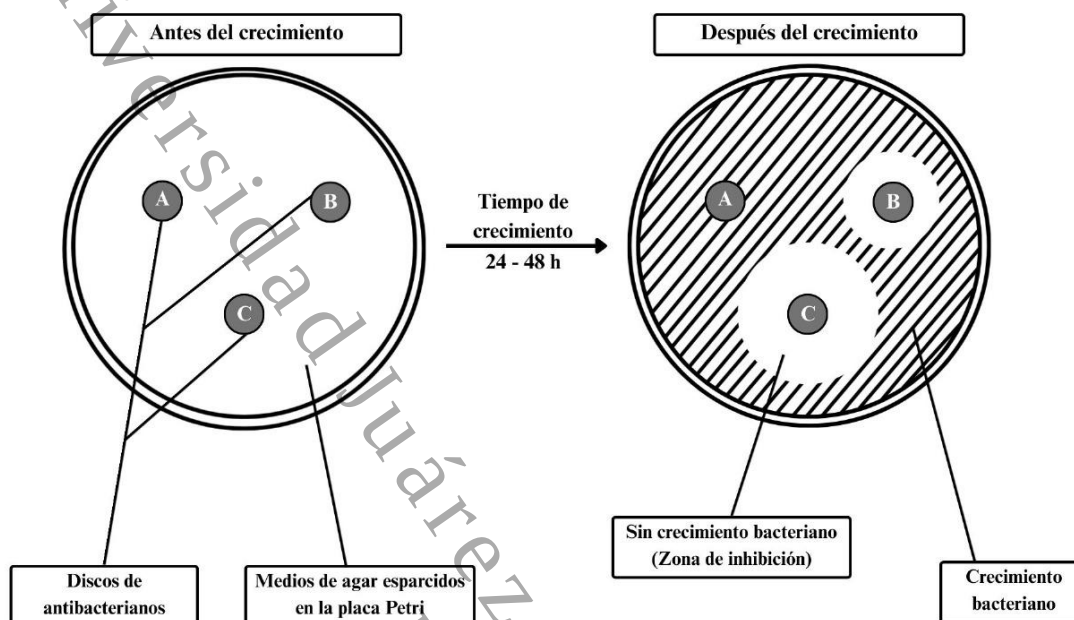


Figura 14. Representación esquemática del ensayo de difusión en disco para evaluar la actividad antibacteriana. a) Disposición inicial de los discos con agentes antibacterianos sobre el agar antes de la incubación. b) Placa de Petri después de 24-48 h de crecimiento, mostrando las zonas de inhibición (sin crecimiento bacteriano) y las áreas con crecimiento bacteriano. Esquema elaborado basado en el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (1966).¹¹⁸

El ensayo se realizó mediante la colocación de discos impregnados con la sustancia sobre agar previamente inoculado (Figura 14), donde la actividad antibacteriana se evidenció por la formación de zonas claras de inhibición alrededor de los discos. La difusión en disco suele ser el método de elección en estudios preliminares de cribado debido a su simplicidad y estandarización.^{116,119}

Cabe mencionar que la efectividad de los agentes antibacterianos en el método de difusión puede verse limitada si los compuestos no difunden adecuadamente en el medio sólido. Esto es especialmente relevante en el caso de compuestos con baja solubilidad o tendencia a agregarse, lo que puede resultar en zonas de inhibición menores a las esperadas, independientemente de su potencia. Además de las propiedades fisicoquímicas del agente, la

estructura de la pared celular bacteriana también influye en los resultados del ensayo. Mientras que *S. aureus* podría mostrar zonas de inhibición más grandes si el agente antibacteriano logra atravesar su pared celular con facilidad, en *E. coli* la presencia de la membrana externa podría retardar la difusión y reducir la efectividad del tratamiento en este tipo de ensayo.^{117,120}

1.5.2. Actividad antibacteriana por método de microdilución.

Como se sabe, la actividad antibacteriana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el crecimiento de una población bacteriana o para eliminarla, y que se puede expresar cuantitativamente con pruebas *in vitro*. Se puede medir mediante el método de microdilución, determinando la MIC o la MBC, del compuesto y comparar entre diferentes compuestos.¹¹⁶

La MIC corresponde a la menor concentración del agente capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo y es un parámetro fundamental en la evaluación de nuevas sustancias con actividad antibacteriana.^{116,120} A diferencia de los métodos de difusión en agar, la microdilución permite analizar un amplio rango de concentraciones y es completamente compatible con nanomateriales en suspensión, lo que facilita su estudio en condiciones más representativas de aplicaciones clínicas e industriales.¹¹⁹

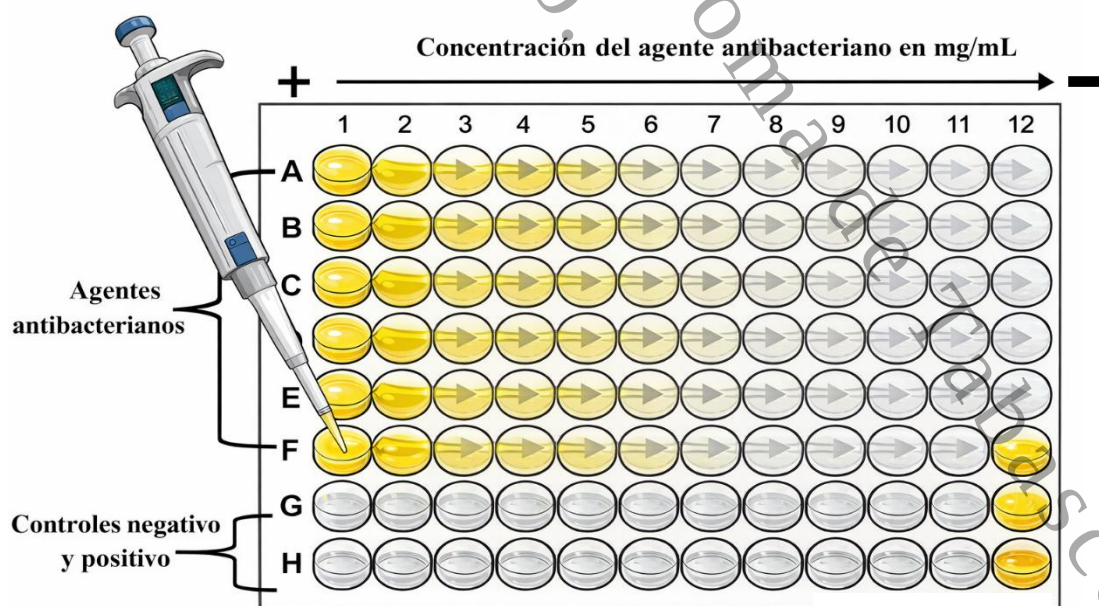


Figura 15. Esquema de una microplaca de 96 pocillos utilizada en el método de microdilución en caldo para la determinación de la concentración MIC de agentes antibacterianos. Las columnas representan diluciones seriadas 1:2 obtenidas mediante transferencia sucesiva con micropipeta, mientras que las filas corresponden a distintas condiciones experimentales, incluyendo controles positivo y negativo. Imagen adaptada de Wiegand et al. (2008).¹²¹

El procedimiento se lleva a cabo en microplacas de 96 pocillos (Figura 15), donde se realizan diluciones seriadas del agente antibacteriano en un medio de cultivo líquido. Para ello, se prepara una suspensión bacteriana estandarizada con una densidad óptica específica, ajustada mediante espectrofotometría, generalmente utilizando la escala de McFarland. Posteriormente, cada pocillo recibe una dilución del agente antibacteriano junto con una cantidad fija de la suspensión bacteriana, asegurando así una densidad uniforme en todas las muestras (Figura 14). En este tipo de ensayos, los agentes evaluados corresponden a compuestos con potencial actividad antimicrobiana, los cuales pueden incluir antibióticos, extractos naturales o nanomateriales, con el fin de determinar su capacidad inhibitoria frente a microorganismos específicos. Las microplacas se incuban a 37 °C durante 16 a 24 h, y al finalizar el tiempo de incubación se evalúa la turbidez del medio para determinar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.^{122,123}

A diferencia de los ensayos de difusión en agar, la microdilución en caldo ofrece una cuantificación más precisa de la actividad antibacteriana de los nanomateriales porque prescinde por completo de los problemas de difusión: En este método, el agente se encuentra disperso en un medio líquido que reproduce mejor el entorno biológico, aunque la estabilidad coloidal puede variar dependiendo de la naturaleza del nanomaterial y del medio de cultivo.^{119,124} En estas condiciones, el contacto directo y simultáneo con las células bacterianas permite determinar la MIC, que a menudo resulta más baja que la obtenida por difusión, lo que sugiere una eficacia superior.¹²⁵ Además, la microdilución facilita el estudio de respuestas concentración-dependientes y la incorporación de ensayos complementarios, como la detección de ROS, los cambios de permeabilidad de la membrana o las interacciones con proteínas y ácidos nucleicos, que ayudan a dilucidar mecanismos de acción.¹¹⁹

1.6. Análisis estadísticos-Correlación de Pearson.

La correlación de Pearson es una medida estadística que permite cuantificar la relación lineal entre dos variables cuantitativas.¹²⁶ Su coeficiente, representado como r , toma valores entre -1 y 1, donde valores cercanos a 1 indican una fuerte correlación positiva, es decir, cuando una variable aumenta, la otra también lo hace en proporción directa. Por el contrario, valores cercanos a -1 reflejan una correlación negativa, lo que implica que cuando una variable aumenta, la otra disminuye. Si el coeficiente se aproxima a 0, se considera que no existe una relación lineal significativa entre ambas variables (Figura 16.).

Matemáticamente, el coeficiente de correlación de Pearson se define mediante la relación entre la covarianza de dos variables y el producto de sus desviaciones estándar. Se expresa como (Ecuación 6):

$$r = \frac{COV(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y} \quad (\text{Ec. 6})$$

donde $COV(X,Y)$ es la covarianza entre las variables X e Y , que mide la variabilidad conjunta de ambas variables respecto a sus medias, mientras que σ_X y σ_Y representan sus desviaciones estándar. También puede expresarse en términos de sumatorias¹²⁶:

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde X_i e Y_i son los valores individuales de cada variable y $\bar{X}$ y $\bar{Y}$ representan sus medias. Esta expresión permite calcular el grado de asociación entre dos conjuntos de datos de manera eficiente y comparativa.

La correlación de Pearson tiene una amplia aplicación en diversas disciplinas. En química y nanotecnología, se emplea para evaluar la relación entre variables como la concentración de reactivos y la eficiencia de una reacción o la correlación entre el tamaño de NP y su actividad biológica.¹²⁷ Por ejemplo, en plantas de *Eschscholzia californica* tratadas foliarmente con AgNP (10–100 mg/L), la correlación de Pearson se usó para vincular el “tipo y dosis” de la NP con la respuesta fisiológica y metabólica.¹²⁸ Dichas correlaciones identificaron condiciones óptimas de síntesis y dosificación que maximizan la producción de compuestos bioactivos y mejoran la eficiencia fisiológica, demostrando su valor como herramienta para

optimizar procesos y comprender mecanismos de acción a nivel nanométrico. De forma similar, Ershov y Ershov¹²⁹ aplicaron este análisis para relacionar el tamaño de AgNP con su actividad antibacteriana, encontrando correlaciones positivas muy fuertes ($r \approx 0.98$) entre el diámetro de partícula y la MIC, lo que evidenció que partículas más pequeñas poseen una mayor eficacia antimicrobiana debido a su mayor superficie específica y capacidad de interacción con las células microbianas.

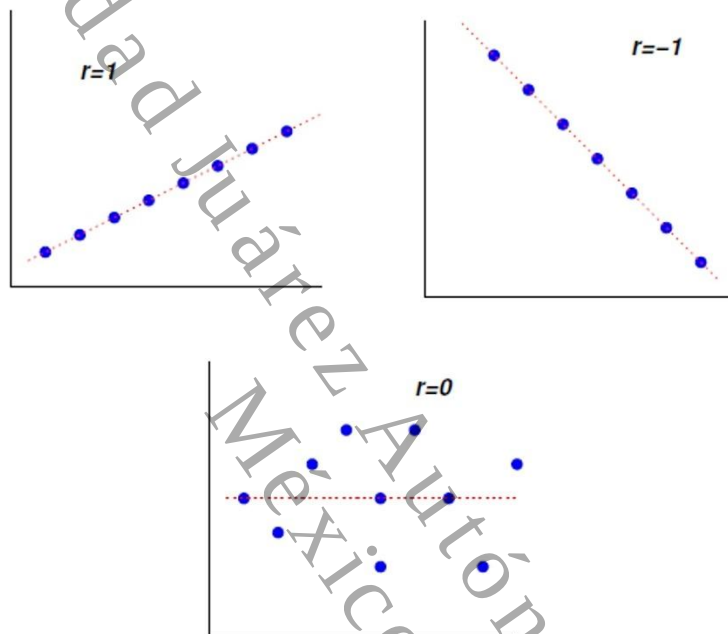


Figura 16. Representación Gráfica de la Correlación de Pearson según el Coeficiente 'r'.

Donde $r = 1$ indica una correlación positiva perfecta, $r = -1$ indica una correlación negativa perfecta y $r = 0$ indica ausencia de correlación lineal. Imagen adaptada de Schober et al.

(2018).¹³⁰

El potencial de la correlación de Pearson radica en su capacidad para proporcionar información cuantitativa sobre la relación entre variables, facilitando la identificación de tendencias y patrones en conjuntos de datos. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que la correlación no implica causalidad y que su interpretación debe realizarse con precaución.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia antibacteriana representa uno de los mayores desafíos para la salud pública a nivel mundial¹⁰, ya que compromete la eficacia de los tratamientos convencionales y aumenta la mortalidad asociada a infecciones difíciles de tratar.¹³¹ Entre los patógenos más críticos se encuentran *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y cepas resistentes de *E. coli*, responsables de una parte significativa de las muertes por infecciones intratables.¹⁰

En 2019, las MRSA causaron más de 1 000 000 muertes a nivel global,^{132,133} mientras que *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas también protagonizó una gran cantidad de casos mortales.¹³³ La OMS proyecta que ambas bacterias representarán más del 80 % de las muertes relacionadas con resistencia antimicrobiana en la próxima década, alcanzando unos 4 millones de fallecimientos sólo en la Región del Pacífico Occidental para 2030.¹³³ Ante esta problemática, es fundamental el desarrollo de alternativas innovadoras que permitan combatir eficazmente los patógenos resistente a los antibióticos.

En este sentido, la síntesis bioasistida de NP, como las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP, empleando extractos de plantas medicinales como *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, se presenta como una estrategia ecológica. Y es que a diferencia de los métodos tradicionales de síntesis, que requieren altas temperaturas, presión o sustancias tóxicas, esta metodología destaca por ser sostenible, económica y ambientalmente segura.¹³⁴ Además, los compuestos bioactivos presentes en los extractos actúan como agentes reductores, en el caso de las NP metálicas como la Ag, y/o como estabilizantes en la formación de óxidos metálicos (ZnO y CuO), lo que facilita el control de la nucleación, evita la aglomeración y contribuye a la estabilidad coloidal. Aunado a esto, dichas moléculas también contribuyen a la funcionalización superficial que mejora la interacción con bacterias potenciando su actividad antibacteriana.^{37,134}

Finalmente, las propiedades fisicoquímicas de las NP, como el tamaño, la distribución de partículas, la estabilidad coloidal y la cristalinidad, influyen directamente en su actividad antibacteriana.¹³⁵⁻¹³⁷ Diversos estudios han demostrado que estas características pueden modificarse mediante tratamientos térmicos posteriores a la síntesis, los cuales permiten ajustar la estructura y composición superficial de los nanomateriales.¹³⁵⁻¹³⁸ En este contexto,

la aplicación de diferentes condiciones térmicas, como el secado a 60 °C o la calcinación a 500 °C, puede generar diferencias en la cantidad de compuestos orgánicos, la cristalinidad y el grado de agregación de las partículas. Mientras que a 60 °C¹² se favorece la preservación de compuestos orgánicos activos lo que puede mejorar la dispersión y facilitar la difusión del material en medios sólidos, la calcinación a 500 °C incrementa la cristalinidad y reduce la presencia de residuos orgánicos, modificando la composición superficial de las NP.^{137,139} Estas diferencias pueden influir en la interacción con las bacterias y, por tanto, en la respuesta antibacteriana observada. Por tanto, esta propuesta representa una alternativa dual: control de bacterias de relevancia clínica, y al mismo tiempo evita el uso de insumos químicos nocivos, lo que la posiciona como una opción viable para aplicaciones biomédicas y ambientales.^{5,7}

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO.

CAPÍTULO III HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

3. HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Pregunta de investigación.

¿Cómo influye la composición de los extractos acuosos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, así como la temperatura de secado, en las propiedades morfológicas, de tamaño, estabilidad coloidal y actividad antibacteriana de NP de Ag, ZnO y CuO sintetizadas por vía bioasistida frente a *S. aureus* y *E. coli*?

3.2. Hipótesis.

Los extractos con diferente composición fitoquímica, combinados con un tratamiento térmico a baja temperatura (60 °C), generan NP de Ag, ZnO y CuO de menor tamaño, con morfología más regular y mayor estabilidad coloidal, lo que se traduce en propiedades antibacterianas superiores en comparación con aquellas obtenidas tras la calcinación (500 °C).

CAPÍTULO IV OBJETIVOS

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo General.

Sintetizar AgNP, ZnO-NP y CuO-NP mediante un enfoque bioasistido utilizando extractos acuosos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, y evaluar la influencia del contenido de polifenoles, flavonoides, así como el efecto de la temperatura de secado, sobre sus propiedades fisicoquímicas y actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli*.

4.2. Objetivos Específicos.

1. Caracterizar y cuantificar el contenido de polifenoles, flavonoides y cloruros de los extractos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil* mediante métodos espectroscópicos.
2. Sintetizar NP de Ag, ZnO y CuO utilizando extractos de plantas medicinales como agentes de síntesis y estabilización.
3. Caracterizar las diferentes NP obtenidas, evaluando sus propiedades fisicoquímicas y estructurales mediante: FTIR, UV-Vis, DRX, DLS, FESEM, EDS y XPS.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y las NP obtenidas por síntesis bioasistida contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATTC 25923.
5. Establecer la correlación entre las propiedades de las NP obtenidas, su actividad antibacteriana, temperatura de secado y el contenido de polifenoles y flavonoides presentes en los extractos de las plantas empleadas mediante la correlación de Pearson.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO V METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

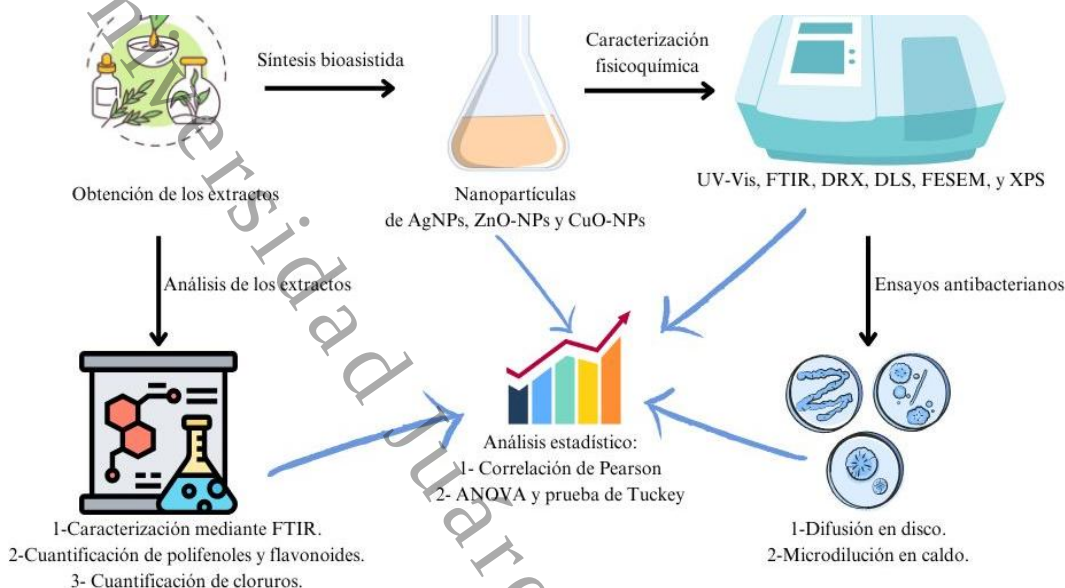


Figura 17. Esquema metodológico general para la síntesis bioasistida de NP de Ag, ZnO y CuO usando extractos de plantas medicinales, incluyendo su evaluación antibacteriana y el análisis estadístico de los resultados.

El esquema metodológico general (Figura 17) en este estudio presenta la síntesis bioasistida de AgNP, ZnO-NP y CuO-NP utilizando extractos acuosos de plantas medicinales. El procedimiento inicia con la obtención y análisis de los extractos vegetales, que incluye la caracterización funcional por FTIR, así como la cuantificación de polifenoles, flavonoides y cloruros. Posteriormente, se realiza la síntesis de las NP de base metálica, cuyas propiedades fisicoquímicas son evaluadas mediante técnicas como UV-Vis, FTIR, DRX, DLS, FESEM y XPS. Las NP obtenidas son sometidas a ensayos antimicrobianos mediante métodos de difusión en disco y microdilución en caldo para determinar su eficacia frente a bacterias patógenas. Finalmente, se lleva a cabo un análisis estadístico que incluye pruebas de correlación de Pearson, ANOVA y prueba de Tukey, con el fin de establecer relaciones entre el contenido de metabolitos en los extractos, las características fisicoquímicas de las NP y su actividad antibacteriana.

5.1. Obtención y caracterización de los extractos acuosos de las tres plantas medicinales.

5.1.1. Preparación de extractos acuosos y caracterización mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El material vegetal de las tres plantas fue colectado en Tabasco, México entre agosto y noviembre de 2023. La identificación de las plantas y voucher fue realizada por el herbario de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, así como las coordenadas geográficas de las zonas donde se colectaron: *A. arvensis* con No. 036228 (18°00'00" N, 92°40'00" W), *H. rovirosae* con No. 036665 (18°04'32.5" N, 93°10'09.7" W) e *I. jinicuil* con No. 036576 (18°00'00" N, 92°40'00" W). El material vegetal se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente durante 72 h; posteriormente se pulverizó empleando un molino manual (marca Estrella). A partir del material pulverizado de cada especie se procedió a la obtención de sus extractos, para ello se prepararon soluciones al 15% p/v con agua destilada, mismas que fueron calentadas a 60 °C durante 30 min y dejándolas reposar a temperatura ambiente durante 1 h; estas soluciones fueron filtradas por gravedad usando papel filtro Whatman No. 1; concentrados al vacío empleando un rota evaporador marca Buchi modelo R300. Además, parte de los extractos fueron liofilizados en un equipo Labconco FreeZone 18. Los extractos obtenidos tanto acuosos como liofilizados se almacenaron en un lugar fresco, seco y bajo resguardo de la luz para su uso posterior.

Con el propósito de caracterizar los grupos funcionales de los metabolitos presentes en los extractos liofilizados se utilizó FTIR (Nicolet iS50; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) equipado con un módulo de reflectancia total atenuada y un cristal de diamante. Los espectros se recopilaron en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} con 32 escaneos a una resolución establecida. Posteriormente, los espectros obtenidos fueron analizados mediante la identificación de las bandas características de absorción correspondientes a los grupos funcionales presentes, con base en datos reportados en la literatura.

5.1.2. Determinación del contenido de polifenoles, flavonoides y cloruros totales.

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides, se utilizaron 10 mg de extracto liofilizado de cada planta, lo cuales fueron disueltos en 2 mL de metanol ($\geq 99.8\%$, Merck, Darmstadt, Germany).

La cuantificación de polifenoles totales se realizó siguiendo un método previamente reportado,¹⁴⁰ con modificaciones menores. Se utilizó ácido gálico ($\geq 97.0\%$; Sigma Aldrich, MO, USA) como estándar, preparando una solución madre de 1 mg/mL en metanol. A partir de esta solución, se elaboró una curva de calibración con concentraciones de 0.001, 0.002, 0.004, 0.006 y 0.007 mg/mL. Posteriormente, se tomaron 100 μL de las soluciones de extracto preparadas previamente, a las cuales se añadieron 1400 μL de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Sigma Aldrich, MO, USA), y 250 μL de una solución de Na_2CO_3 (20 wt%, $\geq 99.5\%$; Sigma Aldrich, MO, USA). Finalmente, la mezcla se incubó durante 2 h y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYSTM 10S; Menlo Park, CA, USA). Todas las lecturas se realizaron por triplicado y el contenido de polifenoles se reportó como mg EAG/g de extracto.

En la cuantificación de flavonoides, se adaptó un método previamente reportado.¹⁴¹ Se preparó una curva de calibración utilizando rutina ($\geq 94.0\%$; Sigma Aldrich, MO, USA) como estándar, en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mg/mL, preparando una solución madre a una concentración de 1 mg/mL en metanol. Para el análisis, se tomaron 100 μL de las soluciones de extracto y se añadieron 1250 μL de agua destilada, 75 μL de NaNO_2 (5 wt%, $\geq 99.0\%$; Sigma Aldrich, MO, USA), 5 min después se añadieron 150 μL de AlCl_3 (10 wt%, 98%; Merck, Darmstadt, Germany), y pasados 6 min se añadieron 500 μL de NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\geq 97.0\%$; Merck, Darmstadt, Germany). La absorbancia se midió a 510 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y el contenido de flavonoides se reportó como mg ER/g de extracto.

Debido a los resultados obtenidos por DRX, se cuantificaron los iones cloruros (Cl^-) en los extractos acuosos mediante el método de Mohr¹⁴². Se utilizó una solución de AgNO_3 0.1 M (95-100%; Meyer, México) para la titulación por precipitación, analizando un volumen de 50 mL de cada extracto filtrado. La presencia de Cl^- se confirmó mediante análisis de EDS y XPS. La determinación se realizó por triplicado y el contenido de cloruros se reportó como mmol/L. Por último, para comparar el contenido de polifenoles, flavonoides y cloruros totales entre las plantas estudiadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% ($*p \leq 0.05$), seguido de la prueba de Tukey.

5.2. Síntesis bioasistida de NP.

5.2.1. Síntesis de AgNP.

La síntesis de AgNP se realizó adaptando la metodología propuesta por Raj et al. (2018)¹⁴³ Se añadieron gradualmente 20 mL de cada extracto de planta a 600 mL de AgNO_3 1 mM, en una proporción 1:30 entre el volumen de extracto y la solución metálica. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 200 rpm y a 60 °C por 20 min. La reacción se llevó a cabo en condiciones de oscuridad para prevenir la foto activación del AgNO_3 .

Posteriormente, la solución se mantuvo a 60 °C durante 2 h adicionales, hasta observar un cambio de color a marrón oscuro, característico de la formación de AgNP, el cual se atribuye a la SPR.¹⁴⁴ Luego, se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. La reacción obtenida se centrifugó (centrífuga SOLBAT J-40) a 4500 rpm durante 60 min. El precipitado resultante se sometió a un proceso de lavado en tres etapas: inicialmente con agua destilada, seguido de etanol ($\geq 99.8\%$; Merck, Darmstadt, Germany), y por último con agua destilada. Finalmente, se secaron en un horno (FE-291A; Felisa, Jalisco, México) a 60 °C durante 18 h.

Con el fin de evaluar el efecto del proceso de secado en la cristalinidad, tamaño y morfología de las NP, se prepararon muestras tratadas a 60 °C y otras calcinadas a 500 °C durante 4 h en un horno de mufla (TE-M12DR; Terlab, Jalisco, México), etiquetadas como: **Ag-Aa-60**, **Ag-Hr-60** y **Ag-Ij-60** para los tratados a 60 °C, y **Ag-Aa-500**, **Ag-Hr-500** y **Ag-Ij-500** para las calcinadas a 500 °C.

Cabe mencionar que se seleccionaron estas dos temperaturas ya que a 60 °C permite una temperatura baja que elimina agua y solventes sin degradar los metabolitos del extracto (manteniendo el recubrimiento orgánico adherido a la superficie de las NP), mientras que 500 °C supera el umbral de descomposición de esos compuestos, induce la descomposición térmica de la capa orgánica y favorece la cristalización de las fases metálicas u óxidos.^{3,145}

5.2.2. Síntesis de ZnO-NP.

La síntesis de ZnO-NP se basó en el método reportado por López González et al. (2024)⁶⁰ Para ello, se disolvieron 2.823 g de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98\%$; Sigma Aldrich) en 643 mL

de agua destilada, y se añadieron 25 mL de extracto de cada planta, manteniendo una proporción 1:25 entre el volumen de extracto y el precursor metálico. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 h a temperatura ambiente.

El pH de la solución se ajustó a 12 mediante la adición de NaOH 1 M, para favorecer la precipitación de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ y facilitar su conversión a ZnO. Posteriormente, la mezcla se agitó durante 1 h adicional y se dejó precipitando toda la noche. El precipitado obtenido se decantó y luego se separó por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, seguido de tres lavados sucesivos con agua destilada, etanol y nuevamente agua destilada para eliminar residuos de NaOH. Finalmente, el producto obtenido se secó a 60 °C durante 18 h.

De manera similar y con el mismo objetivo que la síntesis de AgNP, se obtuvieron muestras tratadas a 60 °C y otras sometidas a calcinación a 500 °C por 4 h. Los productos se etiquetaron como: **Zn-Aa-60**, **Zn-Hr-60** y **Zn-Ij-60** para las muestras tratadas a 60 °C y **Zn-Aa-500**, **Zn-Hr-500** y **Zn-Ij-500** para las calcinadas.

5.2.3. Síntesis de CuO-NP.

La síntesis de CuO-NP se realizó adaptando una metodología ¹⁴⁶ con modificaciones. Se empleó una relación 1:10 entre el volumen del extracto y la solución del precursor metálico, mezclando 50 mL de extracto con 500 mL de una solución 5 mM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98\%$; Meyer).

La mezcla de reacción se agitó a 400 rpm durante 30 min. Posteriormente, el pH se ajustó a 7 utilizando NaOH 1 M, y la agitación se continuó durante 2 h adicionales. Luego se precipitó durante toda la noche. El precipitado se decantó y se recuperó por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, seguido de tres lavados sucesivos con agua destilada, etanol y agua destilada. Luego, el material obtenido se secó a 60 °C durante 18 h.

Al igual que en las síntesis anteriores, se prepararon dos lotes etiquetados como: **Cu-Aa-60**, **Cu-Hr-60** y **Cu-Ij-60** para las muestras tratadas a 60°C, y **Cu-Aa-500**, **Cu-Hr-500** y **Cu-Ij-500** para las calcinadas a 500 °C durante 4 h.

Los rendimientos de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP se determinaron usando la **Ec. 8** para las muestras sometidas a calcinación. Cabe mencionar que el rendimiento de NP se determinó

exclusivamente para las muestras calcinadas a 500 °C, ya que este tratamiento térmico asegura la completa eliminación de compuestos orgánicos residuales procedentes del extracto vegetal y la humedad asociada. De esta manera, el peso obtenido corresponde únicamente a la fracción inorgánica (metal u óxido metálico) libre de interferencias, lo que permite cuantificar de forma más precisa y reproducible la masa real de NP formadas.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa experimental de las AgNPs}}{\text{masa teórica de las AgNPs}} \times 100\% \quad (\text{Ec. 8})$$

Finalmente, para comparar el efecto del extracto en el rendimiento de la síntesis bioasistida de NP, se realizó un ANOVA con un nivel de confianza del 95% (*p≤0.05), seguido de la prueba de Tukey.

5.3. Caracterización de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP

5.3.1. Caracterización de las AgNP.

Al final de la síntesis, se analizó la absorbancia de la solución coloidal mediante espectrofotometría UV-Vis (VE-8000A; VELAB, México) en un rango de 300–700 nm para Ag. Este análisis identificó la LSPR característica de las AgNP entre los 400-450 nm.

Para identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de las NP, se utilizó FTIR, siguiendo el protocolo descrito para los extractos acuosos.

La identificación de las fases cristalinas de las NP se llevó a cabo mediante DRX en un difractómetro D8 Advance (Bruker, MA, USA) con radiación Cu-Kα (λ = 1.5418 Å). Se empleó un tamaño de paso de 0.02° (2θ) en un rango de 20° a 80°, con un tiempo de conteo de 0.3 s por paso. El tamaño del cristalito (D) se calculó mediante la ecuación de Scherrer (Ec. 2) utilizando el pico de mayor intensidad.

El análisis de DLS y la medición del potencial zeta se realizaron en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Las NP se suspendieron en agua destilada desde una concentración inicial de 0.1 mg·mL⁻¹ hasta 0.0125 mg·mL⁻¹, aplicando sonicación durante 30 min (Cole-Parmer 8891R-MT) con una frecuencia de 42 kHz ± 6%. Los datos se registraron a 20 ± 5 °C, con una longitud de onda de 633 nm, constante dieléctrica de 79.9,

índice de refracción de 1.333 y viscosidad de 1.000 cP. El potencial zeta se determinó utilizando un electrodo ZEN1002-Zeta Dip CELL.

El tamaño y la morfología de las NP se determinaron mediante FESEM en un microscopio JSM-7600F (JEOL, Tokyo, Japan). Las muestras se depositaron sobre cinta de carbono y se recubrieron con Au-Pd. Las micrografías obtenidas se analizaron con el programa ImageJ v1.54d (NIH, EE. UU.), ejecutado sobre Java 1.8.0_345 (64-bit). Primero se definió la escala espacial utilizando la barra de 500 nm incrustada en cada imagen. Después, se seleccionaron manualmente 50 NP individuales por condición muestra, procurando excluir agregados para evitar sesgos por aglomeración. El diámetro de cada partícula se registró como diámetro medio $\pm$ DE ($n = 50$). El análisis elemental se realizó mediante EDS con el sistema Oxford-EDS, y los espectros se procesaron con el software INCA Microanalysis Suite.

Finalmente, se realizó la caracterización química mediante XPS en un espectrómetro K-Alpha (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.), utilizando radiación Al K α monocromática (1486.6 eV), operando en modo de energía de paso constante. El procesamiento de todos los datos y la generación de gráficos se realizaron con el software Origin Pro 8.5.

5.3.2. Caracterización de las ZnO-NP.

Todas las mediciones, incluyendo las de absorbancia, y la caracterización estructural, morfológica y química de las ZnO-NP, se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para las AgNP. En cuanto al análisis de UV-Vis se identificó la banda de absorción asociada a sus transiciones electrónicas de banda prohibida (band gap), típicamente entre 350–380 nm.

5.3.3. Caracterización de las CuO-NP.

La caracterización estructural, morfológica y química de las CuO-NP se efectuó de manera análoga a lo descrito para las AgNP. En este caso, la absorbancia de la solución coloidal se evaluó mediante espectrofotometría UV-Vis en un rango de 200–700 nm, identificando una absorción más amplia en la región visible o cercana al infrarrojo (250–350 nm).

Cabe aclarar que en todos los casos la caracterización por espectroscopía UV-Vis se realizó únicamente durante la etapa de síntesis, con el objetivo de monitorear la formación de las NP en la solución coloidal. En consecuencia, los espectros presentados corresponden a esta etapa

del proceso y no se realizaron mediciones posteriores para las muestras sometidas a tratamientos térmicos (60 °C y 500 °C).

5.4. Actividad antibacteriana de extractos y NP.

5.4.1. Ensayo de difusión en disco.

Las propiedades antibacterianas de las NP y los extractos se evaluaron contra la bacteria Gram negativa *E. coli* ATCC 25922 y la bacteria Gram positiva *S. aureus* ATCC 25923 mediante difusión en disco, lo que permitió estimar la susceptibilidad bacteriana.

Para ello, se ajustó un cultivo bacteriano de 16 h, a una densidad óptica de 1×10^6 UFC·mL⁻¹ (OD^{550 nm}). Para la preparación de las placas, se mezclaron 31.5 mL de agar soya tripticaseína (TSA, BIOXON) con 3.5 mL del inóculo bacteriano, asegurando una distribución homogénea, y se vertieron en placas cuadradas de 10 x 10 cm.

Las NP y el extracto liofilizado se prepararon suspendiendo 100 mg en 1 mL agua destilada estéril, seguidas de sonicación durante 1 h. Luego, se impregnaron discos de papel (6 mm de diámetro) con 20 µL de cada muestra. Una vez secos, los discos se distribuyeron equidistantemente sobre las placas gelificadas. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y amikacina a 100 µg/mL como control positivo. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C. Después de la incubación, las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos se midieron utilizando un calibrador con escala Vernier. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. ^{125,147,148}

Finalmente, para comparar el efecto del tratamiento térmico en las propiedades antibacterianas de las NP, así como las diferencias entre los extractos, las NP y el fármaco de referencia con respecto al halo de inhibición, se realizó un ANOVA con un nivel de confianza del 95% (*p≤0.05), seguido de la prueba de Tukey.

5.4.2. Método de microdilución en caldo.

Una vez probada la actividad antibacteriana de las muestras mediante el ensayo de difusión en disco, se utilizó el método de microdilución en caldo para determinar la MIC y la MBC contra las bacterias modelo: *S. aureus* y *E. coli*.

La MIC y la MBC de las NP y de los extractos se determinaron siguiendo el protocolo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),¹⁴⁷ con modificaciones menores. Las diluciones seriadas se realizaron en placas de microdilución de 96 pozos a lo largo de los 12 pozos consecutivos de cada fila, mediante diluciones sucesivas 1:2. De esta manera se obtuvieron los siguientes rangos de concentración: para AgNP de 5000 a 2.44 µg/mL (≈ 2.5 µg/mL); para ZnO-NP, de 20 000 a 10 µg/mL; y para CuO-NP, de 10 000 a 5 µg/mL. Luego, se adicionaron 100 µL de un inóculo bacteriano ajustado a 1×10^6 UFC/mL, calibrado mediante densidad óptica a 550 nm, preparado en caldo soya tripticaseína (TSB, MCD Lab). Como control negativo se utilizó TSB, y como control positivo, amikacina a una concentración de 100 µg/mL. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

Posteriormente, se añadió resazurina a 0.1% como indicador de viabilidad bacteriana, donde los pozos con bacterias vivas mostraron un cambio de color rosa, mientras que los pozos con células muertas permanecieron color azul, permitiendo determinar el MIC. La MBC se determinó transfiriendo 10 µL de cada pozo a placas nuevas con medio TSA, las cuales se incubaron a 37 °C durante 24 h. La MBC se definió como la menor concentración en la que no se observó crecimiento bacteriano. El modo de acción de las NP se clasificó como bactericida si la relación MBC/MIC fue ≤ 4 , y como bacteriostático si fue > 4 .¹²⁵

5.5. Correlación de Pearson.

Para el análisis de correlación de Pearson, se consideraron las siguientes variables: contenido de polifenoles (P), contenido de flavonoides (F), rendimiento (Y), temperatura de síntesis (T), tamaño de cristalito (CS), tamaño hidrodinámico (HS), PDI, potencial zeta (ZP), zona de inhibición (ZOI) contra *S. aureus* (Sa) y *E. coli* (Ec), MIC contra *S. aureus* (Sa) y *E. coli* (Ec) y el tamaño de partícula (PS) por FESEM. Para verificar la validez del análisis, se verificó que los datos fueran continuos y que las variables presentaran una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

El análisis se interpretó en función del coeficiente de correlación de Pearson (r) y su nivel de significancia (p). Se consideraron valores de r cercanos a 1 o -1 como indicativos de una fuerte correlación positiva o negativa, respectivamente. Se consideró estadísticamente

significativo un valor de $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software IBM SPSS statistics versión 22.0 (GraphPad Software, IBM, San Diego, CA, USA).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO VI RESULTADOS

6. RESULTADOS.

6.1. Caracterización de los extractos acuosos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*.

6.1.1. Caracterización mediante FTIR.

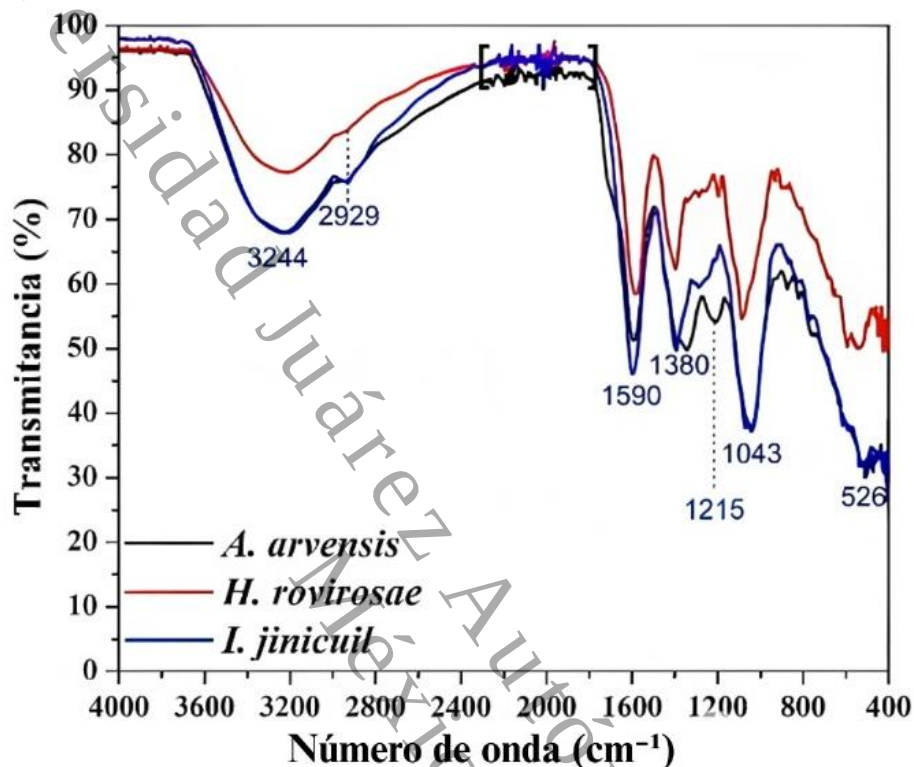


Figura 18. Espectros FTIR de los extractos acuosos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*.

Los espectros FTIR de los extractos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil* (Figura 18) mostraron bandas características en 3244, 2929, 1590, 1380, 1215, 1043 y 526 cm⁻¹. La banda ancha en 3244 cm⁻¹, más pronunciada en el extracto de *A. arvensis* e *I. jinicuil*, se atribuye al estiramiento O-H, característico de alcoholes y fenoles o agua adsorbida. En la región de 1260-1000 cm⁻¹, el pico en 1215 cm⁻¹, presente en *A. arvensis* pero menos pronunciado en *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, se asocia al estiramiento C-O de éteres o fenoles, mientras que la señal en 1043 cm⁻¹ corresponde muy probablemente al estiramiento C-O/C-O-C de alcoholes o éteres. Por otro lado, la señal en 1380 cm⁻¹, menos intensa en *H. rovirosae*, se relaciona con la flexión O-H en compuestos fenólicos. El pico intenso en 1590 cm⁻¹, más

prominente en *A. arvensis* e *I. jinicuil*, se relaciona con el estiramiento C=C de anillos aromáticos.

Las señales en 2929 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento asimétrico C-H de CH_2/CH_3 en alcanos, fueron más notorios en *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, lo que indica una mayor presencia de cadenas hidrocarbonadas en estos extractos. En la región de $900\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, las bandas atribuidas a vibraciones de flexión fuera del plano de C-H en anillos aromáticos fueron más intensas en el extracto de *I. jinicuil*. Finalmente, la señal en 526 cm^{-1} , mejor definida en *A. arvensis* e *I. jinicuil*, podría estar relacionada con vibraciones de enlaces C-H o C=C en compuestos aromáticos o más frecuente para estiramientos C-Cl.

6.1.2. Cuantificación de flavonoides, polifenoles y cloruros totales de los extractos.

El contenido de polifenoles en los extractos acuosos varió entre las tres plantas evaluadas (Tabla 3). Los valores más altos se observaron en *A. arvensis*, seguidos de *H. rovirosae* y, por último, *I. jinicuil*, el cual mostró diferencia estadística con el contenido de las otras dos especies ($p < 0.05$). En contraste, el contenido de flavonoides presentó una distribución diferente, siendo menor en *A. arvensis*, intermedio en *I. jinicuil* y más alto en *H. rovirosae*. Sin embargo, sus contenidos de flavonoides de las tres especies no tuvieron diferencias estadísticas.

Las concentraciones de iones cloruro (Cl^-) en los extractos de las plantas medicinales mostraron diferencias significativas entre las especies evaluadas. *A. arvensis* presentó la menor concentración, mientras que *H. rovirosae* mostró el valor más alto (Tabla 2).

Tabla 3. Concentración de polifenoles, flavonoides y de cloruros totales de los extractos acuosos de las plantas medicinales: *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*.

Planta	Polifenoles (mg EAG/g E)	Flavonoides (mg ER/g E)	Ion Cl^- (mmol/L)
<i>A. arvensis</i>	90.8 ± 6.0^a	75.8 ± 5.6^a	18.4 ± 0.5^a
<i>H. rovirosae</i>	85.6 ± 1.7^a	85.8 ± 1.4^a	31.6 ± 0.5^b
<i>I. jinicuil</i>	60.0 ± 3.9^b	80.3 ± 4.8^a	24.2 ± 0.7^c

Se presentan las medias $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0.05$); $n=3$.

6.2. Rendimiento de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP.

El rendimiento en la síntesis de AgNP varió significativamente entre las especies vegetales utilizadas (Tabla 4), con valores de $89.6 \pm 1.2\%$ para **Ag-Aa-500**, $75.7 \pm 5.2\%$ para **Ag-Hr-500** y $63.3 \pm 2.8\%$ para **Ag-Ij-500**, con diferencias estadísticamente significativas según el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

Por otro lado, el rendimiento en la síntesis de ZnO-NP mostró diferencias significativas dependiendo de la planta utilizada como agente reductor (Tabla 3). **ZnO-Aa-500** presentó el mayor rendimiento ($92.0 \pm 0.6\%$), mientras que **ZnO-Hr-500** y **ZnO-Ij-500** registraron valores menores, con $71.0 \pm 0.6\%$ y $76.6 \pm 1.2\%$, respectivamente.

Finalmente, el rendimiento en la síntesis de CuO-NP presentó variaciones entre las plantas empleadas como agentes reductores (Tabla 4). **Cu-Hr-500** mostró el mayor rendimiento ($87.5 \pm 1.6\%$), seguido de **Cu-Aa-500** ($82.4 \pm 1.2\%$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambas, pero fueron diferentes estadísticamente a **Cu-Ij-500** ($78.7 \pm 1.0\%$).

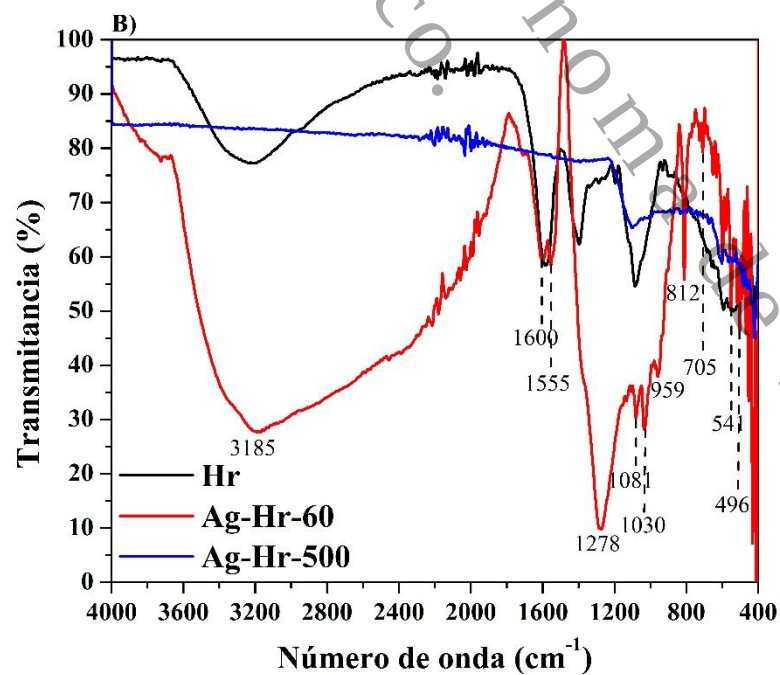
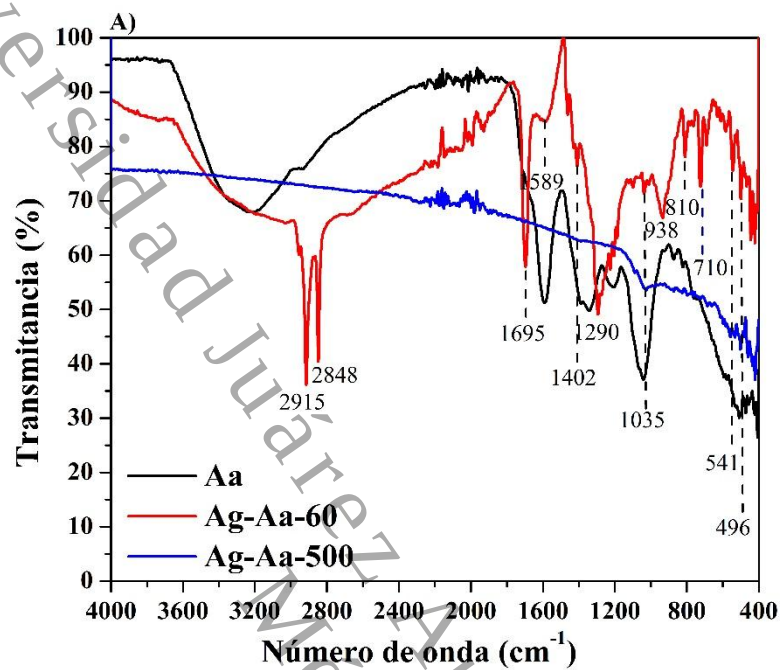
Tabla 4. Rendimiento de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.

NP	Rendimiento (%)	NP	Rendimiento (%)	NP	Rendimiento (%)
Ag-Aa-500	89.6 ± 1.2^a	Zn-Aa-500	92.0 ± 0.6^a	Cu-Aa-500	82.4 ± 1.2^a
Ag-Hr-500	75.7 ± 5.2^b	Zn-Hr-500	71.0 ± 0.6^b	Cu-Hr-500	87.5 ± 1.6^a
Ag-Ij-500	63.3 ± 2.8^c	Zn-Ij-500	76.6 ± 1.2^c	Cu-Ij-500	78.7 ± 1.0^b

Se presentan las medias $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0.05$); $n=3$.

6.3. Caracterización de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP.

6.3.1. Caracterización de las AgNP.



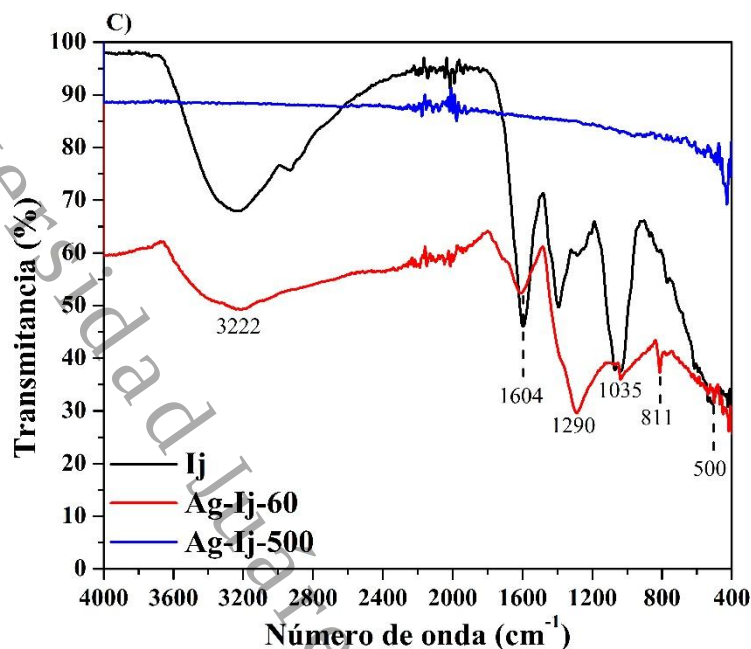


Figura 19. Espectros FTIR: (a) extracto de *A. arvensis* vs **Ag-Aa-60** vs **Ag-Aa-500** b) *H. rovirosae* vs **Ag-Hr-60** vs **Ag-Hr-500** y c) *I. jinicuil* vs **Ag-Ij-60** vs **Ag-Ij-500**.

Las **Ag-Aa-60** muestran bandas en 2915 y 2848 cm^{-1} , típicas del estiramiento C–H de grupos $-\text{CH}_2/-\text{CH}_3$ (Figura 19a). La banda intensa en 1695 cm^{-1} se atribuye al estiramiento vibracional del carbonilo C=O posiblemente de ácidos fenólicos, mientras que la banda en 1589 cm^{-1} corresponde probablemente a la vibración C=C del grupo aromático. El hombro a 1402 cm^{-1} se asocia al estiramiento simétrico $-\text{COO}^-$ de sales carboxilato; la señal en 1290 cm^{-1} refleja un estiramiento C–O de alcoholes fenólicos. Las bandas en 1035 $\rightarrow$ 838 $\rightarrow$ 810 cm^{-1} se asigna a vibraciones C–O–C/C–O y deformaciones fuera del plano C–H de anillos aromáticos; finalmente, la doblete 541/496 cm^{-1} (débil en la muestra a 60 °C) es atribuible a modos de vibración de la red cristalina de AgCl. Tras la calcinación, las bandas orgánicas (2915–1000 cm^{-1}) de **Ag-Aa-500** se atenúan drásticamente; y el doblete 541/496 cm^{-1} se vuelve evidente, lo que sugiere la formación de AgCl.

En **Ag-Hr-60** (Figura 19b) persiste la banda ancha 3185 cm^{-1} asociada al estiramiento O–H de alcoholes o agua adsorbida. Las dos bandas cercanas en 1609 y 1555 cm^{-1} indican vibraciones C=C del anillo aromático. La banda dominante a 1278 cm^{-1} corresponde a vibraciones C–O–C; mientras que el conjunto 1081, 1030 y 959 cm^{-1} representa C–O–C/C–

O. Los picos 812 y 705 cm^{-1} se asignan a deformaciones fuera del plano C–H, y de nuevo aparece el doblete 541/496 cm^{-1} como en **Ag-Aa-60**. En **Ag-Hr-500** desaparece la mayoría de las bandas orgánicas y solo se aprecia el doblete 541/496 cm^{-1} , lo que corrobora la conversión parcial a AgCl; el resto del espectro muestra la típica línea basal casi plana de materiales inorgánicos tras calcinación.

Para **Ag-Ij-60** (Figura 19c) se observa una banda ancha en 3222 cm^{-1} , típica de O–H, seguida de una banda en 1604 cm^{-1} atribuible a carbonilos, y de las señales en 1290 y 1035 cm^{-1} (estiramiento C–O) y 811 cm^{-1} (flexión C–H aromático). La muestra **Ag-Ij-500** conserva apenas un trazo débil en 1035 cm^{-1} y revela la banda en 500 cm^{-1} atribuida a la red Ag–Cl. Ello indica la eliminación casi total de recubrimientos orgánicos y la aparición de dominios AgCl, concordante con los otros sistemas calcinados.

En general, las AgNP a 60 °C retienen bandas entre 3200–1000 cm^{-1} , confirmando la presencia de metabolitos secundarios, mientras que la calcinación a 500 °C elimina dichas bandas y refuerza el doblete en 541/496 cm^{-1} ($450 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ en la literatura), característicos de AgCl.

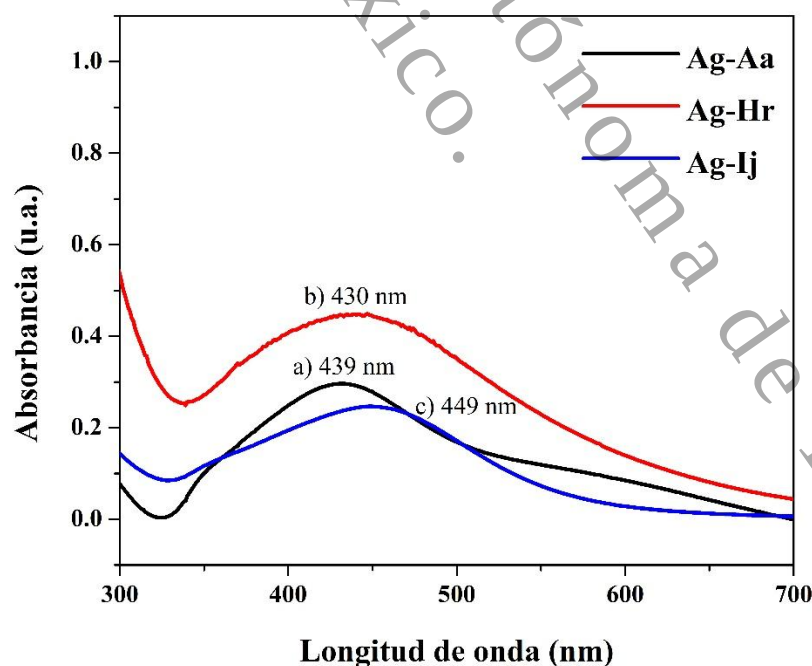


Figura 20. Espectro de UV-Vis de las AgNP obtenidas mediante el extracto de plantas medicinales.

Los espectros UV-Vis (Figura 20) obtenidos muestran una banda de absorción característica en la región visible, atribuida a la resonancia del plasmon para las AgNP. En las NP obtenidas con extracto de *H. rovirosae* (**Ag-Hr**), la mayor absorbancia se registró a 430 nm, mientras que en las NP obtenidas con extracto de *A. arvensis* (**Ag-Aa**) y de *I. jinicuil* (**Ag-Ij**), los picos se observaron a 439 nm y 449 nm, respectivamente. Asimismo, se identificaron diferencias en la intensidad de la señal, siendo la de mayor intensidad las NP de **Ag-Hr**.

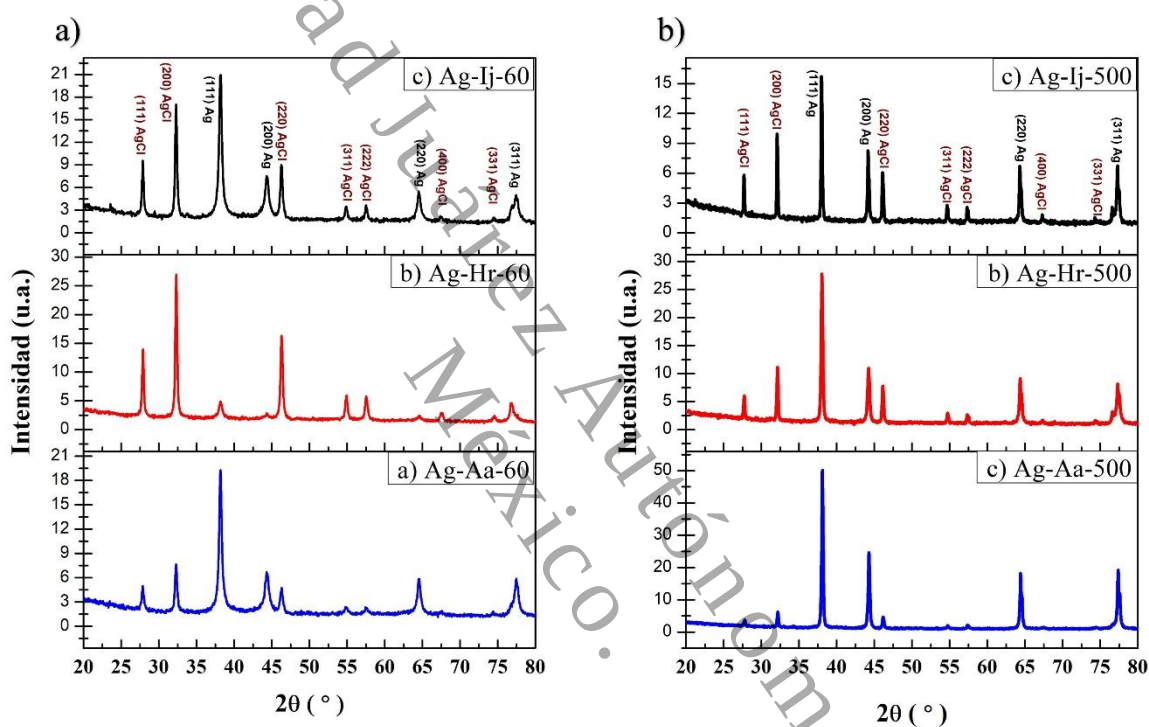


Figura 21. Patrones de DRX de AgNP sintetizadas con los extractos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).

El análisis de DRX confirmó la formación de AgNP cristalinas con estructura cúbica centrada en las caras evidenciada por los picos característicos en 2θ de 38.14° , 46.27° , 64.6° y 77.4° (Figura 21), correspondientes a los planos de Bragg (111), (200), (220) y (311), respectivamente. Además, en algunas muestras se detectaron señales secundarias atribuibles a AgCl en valores de 2θ de 27.85° , 32.28° , 44.36° , 54.88° , 57.63° , 67.56° y 74.49° , que fueron atribuidos a los planos (111), (200), (220), (311), (222), (400) y (331). Estos patrones

corresponden a los números de referencia PDF del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) #00-004-0783 para Ag y PDF #01-071-5209 para AgCl.

Las muestras calcinadas a 500 °C mostraron picos más definidos y pronunciados, indicando un aumento en el tamaño de los cristallitos y una mayor cristalinidad (Figura 21b). Las reflexiones más intensas de plata metálica (Ag⁰) en las muestras **Ag-Ij-500** y **Ag-Hr-500** sugieren una mayor proporción de Ag⁰ en relación con AgCl, mientras que en las **Ag-Aa-500** los picos de AgCl fueron de baja intensidad.

Usando la ecuación de Scherrer, se estimaron tamaños de cristallito de Ag⁰ que variaron de 12 a 21 nm a 60 °C y de 40 a 51 nm a 500 °C, calculados a partir de la reflexión (111) de Ag⁰. Además de que los tamaños para AgCl variaron entre 28 y 34 nm a 60 °C, estimados a partir de la reflexión (200) de AgCl, aumentando de 46 a 60 nm tras la calcinación (Tabla 5).

Tabla 5. Estimación del tamaño teórico de cristallito mediante ecuación de Scherrer.

AgNP (60 °C)	Tamaño de cristallito (nm)	AgNP (500 °C)	Tamaño de cristallito (nm)
Ag-Aa-60	12	Ag-Aa-500	45
Ag-Hr-60	16	Ag-Hr-500	40
Ag-Ij-60	21	Ag-Ij-500	51
*Ag-Aa-60	28	*Ag-Aa-500	46
*Ag-Hr-60	34	*Ag-Hr-500	48
*Ag-Ij-60	32	*Ag-Ij-500	60

*Tamaño de cristallito asociado a la fase AgCl en las muestras.

Se empleó DLS para evaluar el tamaño hidrodinámico y el PDI de las AgNP en solución acuosa. Las muestras secadas a 60 °C exhibieron distribuciones de tamaño relativamente homogéneas, con rangos de 10 a 400 nm. Las muestras **Ag-Aa-60** y **Ag-Ij-60** mostraron distribuciones bimodales, con dos picos distintos, uno menos intenso representando tamaños de 7 a 35 nm, y un pico más pronunciado que abarca de 37 a 400 nm. En contraste, las NP calcinadas presentaron distribuciones monodispersas, aunque los tamaños de partícula variaron según el extracto de planta. Las partículas más pequeñas se observaron en la muestra

Ag-Ij-500, con un rango de 106 a 190 nm, mientras que las partículas más grandes se encontraron en **Ag-Hr-500**, con tamaños entre 459 y 712 nm (Figura 22).

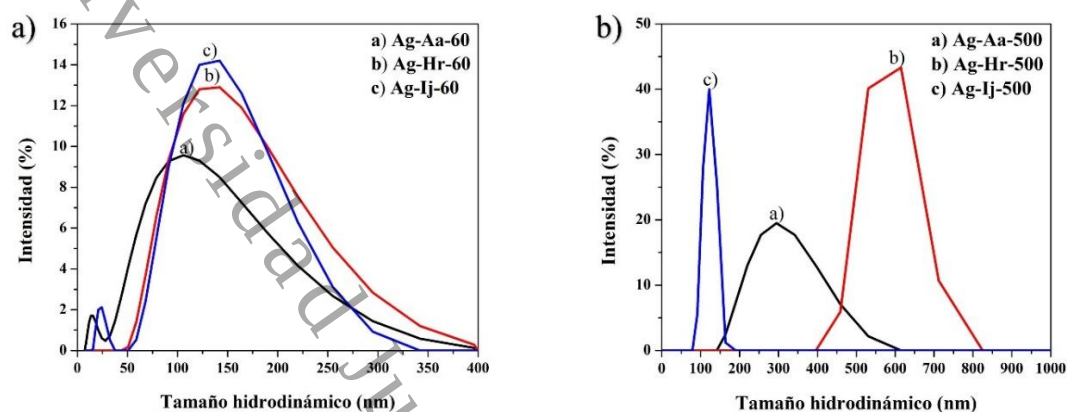


Figura 22. Distribución del tamaño hidrodinámico de las AgNP sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).

Los tamaños hidrodinámicos promedio fueron de 77.6 ± 3.3 nm para **Ag-Aa-60** y 127.2 ± 0.9 nm para **Ag-Hr-60** (Tabla 6). En contraste, las NP calcinadas mostraron distribuciones de tamaño más amplias, desde 140.6 ± 18.2 nm para **Ag-Ij-500** hasta 582.7 ± 65.1 nm para **Ag-Hr-500**. Esta variabilidad se reflejó en un PDI que sugieren una tendencia hacia la monodispersidad, con valores de 0.271 para **Ag-Hr-60** y 0.369 para **Ag-Ij-60**, mientras que las muestras calcinadas exhibieron un PDI de 0.349 para **Ag-Aa-500** y un marcado aumento en la polidispersidad para **Ag-Hr-500** (0.635).

Tabla 6. Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de las AgNP obtenidas mediante extractos de plantas medicinales.

NP	Tamaño hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Ag-Aa-60	77.6 ± 3.25	0.425	-16.7 ± 0.7
Ag-Hr-60	127.2 ± 0.86	0.271	-18.9 ± 1.8
Ag-Ij-60	121.4 ± 3.10	0.369	-18.9 ± 0.8
Ag-Aa-500	348.9 ± 10.7	0.349	-20 ± 3.3
Ag-Hr-500	582.7 ± 65.1	0.635	-14.3 ± 0.6
Ag-Ij-500	140.6 ± 18.2	0.565	-14.7 ± 0.9

Las mediciones de potencial zeta indicaron que todas las muestras mantuvieron cargas negativas, con valores entre -16.7 ± 0.7 a -18.9 ± 1.8 mV para las tratadas a 60°C , y de -14.3 ± 0.6 a -20.0 ± 3.3 mV para las muestras calcinadas (Tabla 6).

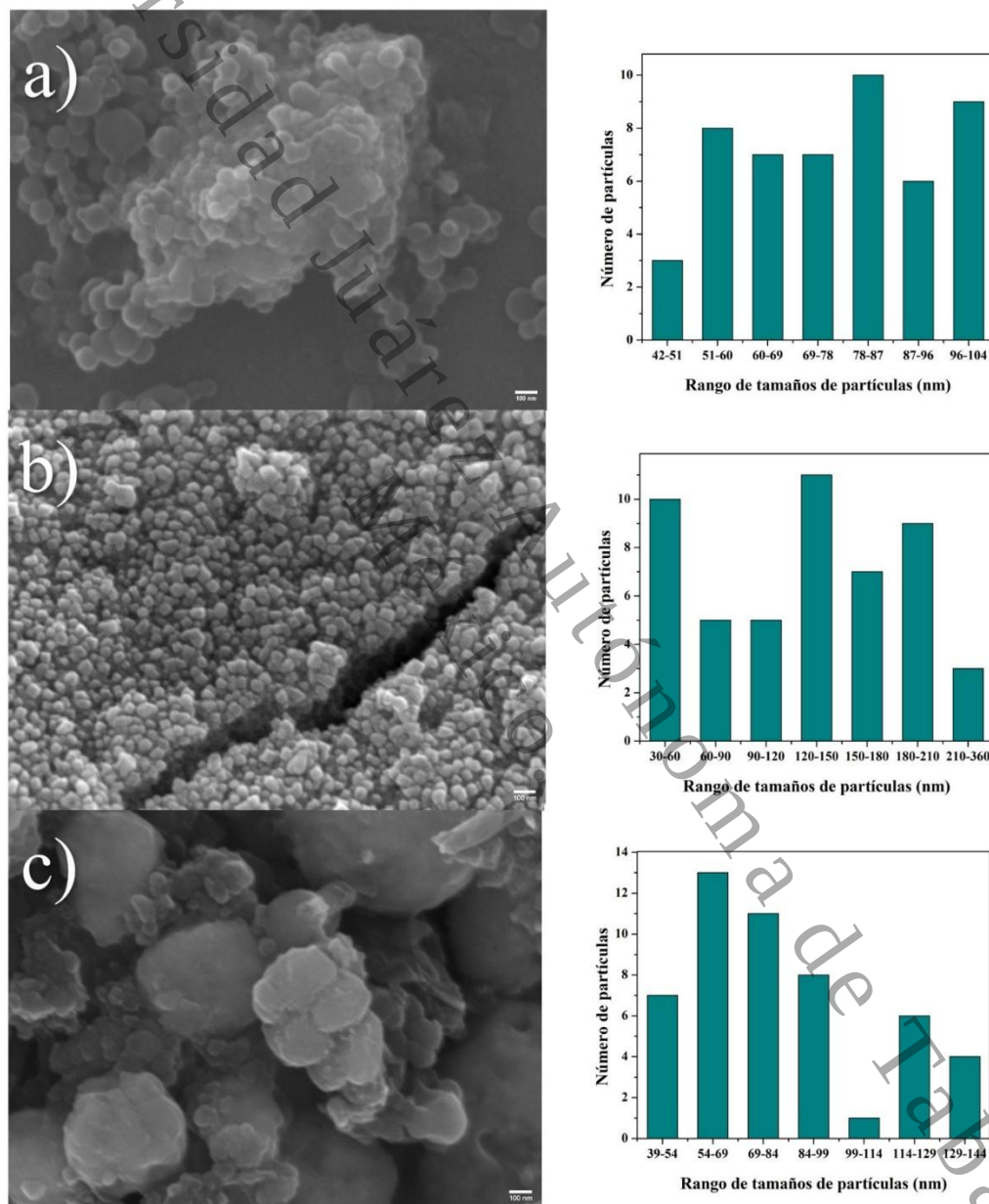


Figura 23a. Micrografías FESEM de las AgNP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. a) Ag-Aa-60, b) Ag-Hr-60 y c) Ag-Ij-60.

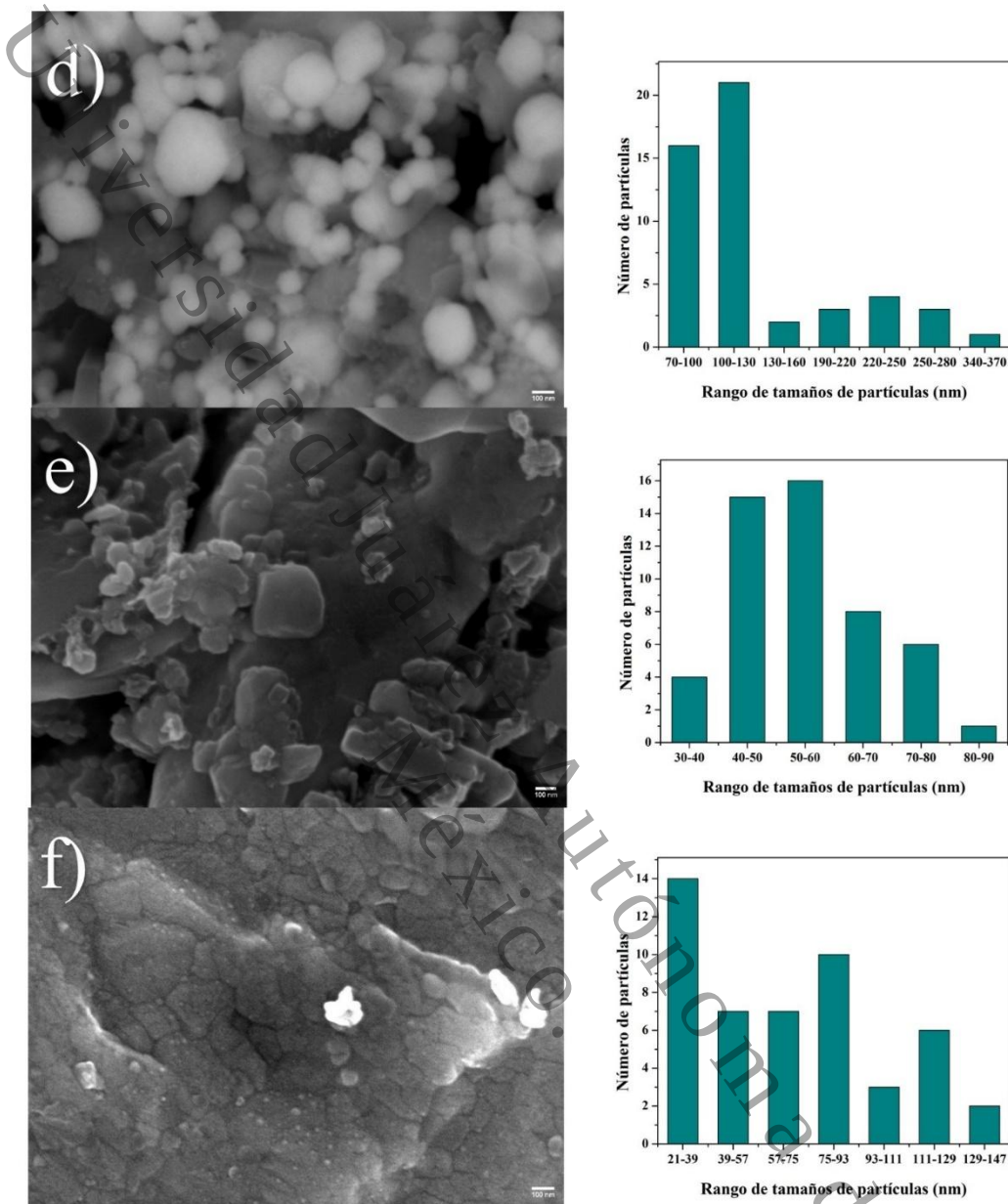


Figura 23b. Micrografías FESEM de las AgNP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. d) **Ag-Aa-500**, e) **Ag-Hr-500** y f) **Ag-Ij-500**.

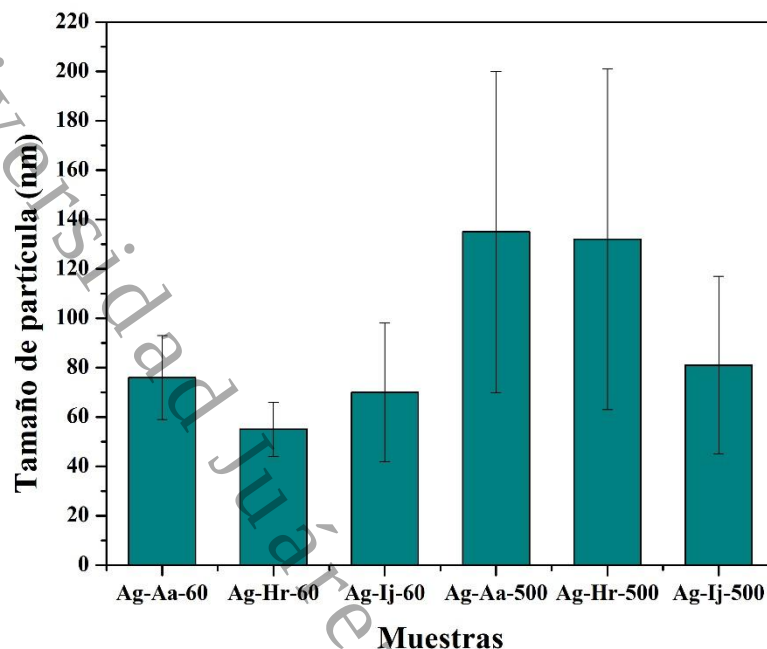


Figura 24. Comparación del tamaño promedio de las AgNP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.

El análisis por FESEM mostró que las AgNP obtenidas a 60 ° presentan predominantemente morfología cuasiesférica a esférica, con partículas relativamente bien definidas y distribuidas sobre la superficie, formando agregados moderados característicos de NP metálicas sintetizadas por biosíntesis. En dichas muestras se observa una tendencia a la formación de aglomerados tipo “racimo”, constituidos por nanopartículas individuales de tamaño nanométrico que mantienen, en su mayoría, sus contornos distinguibles siendo **Ag-Ij-60** la de mayor dispersión de tamaño según FESEM. El análisis de tamaño indicó un tamaño medio de 76 ± 17 nm para **Ag-Aa-60**, 55 ± 11 nm para **Ag-Hr-60** y 70 ± 28 nm para **Ag-Ij-60** (Figura 23a y 24).

En contraste, las muestras calcinadas a 500 °C muestran cambios morfológicos evidentes asociados al tratamiento térmico. Las NP presentan mayor grado de aglomeración y coalescencia, formando agregados de mayor tamaño y con contornos menos definidos. En estas condiciones, la morfología deja de ser predominantemente esférica y se vuelve más heterogénea e irregular. Particularmente en **Ag-Hr-500** se observa una morfología heterogénea, donde coexisten estructuras con geometrías irregulares y bordes definidos,

semejantes a placas o prismas, junto con agregados de NP más pequeñas adheridas a estas superficies mientras que **Ag-Aa-500** muestran tamaños más disperso según FESEM. Este comportamiento sugiere procesos de sinterización parcial y crecimiento cristalino inducidos por la calcinación, lo que favorece la formación de partículas de mayor tamaño y estructuras más compactas. Como resultado de estos procesos, el tamaño promedio de partícula aumentó significativamente tras la calcinación, alcanzando 135 ± 65 nm para **Ag-Aa-500**, 132 ± 69 nm para **Ag-Hr-500** y 81 ± 36 nm para **Ag-Ij-500** (Figura 23b y 24).

Tabla 7. Composición elemental de las AgNP (60°C y 500°C) determinada mediante EDS.

	Ag-Aa-60	Ag-Hr-60	Ag-Ij-60	Ag-Aa-500	Ag-Hr-500	Ag-Ij-500
Elemento	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p
C	3.60	15.9	21	5.0	5.8	3.2
O	27.8	8.5	21	16.8	12.7	0
Cl	5.62	13.6	6.7	5.2	9.3	0.5
Ag	62.98	62	51.3	73	72.2	96.3

El análisis EDS determinó la composición elemental de las AgNP. En las muestras tratadas a 60 °C, el contenido de Ag varió de 51 a 63 %p/p, mientras que después de la calcinación, el contenido de Ag aumentó significativamente, alcanzando valores de hasta 96 %p/p. Además, se detectaron cantidades variables de C y O, con niveles más altos de C en **Ag-Ij-60** y mayores niveles de O en **Ag-Aa-60** (Tabla 7).

Tras la calcinación, el contenido de O disminuyó significativamente, sin detectarse en **Ag-Ij-500**, mientras que el contenido de C se mantuvo consistentemente bajo, sin superar el 5.8 %p/p. Las variaciones en el contenido de Cl también fueron significativas. En las NP secadas a 60 °C, osciló entre 5.6 y 13.6 %p/p, mientras que en las calcinadas disminuyó, con valores que van de 0.5 a 9.3 %p/p. La presencia de Cl se relaciona con la formación de compuestos de AgCl como lo indican los resultados de FTIR y DRX (Tabla 7).

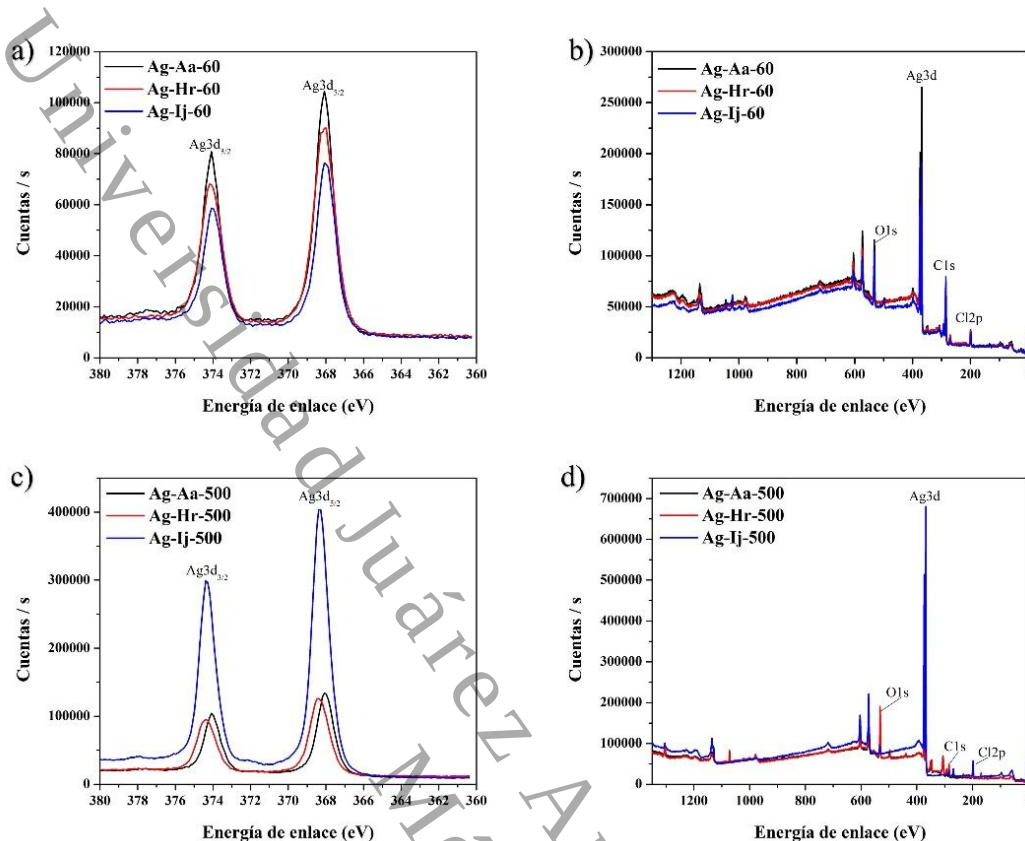


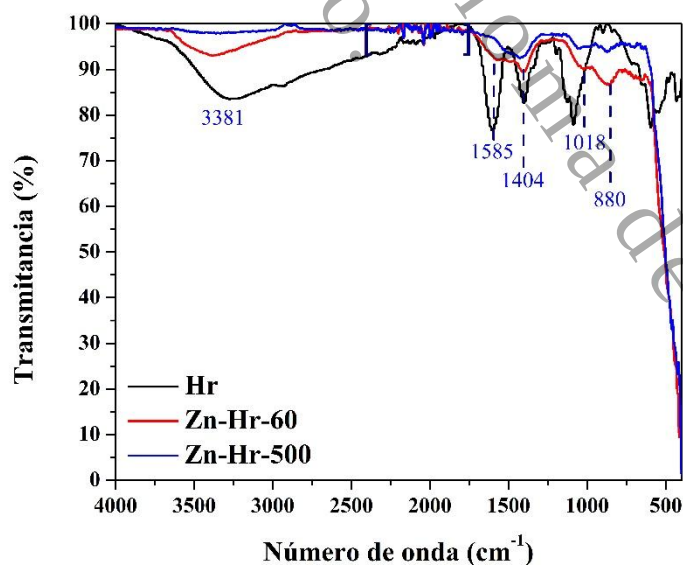
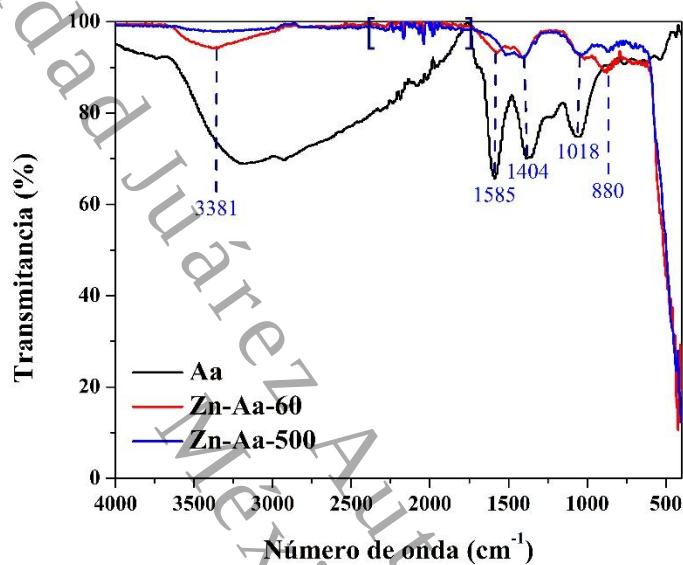
Figura 25. Espectros XPS de AgNP sintetizadas utilizando extractos de plantas medicinales. Espectros de alta resolución de Ag 3d a) 60 °C y c) 500 °C. Espectros de barrido general b) 60 °C y d) 500 °C.

Los espectros Ag 3d (Figura 25a,c) presentan picos a 368.2 eV y 374.2 eV con una separación spin-órbita de 6.0 eV y FWHM $\approx$ 0.8 eV, característicos de Ag^0 . La posible contribución de AgCl (Ag^+ , $3d_{5/2} \approx 367.7$ eV) queda enmascarada por la escasa separación energética (< 0.6 eV) y su baja fracción superficial con respecto a las señales de la Ag^0 , aun cuando FTIR muestra la banda $\nu(\text{Ag-Cl}) \approx 545 \text{ cm}^{-1}$ y DRX exhibe reflexiones (111), (200), (220) de AgCl.

El análisis C 1s corrobora la evolución observada en FTIR: en los sólidos secados a 60 °C predominan las señales 284.8 eV (C–C/C–H), 286.2 eV (C–O) y 287.9 eV (C=O), coherentes con las bandas 2920–2850, 1030 y 1695 cm^{-1} asociadas a compuestos fenólicos. La señal O 1s centrada en 532 eV (Figura 25b,d) se asocia principalmente a grupos carbonilo/hidroxilo de las moléculas orgánicas que recubren la superficie, mientras que el pico Cl 2p_{3/2} en 198.0 eV es coherente con Cl^- ligado a la formación de AgCl (Figura 25b,d).

Tras la calcinación la intensidad relativa de C 1s disminuye, especialmente las especies oxigenadas, mientras que O 1s también se reduce. Estos cambios confirman la descomposición de los agentes orgánicos de recubrimiento y la exposición de una superficie esencialmente inorgánica constituida por Ag^0 con una delgada capa AgCl .

6.3.2. Caracterización de las ZnO-NP.



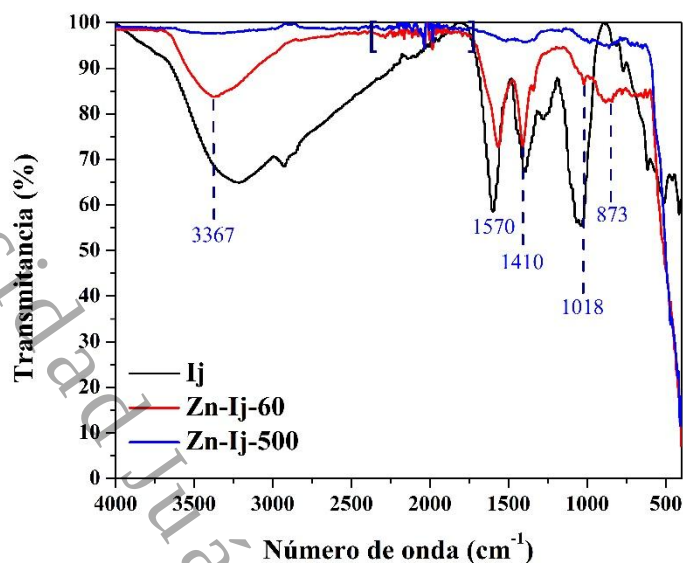


Figura 26. Espectros FTIR: (a) extracto de *A. arvensis* vs Zn-Aa-60 vs Zn-Aa-500 b) *H. rovirosae* vs Zn-Hr-60 vs Zn-Hr-500 y c) *I. jinicuil* vs Zn-Ij-60 vs Zn-Ij-500.

Los espectros FTIR de las ZnO-NP (Figura 26) muestran diferencias claras entre los tratamientos a 60 y 500 °C. En los sólidos secados a 60 °C se observa una banda ancha en 3360-3380 cm^{-1} , atribuida al estiramiento O–H de grupos hidroxilo superficiales o agua adsorbida; su marcada disminución tras la calcinación a 500 °C confirma la deshidroxilación de la superficie.

Las bandas dobles en 1580-1560 cm^{-1} y 1410-1400 cm^{-1} se asignan a carboxilatos unidos débilmente a la superficie; la diferencia $\Delta\nu \approx 160 \text{ cm}^{-1}$ es consistente con un modo de coordinación monodentado, aunque también puede solaparse por vibraciones C=C aromáticas. Su desaparición después de 500 °C evidencia la eliminación casi total de residuos orgánicos del extracto.

La señal a 1010-1020 cm^{-1} se asocia al estiramiento C–O/C–O–C de alcoholes o ésteres del extracto, mientras que la banda a 870-880 cm^{-1} corresponde al estiramiento fuera del plano de C–H de anillos aromáticos; esta última es más clara en *I. jinicuil* y *H. rovirosae*, y menos definida o ausente en *A. arvensis*, pero en todos los casos se atenúa con la calcinación. No obstante, en las muestras a 500°C se atenúa o se pierde.

Finalmente, todos los espectros presentan una banda ancha e intensa por debajo de 500 cm^{-1} (máximo alrededor de $430\text{-}480\text{ cm}^{-1}$) atribuida al modo vibracional del Zn–O de la red wurtzita, cuya mayor nitidez tras $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ respalda la formación de ZnO más cristalino.

En conjunto, el tratamiento térmico a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ elimina grupos orgánicos residuales, deshidroxila la superficie y favorece la cristalinidad del ZnO, mientras que las muestras preparadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ conservan ligandos del extracto.

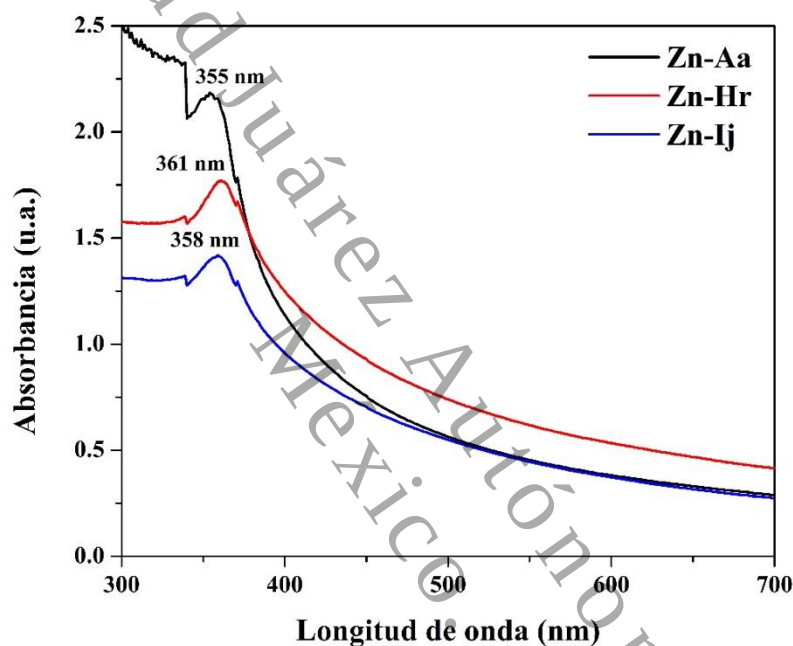


Figura 27. Espectros UV-Vis de las ZnO-NP sintetizadas con extractos de plantas medicinales.

Los espectros UV-Vis (Figura 27) obtenidos muestran una banda de absorción característica en la región ultravioleta, atribuida a las transiciones electrónicas propias del ZnO. En las NP obtenidas con extracto de *A. arvensis* (Zn-Aa), el máximo de absorbancia se registró a 355 nm, mientras que en las NP obtenidas con extracto de *H. rovirosae* (Zn-Hr) y las NP obtenidas con extracto de *I. jinicuil* (Zn-Ij), los picos se observaron a 361 nm y 358 nm, respectivamente. Asimismo, se identificaron diferencias en la intensidad de la señal, siendo la muestra Zn-Hr la que presentó la mayor absorbancia relativa en la región analizada. En

conjunto, los espectros muestran un perfil de absorción típico del ZnO, con una disminución progresiva de la absorbancia hacia la región visible.

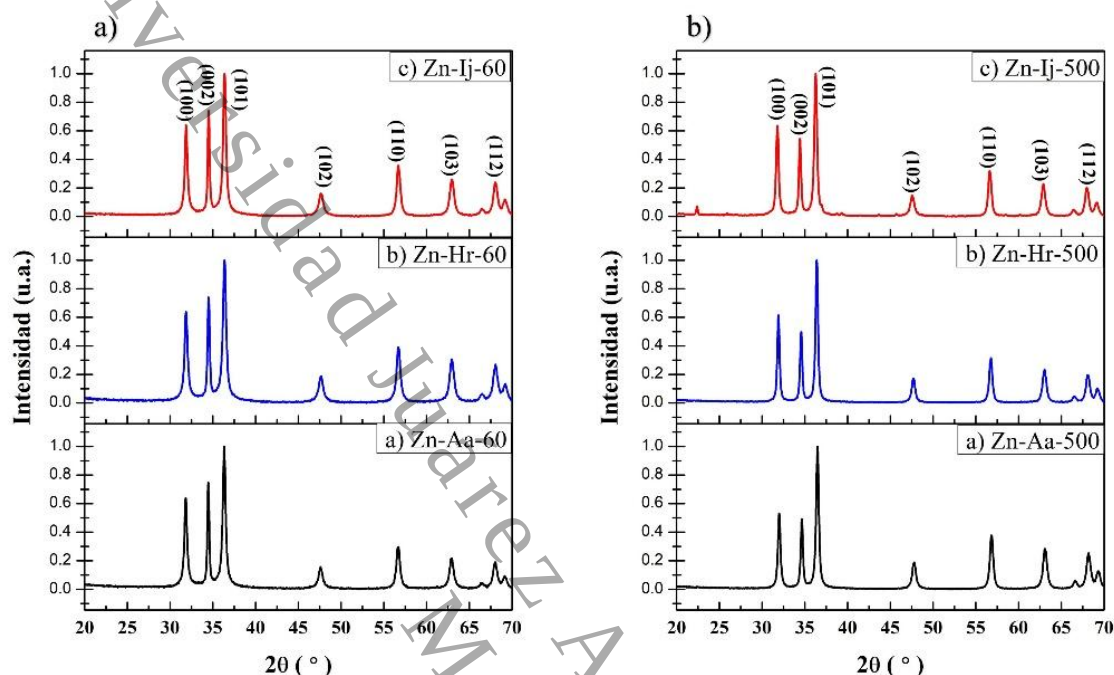


Figura 28. Patrones de DRX de ZnO-NP sintetizadas utilizando extractos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).

En el análisis de DRX de las ZnO-NP (Fig. 28), los difractogramas confirman una estructura cristalina hexagonal tipo wurtzita, característica del ZnO. Los picos más intensos se encuentran en posiciones de ángulo 2θ en 31.7°, 34.4°, 36.2°, 47.5°, 56.6°, 62.8°, y 67.9°, correspondientes a los planos de Miller (100), (002), (101), (102), (110), (103) y (112), respectivamente (PDF 01-082-9745). A 60 °C, las muestras sintetizadas con extracto de *I. jinicuil* presentan picos de difracción mejor definidos en comparación con **Zn-Aa-60** y **Zn-Hr-60**, lo que sugiere un mayor tamaño de cristalito. No obstante, el tratamiento térmico a 500 °C promueve el crecimiento del cristalito en todas las muestras, observándose el mayor tamaño en **Zn-Hr-500**. Es importante destacar que el plano (002) presenta una mayor intensidad relativa en las muestras secadas a 60 °C en comparación con aquellas tratadas a 500 °C. Este comportamiento sugiere una orientación preferencial de los cristalitos en las condiciones de menor temperatura.

En contraste, el tratamiento térmico a 500 °C, aunque favorece el crecimiento del tamaño de cristalito, tiende a reducir esta orientación preferencial, promoviendo un crecimiento más isotrópico de los dominios cristalinos. En concordancia con este comportamiento, el tamaño de cristalito estimado mediante la ecuación de Scherrer fue de 20-23 nm para las ZnO secadas a 60 °C y de 24-27 nm en las tratadas a 500 °C (Tabla 8).

Tabla 8. Estimación del tamaño teórico de cristalito mediante ecuación de Scherrer.

ZnO-NP (60 °C)	Tamaño de cristalito (nm)	ZnO-NP (500 °C)	Tamaño de cristalito (nm)
Zn-Aa-60	22.39	Zn-Aa-500	24.53
Zn-Hr-60	20.36	Zn-Hr-500	26.88
Zn-Ij-60	22.56	Zn-Ij-500	24.00

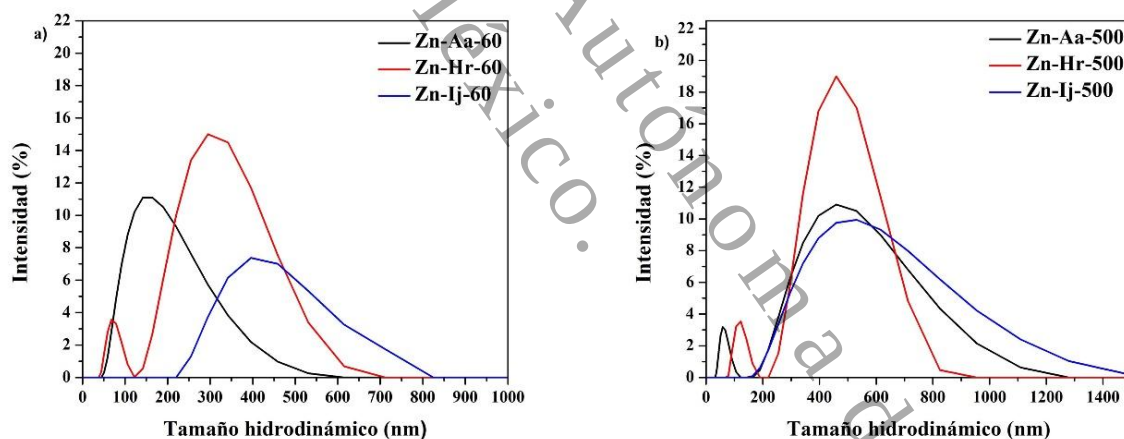


Figura 29. Distribución del tamaño hidrodinámico de las ZnO-NP sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales, secadas a 60 °C (a) y calcinadas a 500 °C (b).

Los gráficos de DLS (Figura 29) muestran la distribución del tamaño hidrodinámico de las ZnO-NP y el efecto del tratamiento térmico. En la Figura 29a, correspondiente a muestras secadas a 60°C, se observa que **Zn-Aa-60** presenta un rango de tamaño hidrodinámico de 50-600 nm, con un pico alrededor de 150 nm. Por otro lado, las NP **Zn-Hr-60** muestran mayor concentración de partículas entre 200-400 nm, mientras que las **Zn-Ij-60** alcanzan una

distribución desplazada hacia tamaño de hasta 800 nm. En la Figura 29b correspondiente a muestras calcinadas, se observa un desplazamiento general hacia tamaño mayores. **Zn-Aa-500** se distribuyen en un rango amplio, superando los 1000 nm, mientras que las de **Zn-Hr-500** muestran un pico principal en 400-800 nm, y **Zn-Ij-500** mantiene una distribución más amplia con partículas que superan los 1100 nm. En general, el tratamiento térmico a 500 °C induce un aumento en el tamaño hidrodinámico en todas las muestras.

Tabla 9. Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de las ZnO-NP obtenidas mediante extractos de plantas medicinales.

NP	Tamaño	PDI	Potencial zeta (mV)
	hidrodinámico (nm)		
Zn-Aa-60	153 ± 2.1	0.246	-16.2 ± 0.8
Zn-Hr-60	399 ± 75.6	0.513	-10.0 ± 2.6
Zn-Ij-60	259 ± 58.6	0.373	-17.5 ± 3.4
Zn-Aa-500	451 ± 34.7	0.349	-6.0 ± 1.2
Zn-Hr-500	530 ± 84.6	0.472	-5.0 ± 1.3
Zn-Ij-500	744 ± 118.7	0.585	-3.0 ± 1.3

La Tabla 9 muestra los valores promedio de tamaño hidrodinámico, el PDI y el potencial zeta de las ZnO-NP sintetizadas. En el tratamiento a 60°C, el tamaño hidrodinámico varió entre 153 ± 2.1 nm para **Zn-Aa-60**, 399 ± 75.6 nm para **Zn-Hr-60** y 259 ± 58.6 nm para **Zn-Ij-60**. El PDI mostró importantes diferencias, con valores de 0.246 en **Zn-Aa-60** y 0.513 en **Zn-Hr-60**, lo que indica una distribución de tamaño hidrodinámico más homogénea en la primera y una mayor dispersión en la segunda. Los valores de potencial zeta reflejan una estabilidad coloidal moderada, con valores que van desde -17.5 ± 3.4 mV para **Zn-Ij-60**, hasta -10.0 ± 2.6 mV para **Zn-Hr-60**.

En comparación, las muestras calcinadas (Figura 29b) muestran un aumento en el tamaño hidrodinámico de 451 ± 34.7 nm para **Zn-Aa-500**, 530 ± 84.6 nm para **Zn-Hr-500** y 744 ± 118.7 nm para **Zn-Ij-500**. El PDI incrementa en todas las muestras, especialmente en **Zn-Ij-500** (0.585), sugiriendo una amplia y menos uniforme distribución de tamaño hidrodinámico. Además, el potencial zeta disminuyó en su valor de entre 3 a 6 para todas las muestras de ZnO, lo que refleja baja estabilidad electrostática y una alta tendencia a la agregación.

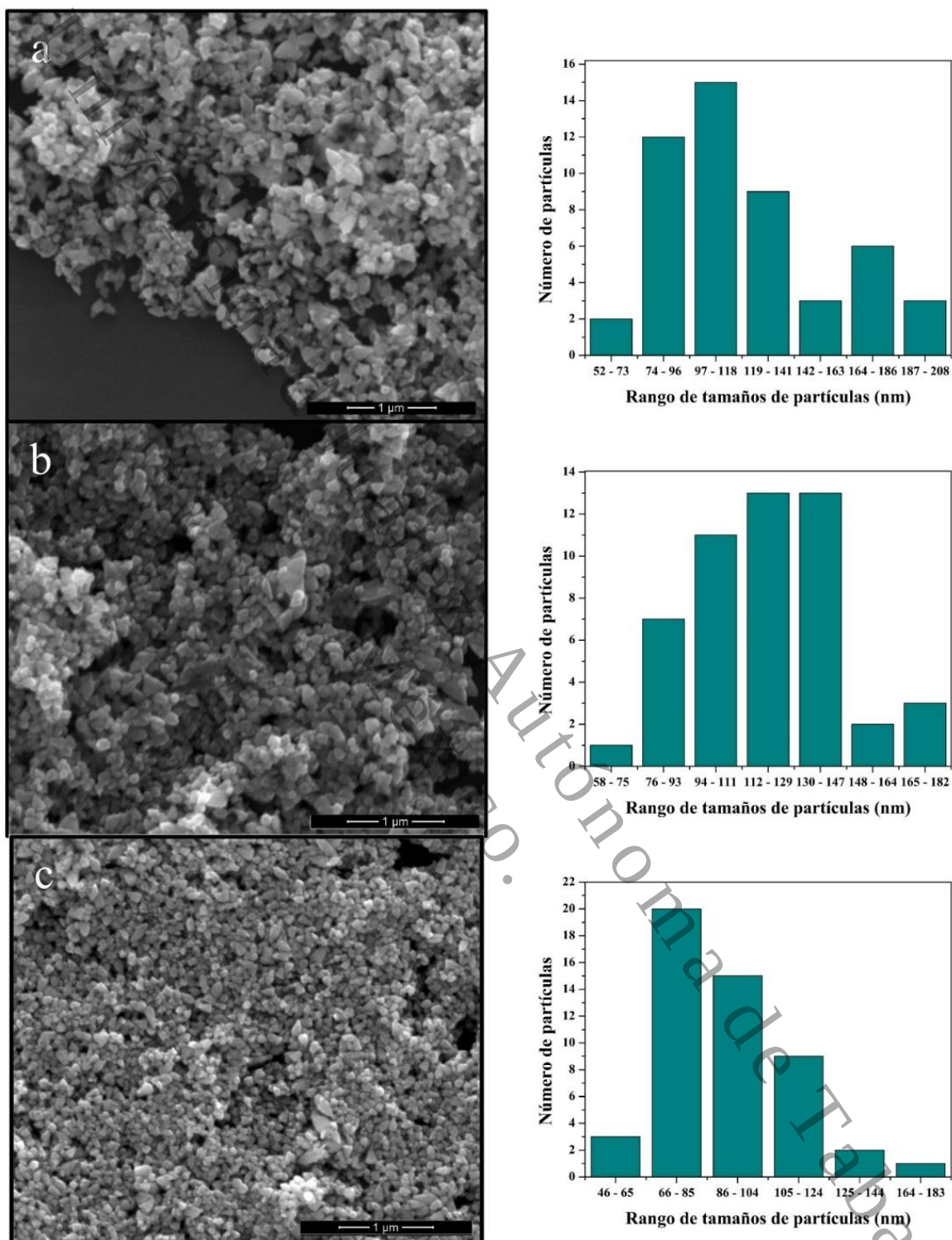


Figura 30a. Micrografías FESEM de las ZnO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. a) Zn-Aa-60, b) Zn-Hr-60 y c) Zn-Ij-60.

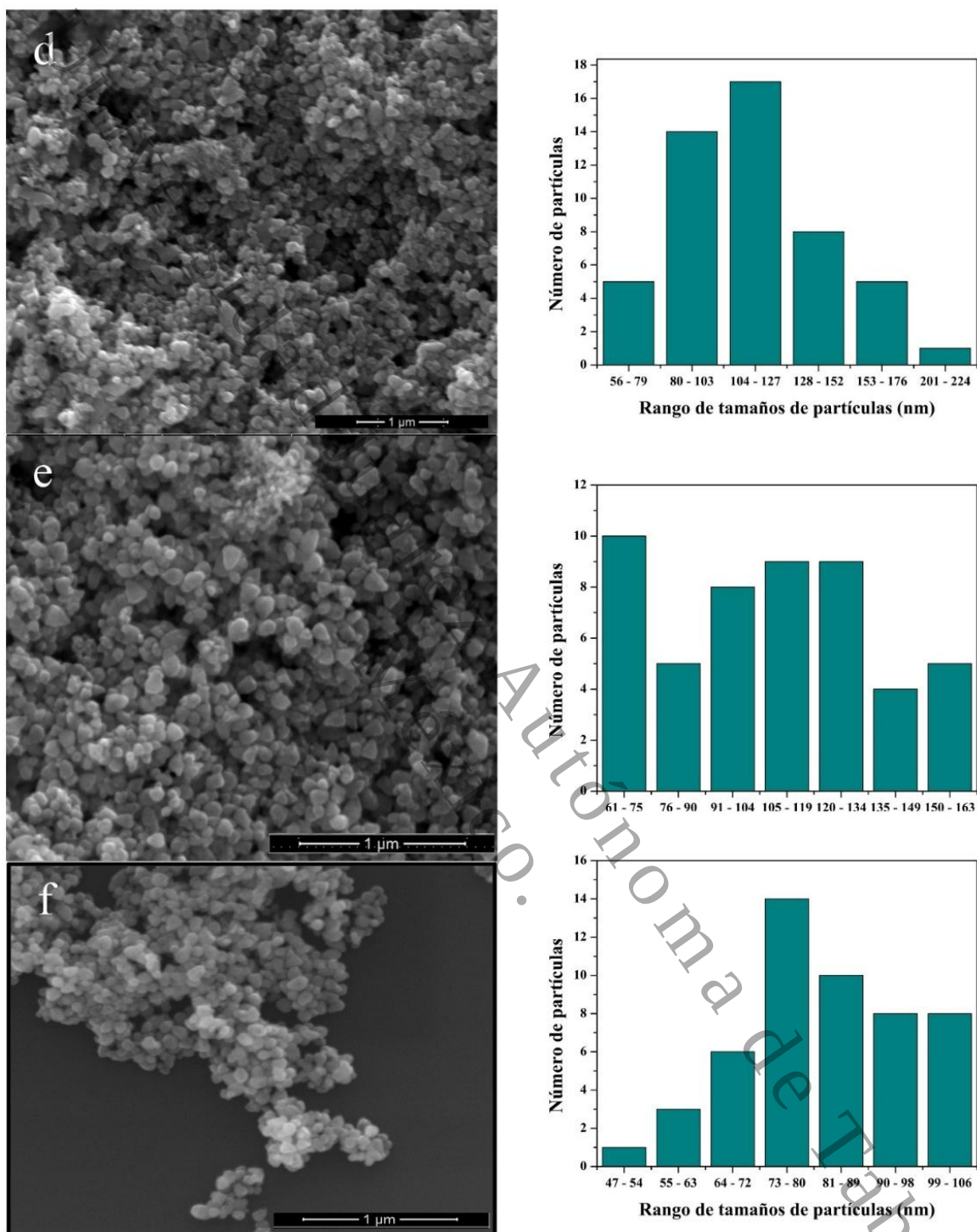


Figura 30b. Micrografías FESEM de las ZnO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. d) Zn-Aa-500, e) Zn-Hr-500 y f) Zn-Ij-500.

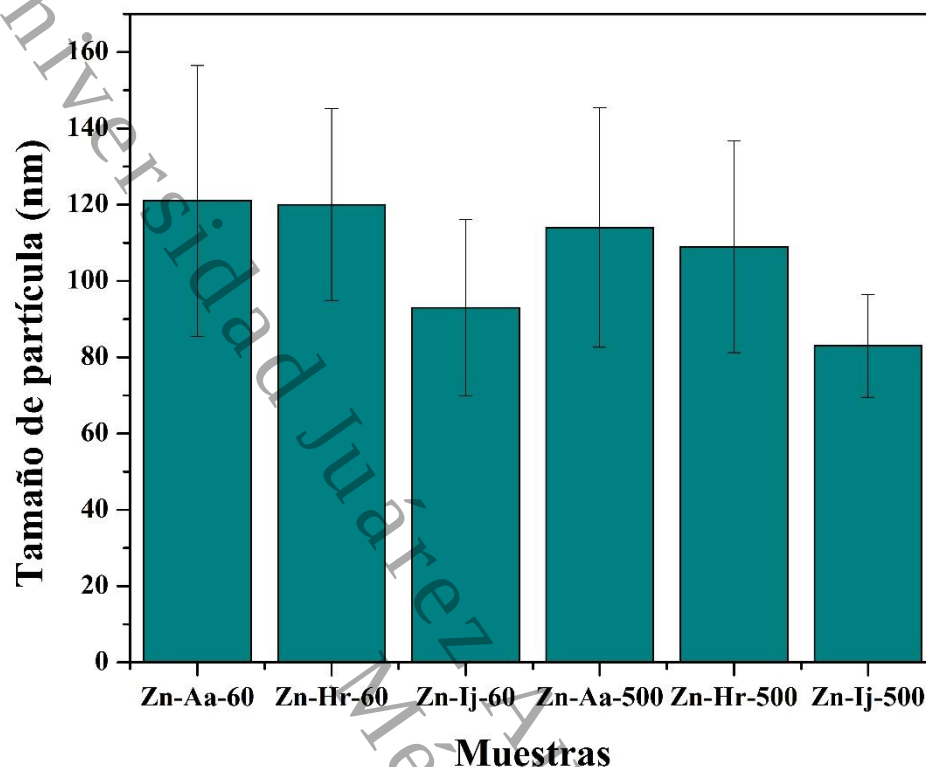


Figura 31. Comparación del tamaño promedio de las ZnO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.

Las micrografías FESEM muestran cómo el extracto vegetal empleado cambia de forma notable la morfología y el tamaño de las ZnO-NP obtenidas a 60 °C (Figura 30a). En la imagen la muestra **Zn-Aa-60**, se observa un conjunto nanocristales en forma de “racimos”. El histograma asociado revela una distribución amplia (52–208 nm), lo que indica una distribución de tamaño heterogénea. Para el caso de la muestra **Zn-Hr-60**, exhibe agregados más compactos de NP cuasiesféricas, con una superficie densamente cubierta por partículas de tamaño relativamente uniforme. Su distribución va de 58 a 182 nm, pero la mayoría se concentra entre 94 y 129 nm, indicando un crecimiento más controlado y, por tanto, una dispersidad intermedia. En **Zn-Ij-60**, la superficie se cubre casi por completo con nanogránulos cuasiesféricos densamente empaquetados. El rango global de tamaño (46–183 nm) se desplaza hacia tamaño menores y el pico principal se sitúa entre 66 y 85 nm; después de los 125 nm la frecuencia disminuye bruscamente.

En cambio, las micrografías FESEM correspondientes al tratamiento de 500 °C (Figura 30b) confirman que la calcinación modifica tanto el empaquetamiento como la distribución de tamaños de las ZnO-NP obtenidas con cada extracto vegetal.

La muestra **Zn-Aa-500** se presenta como capa densa y continua de cristalitos de caras definidas que tienden a coalescer entre sí; persisten espacios intercristalinos reducidos. El histograma abarca de 56 a 224 nm; los extremos hacia tamaños altos revelan que una fracción de las partículas presentó un crecimiento por coalescencia durante la calcinación. Para **Zn-Hr-500** la superficie se cubre de nanocristales cuasiesféricos, bien definidos y más individualizados que a 60 °C. Su rango va de 61 a 163 nm, con una frecuencia relativamente uniforme entre 105 y 134 nm. La distribución de tamaños fue ligeramente más estrecha que la observada en **Zn-Aa-500**, sugiriendo un crecimiento más controlado. Finalmente, **Zn-Ij-500** conserva una morfología granular, pero con agregados de baja densidad que forman agrupaciones ramificadas (o *clústers*). El histograma se restringe a 47–106 nm, la población, por tanto, es la más homogénea y de menor tamaño medio entre las muestras calcinadas.

Estas observaciones se reflejan en la gráfica comparativa de tamaño promedio (Figura 31) donde los tres extractos experimentan un ligero descenso del tamaño medio al pasar de 60 °C a 500 °C. Es decir, los cambios observados sugieren que el tratamiento térmico no produjo variaciones drásticas en el tamaño promedio de partícula, aunque sí se aprecia una tendencia hacia tamaños ligeramente menores después del tratamiento a 500 °C.

Tabla 10. Composición elemental de las ZnO-NP (60°C y 500°C) determinada mediante EDS.

	Zn-Aa-60	Zn-Hr-60	Zn-Ij-60	Zn-Aa-500	Zn-Hr-500	Zn-Ij-500
Elemento	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p
O	29.47	20.37	10.34	12.50	2.48	4.72
Zn	70.53	79.63	89.66	87.50	97.52	95.28

Para el análisis de la composición elemental de las ZnO-NP se consideraron las señales correspondientes a oxígeno y zinc, (Tabla 10). En las muestras secadas a 60 °C, **Zn-Aa-60** presenta 29.47 % de O y 70.53 % de Zn; **Zn-Hr-60** contiene 20.37 % de O y 79.63 % de Zn; mientras que **Zn-Ij-60** registra 10.34 % de O y 89.66 % de Zn. Después de la calcinación a

500 °C, el contenido relativo de oxígeno disminuye y el de zinc aumenta en las tres muestras: **Zn-Aa-500** presenta 12.50 % de O y 87.50 % de Zn; **Zn-Hr-500**, 2.48 % de O y 97.52 % de Zn; y **Zn-Ij-500**, 4.72 % de O y 95.28 % de Zn.

La disminución del porcentaje en peso de oxígeno después del tratamiento térmico puede relacionarse con la eliminación de grupos hidroxilo y de residuos orgánicos procedentes de los extractos vegetales que permanecían asociados a las muestras secadas a 60 °C. La calcinación favorece la deshidroxilación y la combustión de estos compuestos, lo que reduce su contribución a la señal de oxígeno y aumenta proporcionalmente la presencia de zinc. Este comportamiento es consistente con una mayor exposición de la fase inorgánica de ZnO después del tratamiento térmico. En consecuencia, las muestras calcinadas presentan una composición relativa más rica en zinc y una menor proporción de especies oxigenadas residuales.

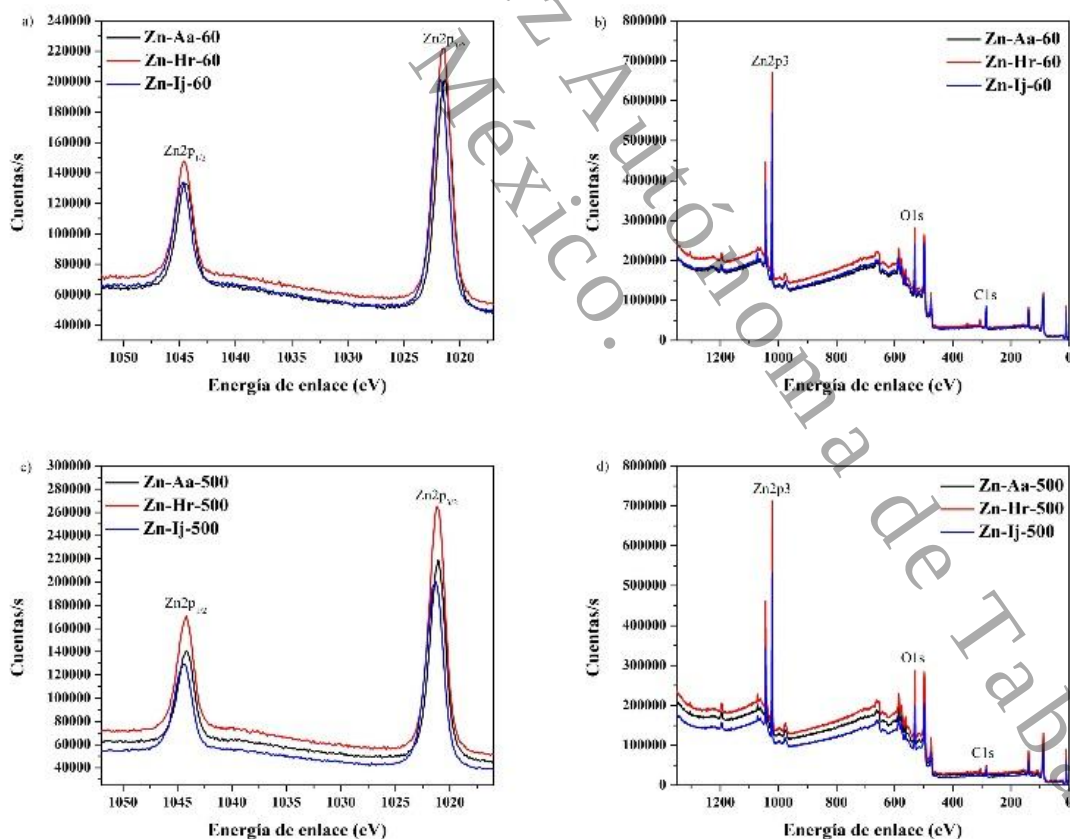
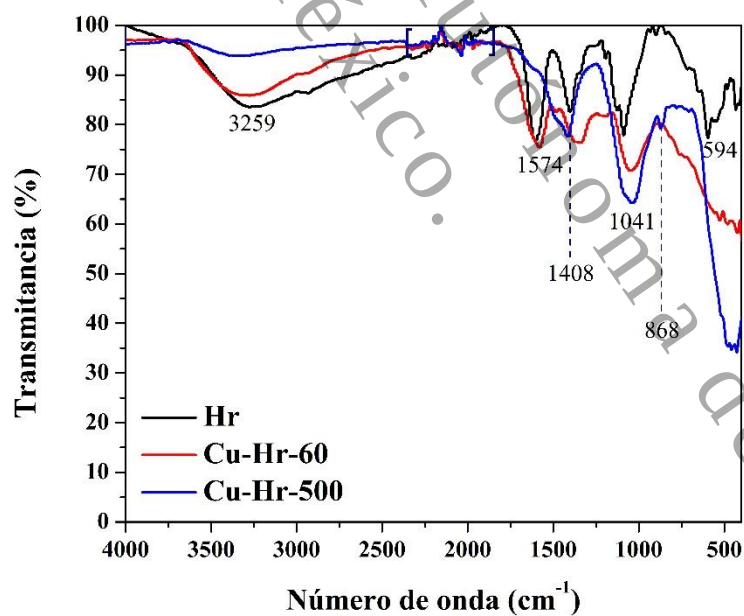
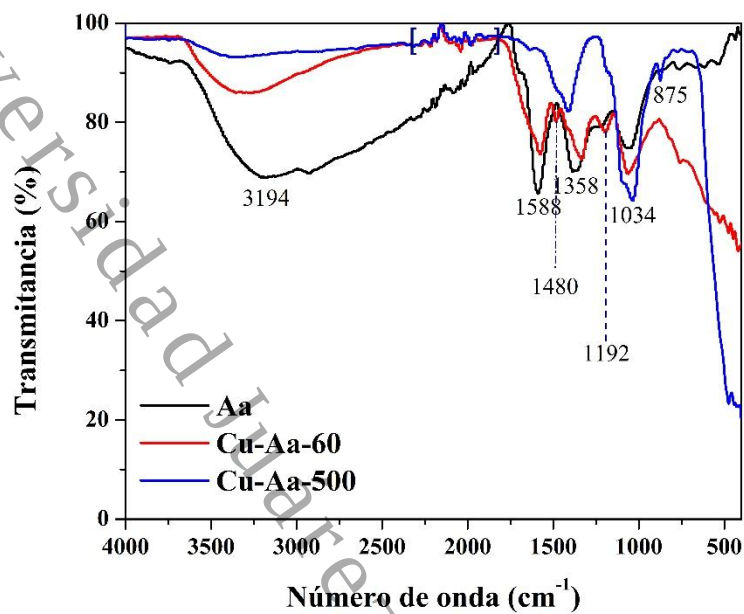


Figura 32. Espectros XPS de ZnO-NP sintetizadas utilizando extractos de plantas medicinales. Espectros de alta resolución de Zn 2p a) 60 °C y c) 500 °C. Espectros de barrido general b) 60 °C y d) 500 °C.

Los espectros XPS de las ZnO-NP (Figura 32) sintetizadas muestran, además de los picos de Zn 2p_{3/2} (≈ 1021.6 eV) y Zn 2p_{1/2} (≈ 1044.6 eV) característicos de la fase wurtzita, una señal de C 1s centrada en 284.8 eV con hombros a ≈ 286.5 eV (C–O) y ≈ 288.5 eV (C=O). En las muestras secadas a 60 °C, esta señal de C 1s es notablemente intensa, reflejo de la presencia de restos orgánicos derivados del extracto. Tras la calcinación a 500 °C, la intensidad relativa de C 1s disminuye de forma pronunciada, indicando la eliminación de residuos carbonosos; esta disminución se correlaciona con la atenuación en FTIR de las bandas de estiramiento C–O (1018 cm^{-1}), de flexión C–O–C (1404 cm^{-1}) y de estiramiento O–H ($3381\text{--}3367\text{ cm}^{-1}$). De modo análogo, la componente adsorbida en la región O 1s (≈ 531.8 eV) se ve reducida tras calcinación, en concordancia con la pérdida de grupos hidroxilo y agua de la superficie, tal como lo evidencian los cambios en FTIR. Estos resultados integrados confirman que el tratamiento térmico a 500 °C favorece remoción de residuos orgánicos superficiales de la superficie de las ZnO-NP, eliminando capas orgánicas y grupos funcionales adheridos sin afectar la estructura cristalina de wurtzita confirmando los resultados obtenidos por EDS.

6.3.3. Caracterización de las CuO-NP.



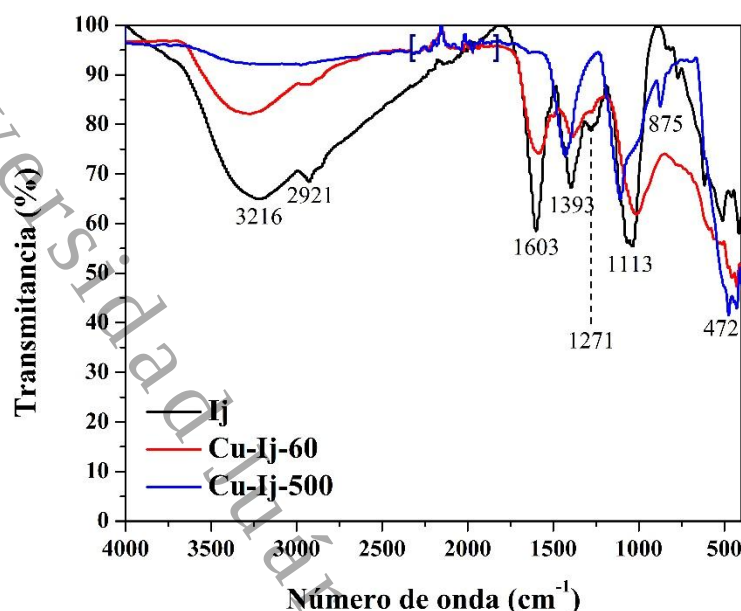


Figura 33. Espectros FTIR: a) extracto de *A. arvensis* comparadas con Cu-Aa-60 vs Cu-Aa-500 b) *H. rovirosae* vs Cu-Hr-60 vs Cu-Hr-500 y c) *I. jinicuil* vs Cu-Ij-60 vs Cu-Ij-500.

En las NP de Cu secadas a 60 °C (**Cu-Aa-60**, **Cu-Hr-60** y **Cu-Ij-60**), los espectros FTIR (Figura 33) muestran una banda ancha en el intervalo de 3200–3260 cm^{-1} , atribuida a las vibraciones de estiramiento del grupo O–H asociadas a hidroxilos fenólicos y moléculas de agua adsorbida. En la muestra **Cu-Ij-60** se distingue además una banda definida en 2921 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento C–H alifático, la cual no se observa con la misma intensidad en las otras muestras. Asimismo, se registran bandas en la región de 1603–1588 cm^{-1} , relacionadas con vibraciones de estiramiento C=C aromático o C=O conjugado, así como una señal en 1480 cm^{-1} atribuida a deformaciones del anillo aromático. Finalmente, las bandas distribuidas entre 1408 y 1034 cm^{-1} se asocian a vibraciones de estiramiento C–O de alcoholes, éteres o grupos fenólicos presentes en los metabolitos orgánicos que recubren la superficie de las NP.

Tras la calcinación a 500 °C, la banda O–H y los modos C–H/C–O se atenúan o desaparecen, confirmando la descomposición del recubrimiento en las tres muestras. Al mismo tiempo se observan los modos característicos de Cu–O de la fase CuO: un pico intenso en 594–575 cm^{-1} (nítido en **Cu-Hr-500** y **Cu-Aa-500**) y otro en 472 cm^{-1} presente en **Cu-Ij-500**, en

concordancia con valores reportados para CuO nanométrico (~ 480 , 530 y 580 cm^{-1}). Además, el hombro en $868\text{--}875\text{ cm}^{-1}$, ausente en los extractos, se intensifica tras la calcinación y puede relacionarse con vibraciones fuera del plano Cu–O.

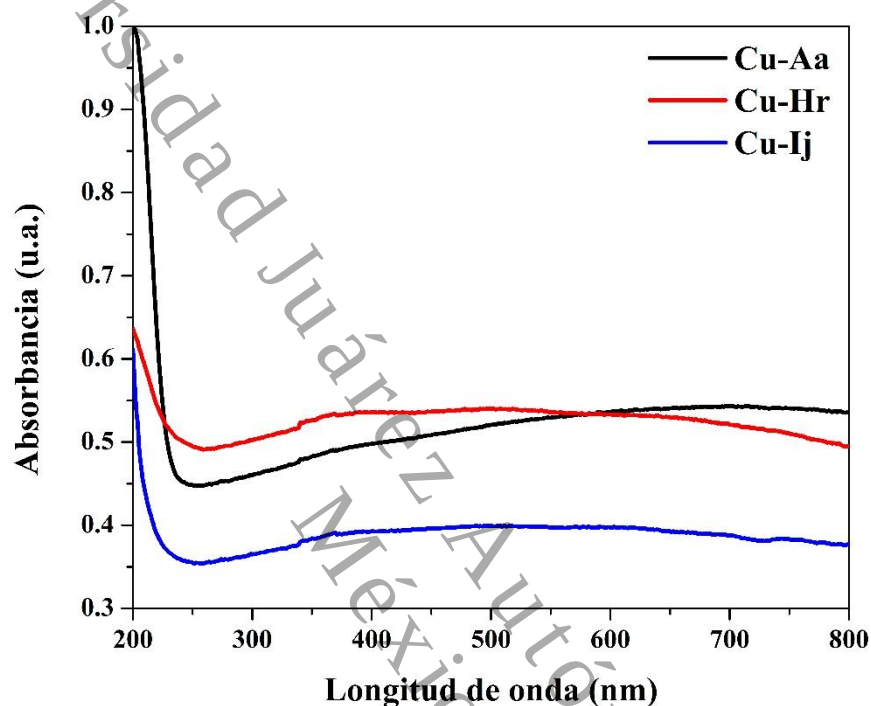


Figura 34. Espectros UV-Vis de las CuO-NP sintetizadas con extractos de plantas medicinales.

Los espectros de absorción UV-Vis registrados entre 200 y 800 nm (Figura 34) muestran una absorción más intensa en la región ultravioleta cercana a 230 nm , atribuida principalmente a metabolitos residuales del extracto vegetal adsorbidos sobre la superficie de las NP. Posteriormente, la absorbancia disminuye de manera pronunciada conforme aumenta la longitud de onda, hasta alcanzar valores mínimos aproximadamente entre 250 y 270 nm . Este comportamiento es particularmente evidente para las NP obtenidas con *A. arvensis* (**Cu-Aa**), cuya absorbancia disminuye desde valores cercanos a 1.0 hasta aproximadamente 0.45 . Para las NP obtenidas con *H. rovirosae* (**Cu-Hr**), el descenso es menos acentuado y alcanza un mínimo próximo a 0.50 , mientras que para las NP obtenidas con *I. jinicuil* (**Cu-Ij**) se observa la menor absorbancia global, con un valor mínimo cercano a 0.35 .

A partir de aproximadamente 300 nm, los tres espectros exhiben un incremento gradual de la absorbancia y una banda amplia, poco definida, que se extiende hacia la región visible. Para **Cu-Aa** y **Cu-Hr**, aunque **Cu-Hr** presenta una ligera disminución después de aproximadamente 550 nm. En **Cu-Ij**, En **Cu-Ij**, la absorbancia se mantiene relativamente estable en gran parte de la región visible, aunque presenta una ligera tendencia descendente hacia 800 nm. Esta respuesta óptica amplia puede asociarse con la contribución conjunta de transiciones de transferencia de carga $O^{2-}(p) \rightarrow Cu^{2+}(3d)$, características del CuO, y de compuestos orgánicos remanentes del extracto vegetal.

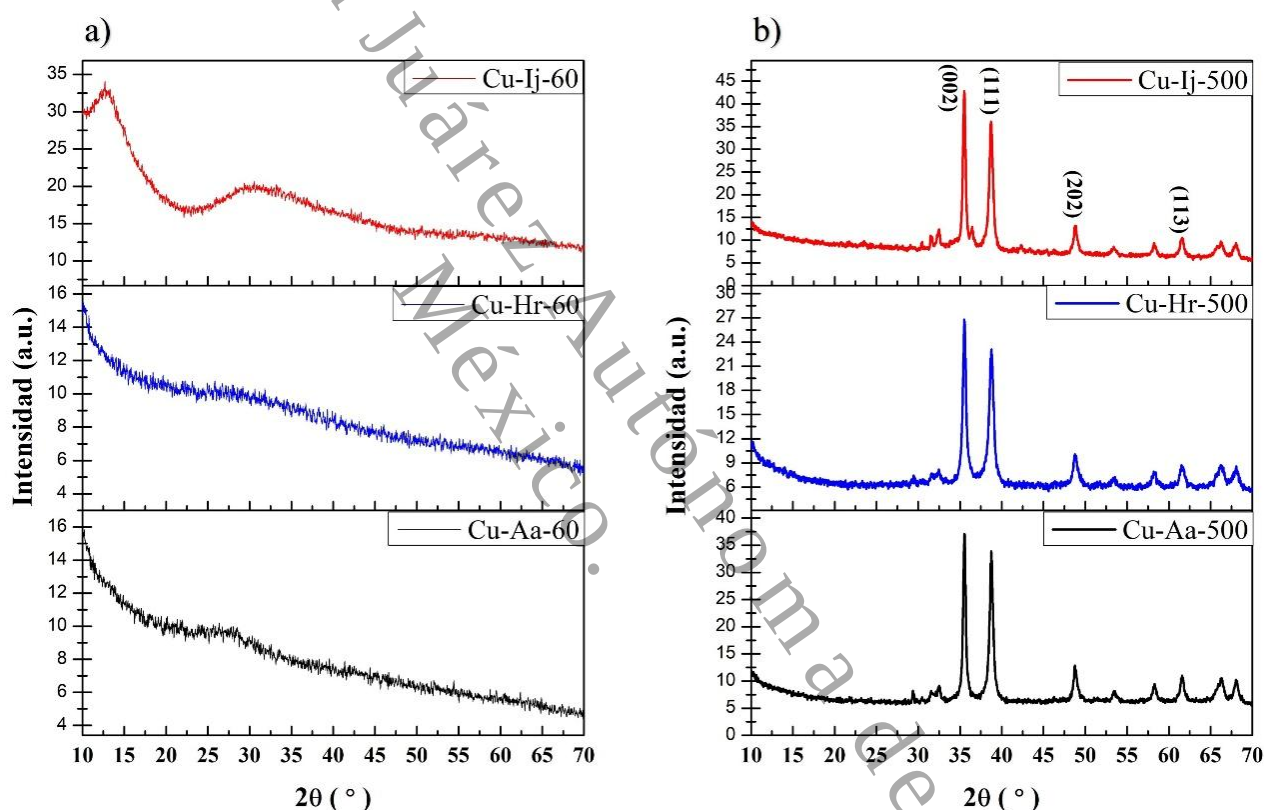


Figura 35. Patrones de DRX de CuO-NP sintetizadas utilizando extractos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).

Los patrones de DRX muestran un contraste claro entre las CuO-NP tratadas a 60 °C y 500 °C (Figura 30). En las muestras **Cu-Aa-60**, **Cu-Hr-60** y **Cu-Ij-60** (Figura 35a), se observan picos de difracción no definidos, lo que indica que las partículas presentan una estructura predominantemente amorfa o de baja cristalinidad.

Tras la calcinación (Figura 35b), los difractogramas de **Cu-Aa-500**, **Cu-Hr-500** y **Cu-Ij-500** presentan picos agudos y de alta intensidad, característicos de una estructura cristalina bien desarrollada correspondiente al CuO con fase monoclinica tipo tenorita. Los máximos de difracción más intensos se localizan en $2\theta \approx 35.5^\circ$ y 38.7° , asignados a los planos cristalográficos (002) y (111), respectivamente (JCPDS #01-080-0076). Asimismo, se identifican reflexiones secundarias en 48.7° y 61.5° , asociadas a los planos (202) y (113), lo que confirma la formación predominante de la fase tenorita y evidencia un incremento significativo en el grado de cristalinidad del material tras el tratamiento térmico. La intensidad de los picos difiere entre las muestras, siendo mayor en **Cu-Ij-500**, seguida por **Cu-Aa-500** y, finalmente, **Cu-Hr-500**, lo cual sugiere un mayor grado de cristalinidad o un tamaño de cristalito relativamente mayor en la primera. El tamaño de cristalito para las muestras calcinadas fue de 25 nm para **Cu-Aa-500**, 21 nm para **Cu-Hr-500** y 26 nm para **Cu-Ij-500** (Tabla 11).

Tabla 11. Estimación del tamaño teórico de cristalito mediante ecuación de Scherrer.

CuO-NP (60 °C)	Tamaño de cristalito (nm)	CuO-NP (500 °C)	Tamaño de cristalito (nm)
Cu-Aa-60	Amorfo	Cu-Aa-500	25
Cu-Hr-60	Amorfo	Cu-Hr-500	21
Cu-Ij-60	Amorfo	Cu-Ij-500	26

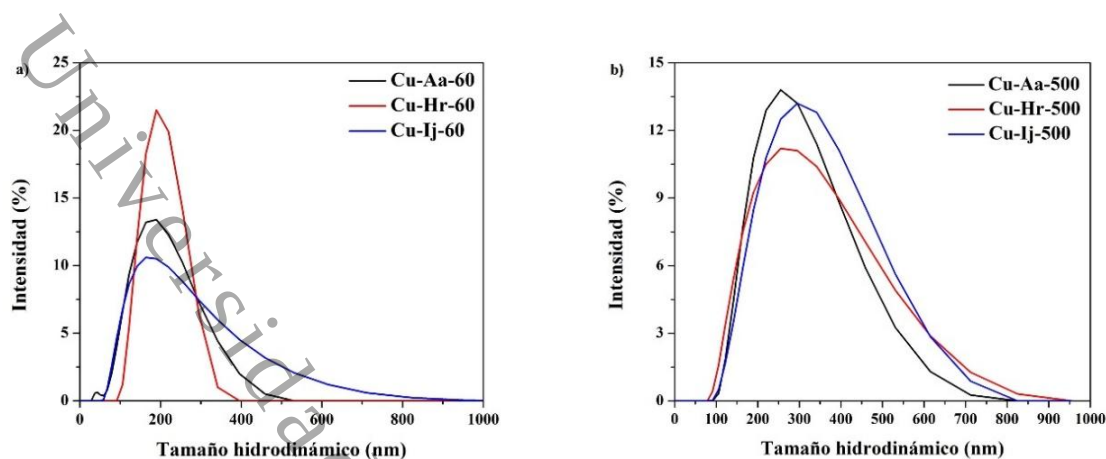


Figura 36. Distribución del tamaño hidrodinámico de las CuO-NP sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales, a 60 °C (a) y a 500 °C (b).

La Figura 36 (a,b) y Tabla 12 muestran los resultados del tamaño hidrodinámico, el índice polidispersidad y el potencial zeta de las CuO-NP. A 60°C (Figura 36a), las **Cu-Aa-60** y **Cu-Ij-60** presentan un tamaño promedio similar de 173 ± 24.8 nm y 177 ± 1.7 nm, respectivamente, y un PDI bajo (0.277 y 0.250, respectivamente) lo que indica una distribución relativamente homogénea, sin embargo, difieren en el potencial zeta, encontrándose más estable **Cu-Aa-60** (-20.1 ± 1.5 mV), comparado con **Cu-Ij-60** (-14.4 ± 2.0 mV). En comparación, las NP **Cu-Hr-60** presentan un mayor tamaño de 251 ± 28.8 nm y un PDI (0.362), su potencial zeta de -14.4 ± 1.5 mV, lo que refleja una menor estabilidad coloidal en comparación con **Cu-Aa-60**.

El tratamiento a 500°C (Figura 36b) provocó una mayor aglomeración según el incremento observado en el tamaño hidrodinámico y la polidispersidad promedio en todas las muestras, siendo menos evidente en **Cu-Hr-500**. Las NP de **Cu-Aa-500** alcanzaron un tamaño promedio de 311 ± 24.5 nm, con un PDI de 0.398, reflejando una distribución más amplia y un potencial zeta de -18.2 ± 1.6 mV inferior al reportado para **Cu-Aa-60**. Para **Cu-Hr-500**, el tamaño promedio incremento ligeramente a 298 ± 13.1 nm con un PDI de 0.365; sin embargo, el potencial zeta fue menos negativo que en **Cu-Hr-60**, al pasar de -14.4 ± 1.5 mV a -15.0 ± 1.0 mV. En el caso de **Cu-Ij-500**, presentan el mayor tamaño promedio (362 ± 57.4 nm) y un PDI de 0.391, mostrando distribución más heterogénea y un potencial zeta de -15.6 ± 1.4 mV.

Tabla 12. Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de las CuO-NP obtenidas mediante extractos de plantas medicinales.

NP	Tamaño hidrodinámico		Potencial zeta
	(nm)	PDI	(mV)
Cu-Aa-60	173 ± 24.8	0.277	-20.1 ± 1.5
Cu-Hr-60	251 ± 28.8	0.362	-14.4 ± 1.5
Cu-Ij-60	177 ± 1.7	0.250	-14.4 ± 2.0
Cu-Aa-500	311 ± 24.5	0.398	-18.2 ± 1.6
Cu-Hr-500	298 ± 13.1	0.365	-15.0 ± 1.0
Cu-Ij-500	362 ± 57.4	0.391	-15.6 ± 1.4

En general, el tratamiento térmico a 500 °C incrementó el tamaño hidrodinámico de partícula y la heterogeneidad de la distribución, con el mayor efecto en **Cu-Ij-500** y menos visible en **Cu-Hr-500**. Por último, el efecto en el potencial zeta fue menos evidente en cada una de las muestras ya que se encontraron valores muy similares entre ambos tratamientos térmicos. Las NP tratadas a 60°C presentan menor tamaño y uniformidad en comparación con las tratadas a 500°C.

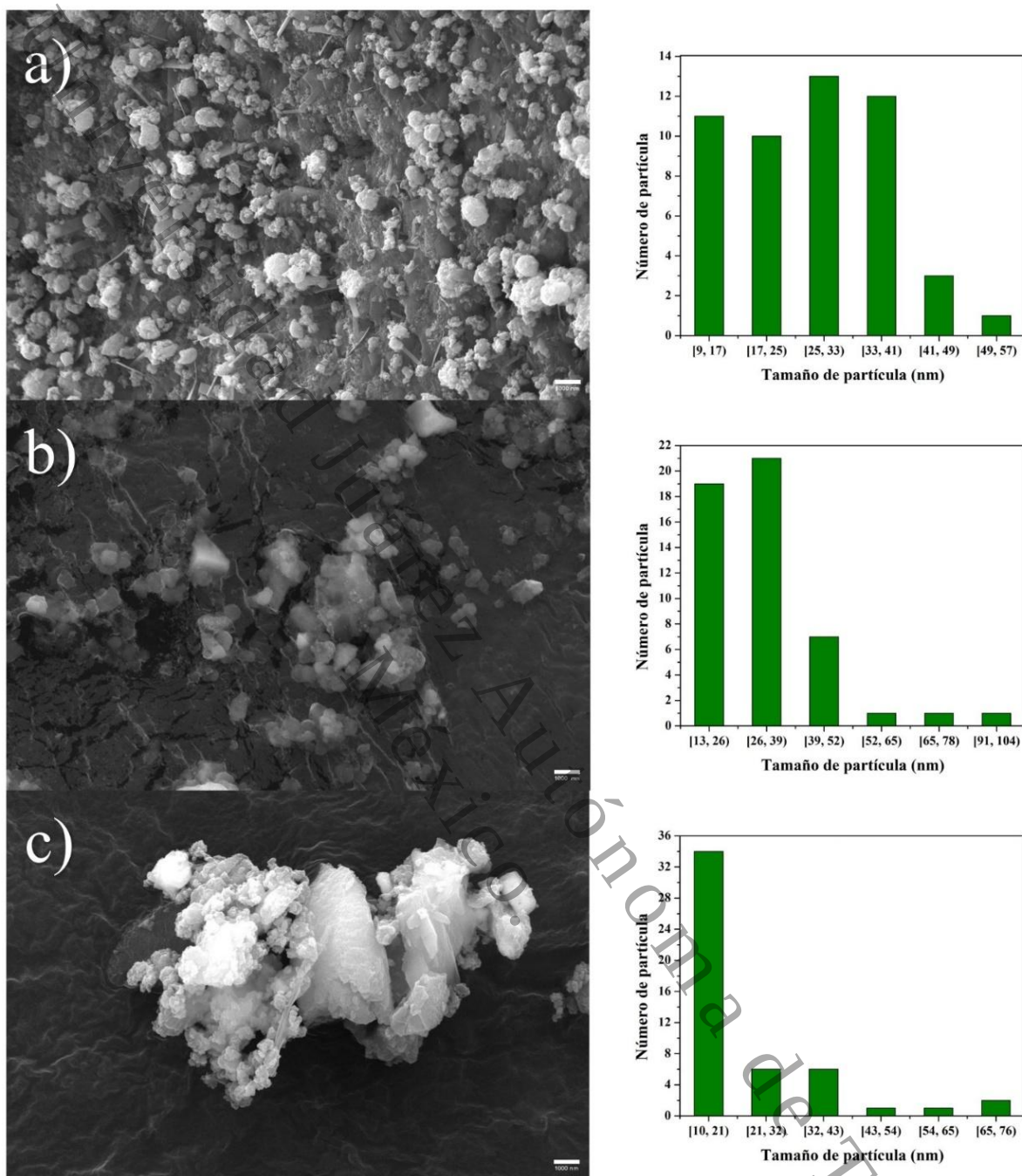


Figura 37a. Micrografías FESEM de las CuO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. a) **Cu-Aa-60**, b) **Cu-Hr-60** y c) **Cu-Ij-60**.

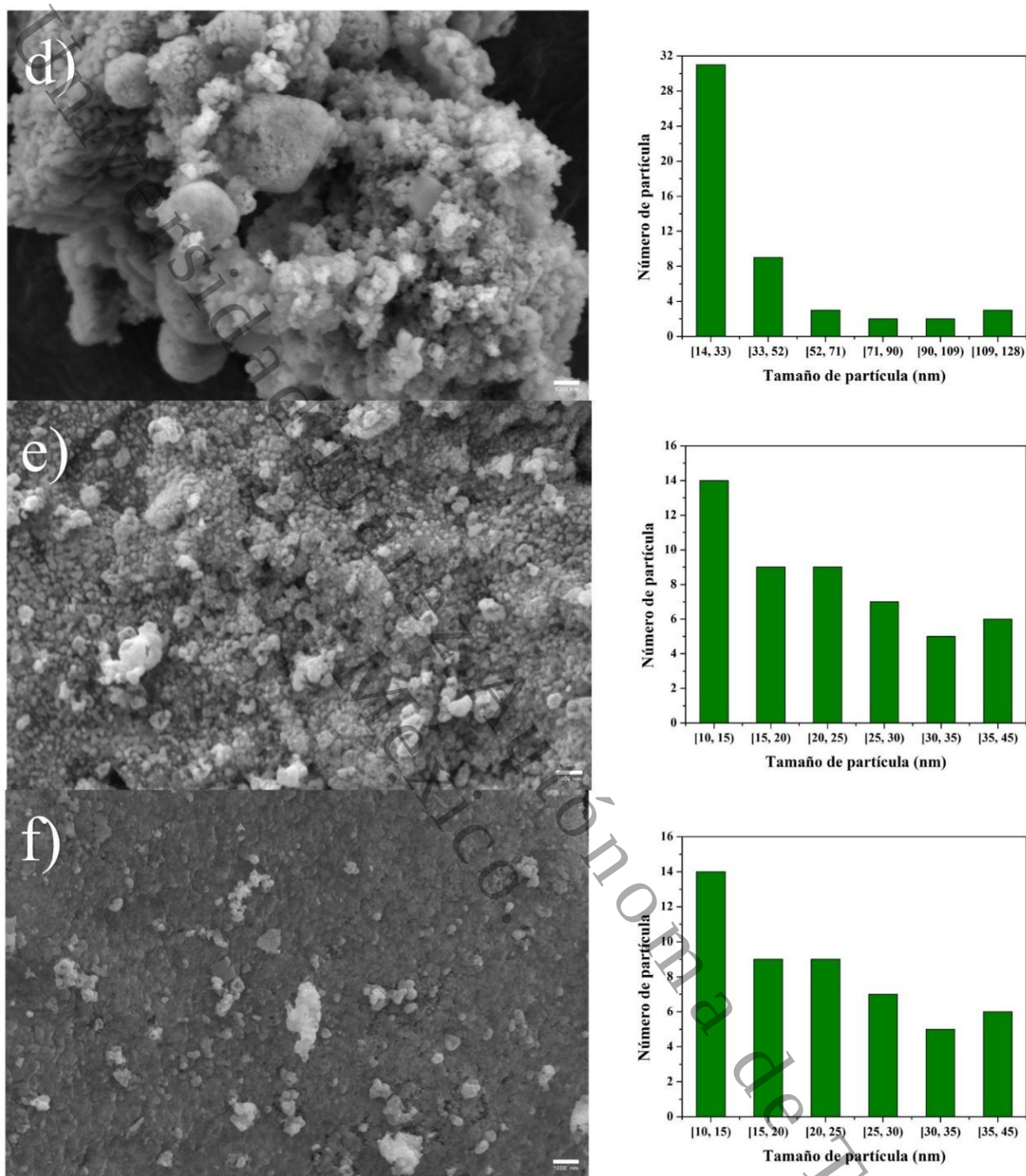


Figura 37b. Micrografías FESEM de las CuO-NP sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales. d) Cu-Aa-500, e) Cu-Hr-500 y f) Cu-Ij-500.

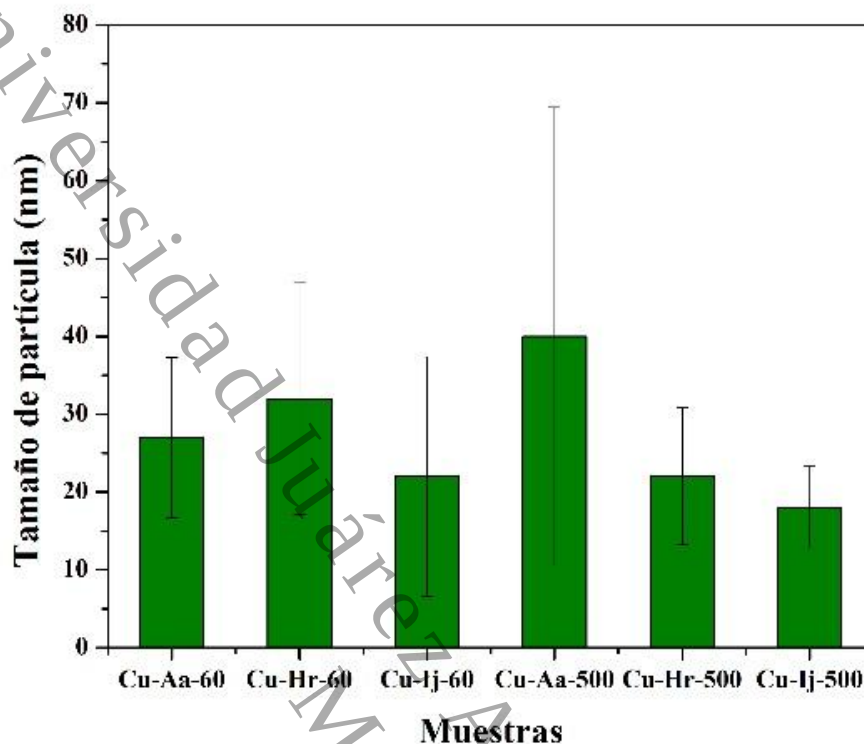


Figura 38. Comparación del tamaño promedio de las **Cu-Aa-60**, **Cu-Hr-60**, **Cu-Ij-60**, **Cu-Aa-500**, **Cu-Hr-500** y **Cu-Ij-500** sintetizadas mediante extractos de plantas medicinales.

Las micrografías FESEM de las NP de cobre muestran diferencias notables en su morfología, tamaño y aglomeración al comparar los tratamientos térmicos a 60°C y 500°C. A 60°C (Figura 37a), presentan una morfología irregular con aglomeraciones moderadas y una distribución de tamaños relativamente concentrada. En particular, la muestra **Cu-Aa-60** exhibe partículas en el rango de 17-41 nm, con predominancia entre 25-33 nm; **Cu-Hr-60** muestra una mayor dispersión con tamaños entre 13-78 nm; mientras que **Cu-Ij-60** presenta tamaños más pequeños, distribuidos con predominancia en el rango de 10-32 nm. Los tamaños promedio fueron 27 ± 10.3 nm para **Cu-Aa-60**, 32 ± 14.9 nm para **Cu-Hr-60** y 22 ± 15.4 nm para **Cu-Ij-60** (Figura 38).

Por otro lado, a 500°C (Figura 37b), las NP presentan una morfología más compacta y definida, con una menor tendencia a la aglomeración en comparación con las muestras a 60°C. Se observa una redistribución del tamaño de partícula: en **Cu-Aa-500** entre 14-52 nm;

en **Cu-Hr-500**, las partículas oscilan entre 10-45 nm y en **Cu-Ij-500** los tamaños también predominan en el rango de 10-20 nm. Los tamaños promedio fueron 40 ± 29.4 nm para **Cu-Aa-500**, 22 ± 8.8 nm para **Cu-Hr-500** y 18 ± 5.3 nm para **Cu-Ij-500** (Figura 38).

Al comparar ambos tratamientos térmicos, se observa que el tamaño promedio de las NP disminuye al aumentar la temperatura a 500°C, especialmente en las muestras **Cu-Hr-500** (de 32 a 22 nm) y **Cu-Ij-500** (de 22 a 18 nm). No obstante, en **Cu-Aa-500**, el tamaño promedio aumenta ligeramente de 30 a 40 nm.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento térmico a 500 °C induce una reorganización estructural asociada a la descomposición de compuestos orgánicos residuales provenientes del extracto vegetal. En contraste, a 60 °C, la persistencia de materia orgánica favorece la cohesión entre partículas.

Tabla 13. Composición elemental de las CuO-NP (60°C y 500°C) determinada mediante EDS.

	Cu-Aa-60	Cu-Hr-60	Cu-Ij-60	Cu-Aa500	Cu-Hr-500	Cu-Ij-500
Elemento	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p
C	11.92	14.27	15.83	15.01	16.27	0
O	29.67	35.93	31.76	29.88	32.0	32.01
Cu	49.46	50.00	52.41	47.87	43.6	67.99
Cl	8.94	0	0	7.24	8.13	0

Las CuO-NP analizadas mediante EDS (Tabla 13) muestran variaciones en su composición elemental dependiendo del extracto vegetal utilizado y del tratamiento térmico aplicado. A 60 °C, el porcentaje elemental en **Cu-Aa-60** fue de 11.92 %p/p para el C, 49.46 %p/p para el Cu y 29.67 %p/p de O. La muestra **Cu-Hr-60**, por su parte, tiene una mayor concentración de O (35.73 %p/p), mientras que el Cu alcanza el 50.00 %p/p y el C el 14.27 %p/p respecto a Cu-Aa-60. En la muestra **Cu-Ij-60**, el C representa el 15.83 %p/p, con un contenido de Cu de 52.41 %p/p y O de 31.76 %p/p. Se observa además la presencia de Cl en la muestra **Cu-Aa-60** con 8.94 %p/p.

Al incrementar el tratamiento térmico a 500 °C, se registró un aumento hasta 67.99 %p/p en el contenido de Cu en la muestra **Cu-Ij-500**, mientras que en **Cu-Aa-500** y **Cu-Hr-500** disminuye a 47.87 %p/p y 43.60 %p/p, respectivamente. En estas mismas muestras, el C no se registró en **Cu-Ij-500** y en **Cu-Aa-500** y **Cu-Hr-500** aumenta a 15.01 %p/p y 16.27 %p/p, respectivamente. El contenido de O se mantiene relativamente estable en **Cu-Aa-500** (29.88 %p/p) y **Cu-Hr-500** (32.00 %p/p), mientras que en **Cu-Ij-500** aumenta a 32.01 %p/p, posiblemente debido a una mayor oxidación superficial en esta muestra.

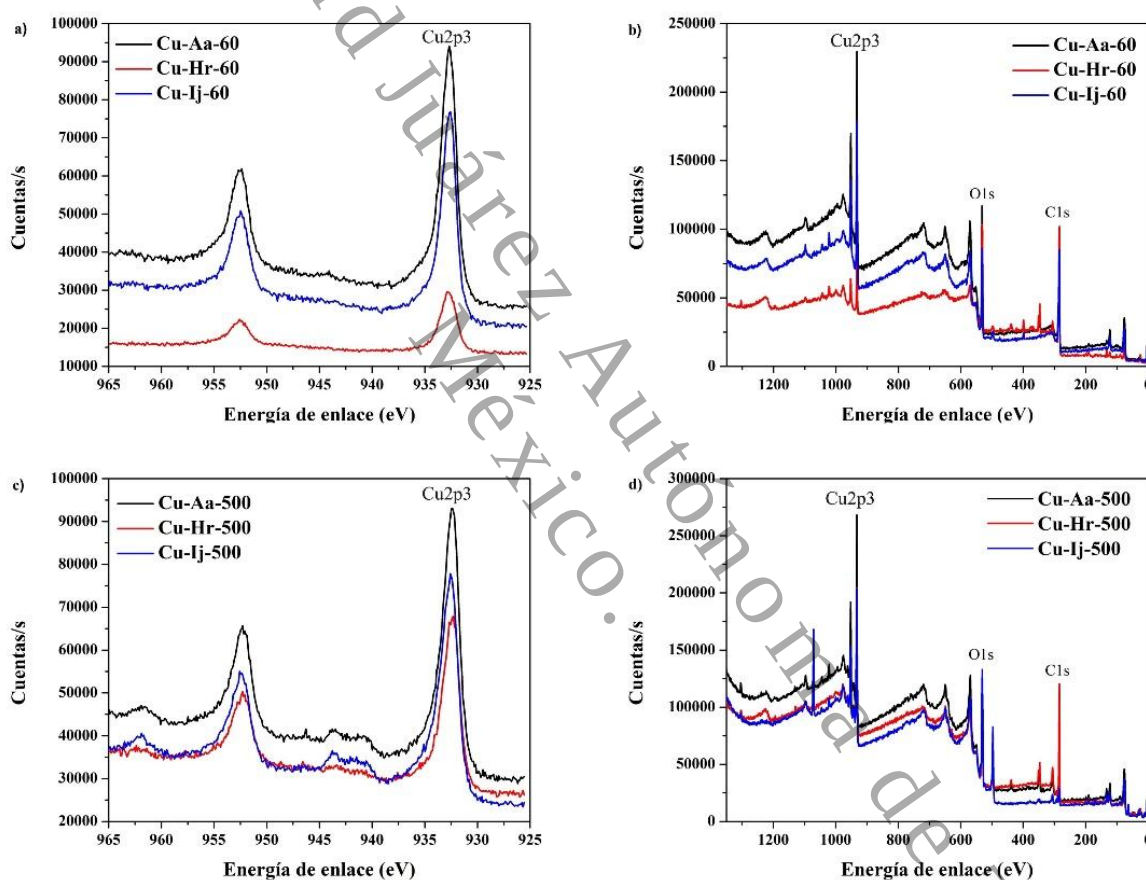


Figura 39. Espectros XPS de CuO-NP sintetizadas utilizando extractos de plantas medicinales. Espectros de alta resolución de Cu 2p a) 60 °C y c) 500 °C. Espectros de barrido general b) 60 °C y d) 500 °C.

Los espectros XPS de alta resolución de Cu 2p (Figura 39a,c) y los barridos generales (Figura 39b,d) evidencian la evolución química de las Cu-NP al pasar de 60 °C a 500 °C. En las muestras **Cu-Aa-60**, **Cu-Hr-60** y **Cu-Ij-60**, el máximo Cu 2p_{3/2} aparece a 933.8 ± 0.2 eV y

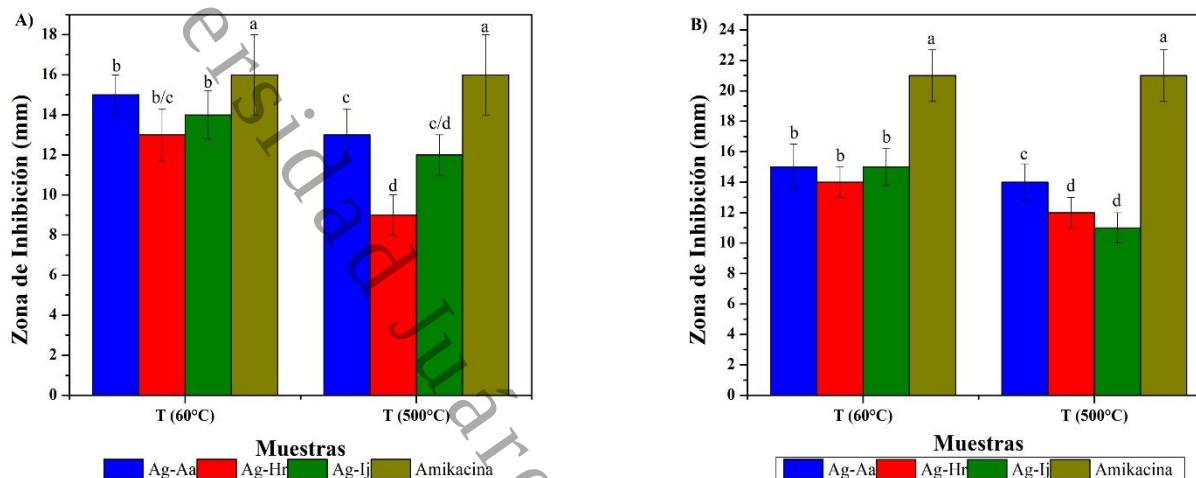
se acompaña de picos secundarios en 941-944 eV y 961-964 eV, firma inequívoca de Cu^{2+} en una red tipo CuO. La ausencia de un hombro en 932.6 eV descarta cantidades apreciables de Cu^0 o Cu_2O .¹⁵⁶ El pico O 1s centrado en 530.1 eV, de intensidad comparable a Cu 2p, confirma la estequiometría CuO. En cuanto a la señal de C 1s, en **Cu-Aa-60** el pico principal permanece centrado en 284.8 eV (C–C/C–H), pero aparece un hombro apreciable entre 286 y 288 eV, atribuible a enlaces C–O y C=O propios de flavonoides y otros metabolitos del extracto.

Después de la calcinación (**Cu-Aa-500**, **Cu-Hr-500**, **Cu-Ij-500**) los picos secundarios de Cu^{2+} conservan su intensidad, ratificando que el cobre permanece en estado de oxidación +2. En **Cu-Aa-500** el pico C 1s conserva su posición en 284.8 eV, pero su área disminuye y el hombro oxidado desaparece, quedando únicamente la fina capa de carbono ambiental que se adsorbe tras la calcinación. Este descenso coincide con la pérdida de las bandas orgánicas en FTIR.

En conjunto, los datos XPS confirman que el tratamiento a 500 °C consolida una fase CuO monovalente libre de contaminantes orgánicos y sin reducción a $\text{Cu}^0/\text{Cu}^{1+}$, mientras que las muestras a 60 °C retienen un recubrimiento orgánico denso que explica la absorción óptica a 270 nm y las bandas O–H/C–O en FTIR.

6.4. Actividad antibacteriana de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP

6.4.1. Evaluación del actividad antibacteriana de las AgNP.



Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey. Barras con la misma letra no muestran diferencias significativas.

Figura 40. Actividad antibacteriana de AgNP obtenidas de extractos vegetales contra a) *S. aureus* y b) *E. coli*. Control positivo: Amikacina (100 $\mu\text{g/mL}$)

Los resultados del ensayo de difusión en disco (Figura 40) mostraron que, en general, las AgNP tratadas a 60 °C presentaron halos de inhibición ligeramente mayores que sus contrapartes calcinadas frente a *S. aureus* y *E. coli*. Para ambas bacterias, las NP sintetizadas a 60 °C presentaron mayores halos de inhibición que las obtenidas a 500 °C. En particular, las muestras **Ag-Aa-60** y **Ag-Ij-60** mostraron los valores más altos, con halos cercanos a 15 mm, mientras que **Ag-Hr-500** registró los menores valores, alrededor de 10–11 mm, lo que evidencia una disminución tras la calcinación.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, evaluando el efecto del tratamiento térmico sobre los halos de inhibición para cada extracto vegetal. En el análisis global, que incluyó tanto las NP como el antibiótico de referencia, se identificaron diferencias significativas entre tratamientos, donde letras distintas indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). No obstante, al analizar exclusivamente el efecto del

tratamiento térmico dentro de cada extracto vegetal, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 60 °C y 500 °C

En cuanto a la actividad antibacteriana, las muestras **Ag-Hr-500** y **Ag-Ij-500** presentaron los halos de inhibición más bajos, con valores aproximados de 10.5–11.5 mm, mientras que **Ag-Aa-60** y **Ag-Ij-60** mostraron los valores más altos entre las AgNP. En este sentido, se observaron diferencias significativas en la actividad antibacteriana entre algunas muestras de AgNP, particularmente en las calcinadas a 500 °C, donde **Ag-Hr-500** y **Ag-Ij-500** presentaron halos significativamente menores en comparación con **Ag-Aa-500**. En contraste, a 60 °C no se detectaron diferencias significativas entre las AgNP. Con las NP de **Ag-Aa-60** los mayores halos fueron de 15.2 ± 0.8 mm frente a *S. aureus* y 14.7 ± 1.1 mm frente a *E. coli*, mientras que las **Ag-Hr-500** presentaron la menor actividad (10.5 ± 1.0 mm). El control positivo (amikacina) presentó halos de inhibición promedio superiores (21 ± 1.7 mm frente a *E. coli* y 16 ± 2 mm frente a *S. aureus*) en comparación con todas las AgNP evaluadas.

Al analizar el control antibiótico en el análisis, se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre algunas muestras de AgNP, especialmente bajo el tratamiento térmico de 500 °C. En contraste, a 60 °C las variaciones entre extractos fueron menores y, en la mayoría de los casos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que la prueba de Tukey permitió identificar al antibiótico como estadísticamente distinto de las muestras de NP.

La Tabla 14 muestra los valores de MIC y MBC de las AgNP y del control positivo (amikacina) frente a *S. aureus* y *E. coli*. Frente a *S. aureus*, las AgNP presentaron valores de MIC superiores al control positivo, lo que indica una menor actividad inhibitoria en comparación con la amikacina. En general, las muestras tratadas a 500 °C mostraron una ligera disminución de la MIC respecto a sus equivalentes obtenidas a 60 °C, aunque esta tendencia no fue uniforme en las muestras. **Ag-Ij-60** presentó la mayor actividad inhibitoria entre las AgNP frente a *S. aureus*, mientras que **Ag-Ij-500** mostró la menor actividad, con el valor de MIC más alto registrado.

De acuerdo con la Tabla 14, la actividad antibacteriana de las AgNP varió en función de la bacteria evaluada, la muestra y el tratamiento térmico. En *E. coli*, se observaron los valores de MIC más bajos, destacando **Ag-Aa-500** (0.004 mg mL^{-1}) como la muestra con mayor actividad inhibitoria entre las AgNP. La mayoría de las muestras presentó acción bactericida, aunque **Ag-Aa-500** mostró un comportamiento bacteriostático de acuerdo con la relación MBC/MIC. En contraste, frente a *S. aureus* se registraron valores de MIC más elevados, lo que sugiere una menor susceptibilidad relativa de esta bacteria. En este caso, **Ag-Ij-60** (0.156 mg mL^{-1}), **Ag-Aa-500** y **Ag-Hr-500** (0.312 mg mL^{-1}) presentaron las mejores respuestas inhibitorias entre las AgNP, mientras que **Ag-Ij-500** mostró la menor actividad, con una MIC de 5 mg mL^{-1} y un modo de acción no definido debido a que su MBC superó el rango evaluado ($>5 \text{ mg mL}^{-1}$).

Tabla 14. Actividad antibacteriana (valores MIC y MBC en mg/mL) y modo de acción de las AgNP contra *S. aureus* y *E. coli*.

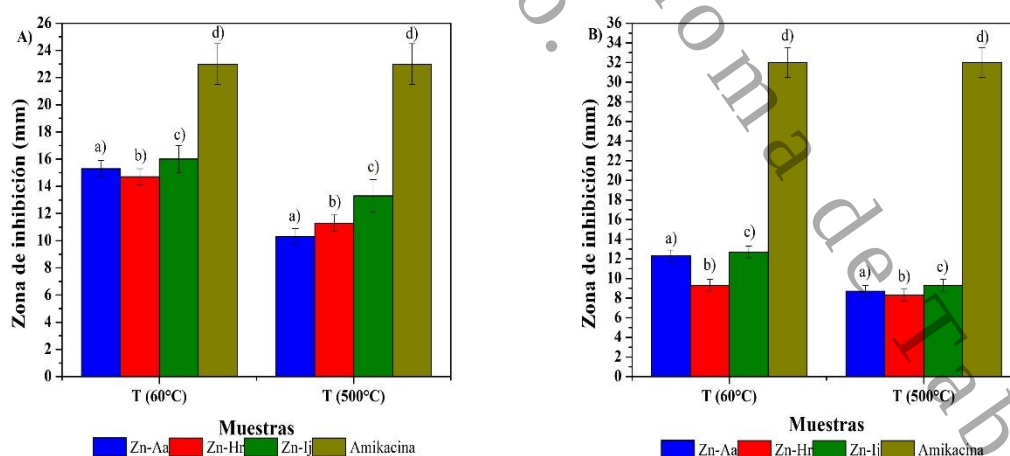
Bacteria	Muestra	MIC ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MBC ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MBC/MIC	Modo de acción
<i>S. aureus</i>	Ag-Aa-60	0.625	1.25	2	Bactericida
	Ag-Aa-500	0.312	0.312	1	Bactericida
	Ag-Hr-60	0.625	1.25	2	Bactericida
	Ag-Hr-500	0.312	0.312	1	Bactericida
	Ag-Ij-60	0.156	0.312	2	Bactericida
	Ag-Ij-500	5	>5	1	No definida
	Amikacina	0.019	0.019	1	Bactericida
<i>E. coli</i>	Ag-Aa-60	0.039	0.078	2	Bactericida
	Ag-Aa-500	0.004	0.019	5	Bacteriostática
	Ag-Hr-60	0.019	0.078	4	Bactericida
	Ag-Hr-500	0.019	0.019	1	Bactericida

Ag-Ij-60	0.009	0.019	2	Bactericida
Ag-Ij-500	0.039	0.078	2	Bactericida
Amikacina	0.009	0.009	1	Bactericida

Para *E. coli*, la MBC de la amikacina fue de 0.009 mg mL⁻¹. Entre las AgNP, **Ag-Aa-500**, **Ag-Hr-500** y **Ag-Ij-60** presentaron los valores más bajos de MBC (0.019 mg mL⁻¹), mientras que **Ag-Aa-60**, **Ag-Hr-60** y **Ag-Ij-500** mostraron valores superiores pero similares entre sí (0.078 mg mL⁻¹).

Respecto al modo de acción, la mayoría de las AgNP sintetizadas mostró un efecto bactericida (relación MBC/MIC ≤ 4). No obstante, la muestra Ag-Aa-500 frente a *E. coli* presentó un comportamiento bacteriostático, mientras que en Ag-Ij-500 frente a *S. aureus* la relación MBC/MIC no permitió establecer con claridad el tipo de efecto. Por su parte, el antibiótico de referencia (amikacina) mostró actividad bactericida frente a ambas cepas bacterianas. Cabe mencionar que los extractos vegetales, sin NP, no presentaron actividad antibacteriana en ninguna de las concentraciones ni metodologías evaluadas.

6.4.2. Evaluación de las propiedades antibacterianas de las ZnO-NP.



Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey. Barras con la misma letra no difieren significativamente.

Figura 41. Actividad antibacteriana de ZnO-NP obtenidas de extractos vegetales contra a) *S. aureus* y b) *E. coli*. Control positivo: Amikacina (100 µg/mL)

En general, los resultados del ensayo de difusión en disco (Figura 41) evidenciaron que las ZnO-NP obtenidas a 60 °C presentaron halos de inhibición mayores que sus correspondientes muestras calcinadas a 500 °C, tanto frente a *S. aureus* como frente a *E. coli*. Frente a *S. aureus*, los halos de inhibición de las muestras a 60 °C oscilaron entre 14.8 ± 0.5 y 16.2 ± 0.5 mm, mientras que en las muestras calcinadas a 500 °C disminuyeron a valores entre 13.0 ± 0.5 y 14.1 ± 0.4 mm. De manera similar, frente a *E. coli*, las ZnO-NP obtenidas a 60 °C presentaron halos entre 11.5 ± 0.5 y 12.4 ± 0.5 mm, en comparación con 9.6 ± 0.4 a 10.2 ± 0.4 mm después de la calcinación.

El análisis estadístico indica que, además del efecto de la temperatura de secado, el extracto de las plantas influye en la actividad antibacteriana. En este sentido, el efecto del tratamiento térmico varía en función del tipo de extracto vegetal. Por ejemplo, en *S. aureus* y *E. coli*, las **Zn-Ij-60** presentaron valores significativamente superiores a los de **Zn-Ij-500**, **Zn-Aa-500** y **Zn-Hr-500**.

En la comparación con el control positivo (amikacina), tanto frente a *S. aureus* como a *E. coli*, las ZnO-NP registraron halos significativamente menores. La amikacina alcanzó 23.0 ± 1.5 mm frente a *S. aureus* y 32.0 ± 1.5 mm frente a *E. coli*. Esto confirma que, si bien las NP mostraron una actividad antibacteriana evidente, su eficacia es considerablemente inferior a la del antibiótico de referencia.

La Tabla 15 muestra los valores de MIC y MBC de las ZnO-NP y del control positivo (amikacina) frente a *S. aureus* y *E. coli*. En términos generales, las ZnO-NP presentaron menor actividad inhibitoria que la amikacina, aunque se observaron diferencias asociadas al tratamiento térmico y al tipo de extracto vegetal empleado. Frente a *S. aureus*, la muestra **Zn-Ij-60** destacó por presentar la MIC más baja entre las ZnO-NP (0.078 mg mL^{-1}), mientras que las muestras **Zn-Aa-60** y **Zn-Hr-60** extractos mostraron valores superiores. En las muestras tratadas a 500 °C, la MIC fue similar entre las muestras (0.156 mg mL^{-1}), lo que sugiere una respuesta inhibitoria más homogénea después de la calcinación. Para *E. coli*, las ZnO-NP obtenidas a 60 °C presentaron valores de MIC más altos (0.625 mg mL^{-1}), mientras que las calcinadas a 500 °C mostraron valores menores y uniformes (0.156 mg mL^{-1}).

En cuanto a la MBC, la amikacina presentó los valores más bajos frente a ambas bacterias. Para *S. aureus*, las ZnO-NP obtenidas a 60 °C mostraron una respuesta variable, destacando

Zn-Ij-60 con el menor valor de MBC entre las nanopartículas (0.312 mg mL^{-1}). En contraste, las muestras calcinadas a 500°C presentaron valores de MBC similares entre sí (2.5 mg mL^{-1}). Frente a *E. coli*, todas las ZnO-NP obtenidas a 60°C registraron MBC de 5 mg mL^{-1} , mientras que las calcinadas a 500°C disminuyeron a 2.5 mg mL^{-1} . Estos resultados indican que, aunque las ZnO-NP no superaron al control positivo, el tratamiento térmico mejoró su efecto antibacteriano frente a *E. coli* y generó una respuesta más uniforme entre las muestras.

Tabla 15. Actividad antibacteriana (MIC y MBC en mg/mL) y modo de acción de las ZnO-NP contra *S. aureus* y *E. coli*.

Bacteria	NP	MIC (mg/mL^{-1})	MBC (mg/mL^{-1})	MBC/MIC	Modo de acción
<i>S. aureus</i>	Zn-Aa-60	1.25	10	8	bacteriostático
	Zn-Hr-60	1.25	10	8	bacteriostático
	Zn-Ij-60	0.078	0.312	4	bactericida
	Zn-Aa-500	0.156	2.5	16	bacteriostático
	Zn-Hr-500	0.156	2.5	16	bacteriostático
	Zn-Ij-500	0.156	2.5	16	bacteriostático
	Amikacina	0.078	0.078	1	bactericida
<i>E. coli</i>	Zn-Aa-60	0.625	5	8	bacteriostático
	Zn-Hr-60	0.625	5	8	bacteriostático
	Zn-Ij-60	0.625	5	8	bacteriostático
	Zn-Aa-500	0.156	2.5	16	bacteriostático
	Zn-Hr-500	0.156	2.5	16	bacteriostático
	Zn-Ij-500	0.156	2.5	16	bacteriostático
	Amikacina	0.156	0.156	1	bactericida

En cuanto al modo de acción, la mayoría de las muestras de ZnO-NP mostraron comportamiento bacteriostático (índice $\text{MBC/MIC} \geq 4$), excepto **Zn-Ij-60** frente a *S. aureus*, que presentó un patrón bactericida (índice = 4). El control positivo (amikacina) mostró acción bactericida frente a ambas bacterias.

6.4.3. Evaluación de las propiedades antibacterianas de las CuO-NP.

Las CuO-NP no mostraron actividad antibacteriana en el ensayo de difusión en disco, por lo que los resultados corresponden a la microdilución en caldo.

Tabla 16. Actividad antibacteriana (valores MIC y MBC en mg/mL) y modo de acción de las CuO-NP contra *S. aureus* y *E. coli*.

Bacteria	NP	MIC (mg/mL ⁻¹)	MBC (mg/mL ⁻¹)	MBC/MIC	Modo de acción
<i>S. aureus</i>	Cu-Aa-60	2.5	>10	-	No definido
	Cu-Hr-60	5	5	1	bactericida
	Cu-Ij-60	1.25	5	4	bactericida
	Cu-Aa-500	*NA	>10	-	No definido
	Cu-Hr-500	10	>10	-	No definido
	Cu-Ij-500	5	5	1	bactericida
	Amikacina	0.039	0.039	1	bactericida
<i>E. coli</i>	Cu-Aa-60	2.5	>10	-	No definido
	Cu-Hr-60	1.25	5	4	bactericida
	Cu-Ij-60	1.25	2.5	2	bactericida
	Cu-Aa-500	*NA	>10	-	No definido
	Cu-Hr-500	5	>10	-	No definido
	Cu-Ij-500	5	5	1	bactericida
	Amikacina	0.078	0.078	1	bactericida

*NA: No Actividad a la concentración evaluada.

De acuerdo con la Tabla 16, la actividad antibacteriana de las CuO-NP fue variable y dependió tanto de la bacteria evaluada como del extracto vegetal y del tratamiento térmico aplicado. Frente a *S. aureus*, la muestra **Cu-Ij-60** presentó la mayor actividad inhibitoria entre las CuO-NP, mientras que **Cu-Aa-500** no mostró actividad en la concentración evaluada. En general, las muestras obtenidas a 60 °C mostraron mejor respuesta que algunas de sus contrapartes calcinadas, aunque este comportamiento no fue uniforme para todos los extractos. Para *E. coli*, las muestras **Cu-Hr-60** y **Cu-Ij-60** presentaron los valores más bajos de MIC entre las CuO-NP, mientras que las muestras calcinadas tendieron a mostrar una

menor actividad inhibitoria o ausencia de actividad en el caso de **Cu-Aa-500**. En cuanto a la MBC, las respuestas también fueron variables; no obstante, **Cu-Ij-60** (2.5 mg mL⁻¹) destacó por presentar actividad bactericida frente a *E. coli*. En términos generales, las CuO-NP mostraron un efecto antibacteriano dependiente de la formulación, aunque inferior al observado con el control positivo, amikacina.

En cuanto al modo de acción, **Cu-Ij-60** y **Cu-Hr-60** mostraron actividad bactericida frente a ambas bacterias, de acuerdo con la relación **MBC/MIC ≤ 4**. En las demás muestras, el modo de acción no pudo definirse con claridad, debido a que los valores de MBC superaron la concentración evaluada. Por su parte, el control positivo, amikacina, presentó actividad bactericida frente a ambas bacterias.

6.5. Análisis de correlación de Pearson.

6.5.1. Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos, el rendimiento, la temperatura y las propiedades de las AgNP.

Las correlaciones significativas obtenidas revelan relaciones importantes entre los compuestos bioactivos de los extractos, el rendimiento y las propiedades de las NP.

Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados obtenidos de las AgNP.

Correlaciones													
Variables	T	Y	P	F	HS	PDI	PZ	ZOISa	ZOIEc	CS	MICSa	MICEc	PS
T	1	0.000	0.000	0.000	.696	.639	.420	-.707	-.778	.962**	-.269	-.062	.867*
Y	0.000	1	.922**	-.996**	.172	-.262	-.297	.237	.416	-.202	.322	-.071	.232
P	0.000	.922**	1	-.883*	.348	-.207	-.196	-.021	.297	-.236	.374	-.118	.194
F	0.000	-.996**	-.883*	1	-.128	.269	.314	-.292	-.434	.190	-.302	.059	-.236
HS	.696	.172	.348	-.128	1	.549	.322	-.854*	-.429	.532	-.435	-.385	.833*
PDI	.639	-.262	-.207	.269	.549	1	.928**	-.710	-.760	.564	-.152	.426	.537
PZ	.420	-.297	-.196	.314	.322	.928**	1	-.604	-.747	.350	.172	.680	.217
ZOISa	-.707	.237	-.021	-.292	-.854*	-.710	-.604	1	.766	-.617	.253	.098	-.605
ZOIEc	-.778	.416	.297	-.434	-.429	-.760	-.747	.766	1	-.795	-.050	-.351	-.418
CS	.962**	-.202	-.236	.190	.532	.564	.350	-.617	-.795	1	-.327	-.077	.766
MICSa	-.269	.322	.374	-.302	-.435	-.152	.172	.253	-.050	-.327	1	.703	-.540
MICEc	-.062	-.071	-.118	.059	-.385	.426	.680	.098	-.351	-.077	.703	1	-.345
PS	.867*	.232	.194	-.236	.833*	.537	.217	-.605	-.418	.766	-.540	-.345	1

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas). **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Variables consideradas en la correlación: polifenoles (P), flavonoides (F), rendimiento (Y), la temperatura (T) y las propiedades de las AgNPs, que incluyen: tamaño de cristalito (CS), tamaño hidrodinámico (HS), PDI, potencial zeta (ZP), zona de inhibición (ZOI), donde Sa: *S. aureus* y Ec: *E. coli*, concentración mínima inhibitoria (MIC) y tamaño de partícula (PS).

Para las AgNP (Tabla 17), la temperatura se correlacionó positivamente tanto con el tamaño de cristalito ($r = 0.962$) como con el tamaño de partícula ($r = 0.867$). Por otro lado, el rendimiento, se correlacionó positivamente con el contenido de polifenoles ($r = 0.922$), pero una correlación negativa muy fuerte con el contenido de flavonoides ($r = -0.996$). Además, los polifenoles y los flavonoides muestran una correlación negativa significativa ($r = -0.883$). El tamaño hidrodinámico se correlacionó positivamente con el tamaño de partícula ($r = 0.833$) y negativamente con halos de inhibición contra *S. aureus* ($r = -0.854$). Finalmente, el PDI mostró correlación positiva con el potencial zeta ($r = 0.928$).

6.5.2. Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos, el rendimiento, la temperatura y las propiedades de las ZnO-NP.

Tabla 18. Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados obtenidos de las ZnO-NP.

Correlaciones													
Variables	T	P	F	Y	HS	PDI	ZP	CS	ZOISa	ZOIEc	MICSa	MICEc	PS
T	1	0.000	0.000	0.000	.804	.406	.894*	.830*	-.707	-.778	-.669	-1.000**	-.331
P	0.000	1	-.883*	.409	-.346	-.459	.038	.055	-.021	.297	.519	0.000	.939**
F	0.000	-.883*	1	-.789	.446	.707	.095	-.029	-.292	-.434	-.419	0.000	-.801
Y	0.000	.409	-.789	1	-.414	-.774	-.235	-.015	.595	.456	.137	0.000	.328
HS	.804*	-.346	.446	-.414	1	.851*	.921**	.468	-.678	-.945**	-.515	-.804	-.568
PDI	.406	-.459	.707	-.774	.851*	1	.683	.096	-.598	-.800	-.257	-.406	-.517
ZP	.894*	.038	.095	-.235	.921**	.683	1	.572	-.737	-.874*	-.401	-.894*	-.237
CS	.830*	.055	-.029	-.015	.468	.096	.572	1	-.753	-.572	-.700	-.830*	.241
ZOISa	-.707	-.021	-.292	.595	-.678	-.598	-.737	-.753	1	.766	.473	.707	.184
ZOIEc	-.778	.297	-.434	.456	-.945**	-.800	-.874*	-.572	.766	1	.438	.778	.529
MICSa	-.669	.519	-.419	.137	-.515	-.257	-.401	-.700	.473	.438	1	.669	.706
MICEc	-1.000**	0.000	0.000	0.000	-.804	-.406	-.894*	-.830*	.707	.778	.669	1	.331
PS	-.331	.939**	-.801	.328	-.568	-.517	-.237	.241	.184	.529	.706	.331	1

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas). **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Variables consideradas en la correlación: polifenoles (P), flavonoides (F), rendimiento (Y), la temperatura (T) y las propiedades de las ZnO-NP, que incluyen: tamaño de cristalito (CS), tamaño hidrodinámico (HS), PDI, potencial zeta (ZP), zona de inhibición (ZOI), donde Sa: *S. aureus* y Ec: *E. coli*, concentración mínima inhibitoria (MIC) y tamaño de partícula (PS).

En el caso del ZnO-NP (Tabla 18), la temperatura mostró una correlación positiva significativa con el tamaño hidrodinámico ($r = 0.804$), el potencial zeta ($r = 0.894$) y el tamaño de cristalito ($r = 0.830$). También la temperatura presentó una correlación negativa con la MICEc frente a *E. coli* ($r = -1.000$). El PDI presentó una correlación positiva significativa con el tamaño hidrodinámico ($r = 0.851$). A su vez, el potencial zeta mostró correlaciones positivas con el tamaño hidrodinámico ($r = 0.921$) y con el tamaño de cristalito ($r = 0.572$). En cuanto a la actividad antibacteriana, el potencial zeta presentó una correlación negativa significativa con el halo de inhibición frente a *E. coli* ($r = -0.874$) y con la MIC frente a *E. coli* ($r = -0.894$). Por último, el tamaño hidrodinámico tuvo una correlación negativa fuerte con la zona de inhibición frente a *E. coli* ($r = -0.945$). Finalmente se encontró una relación fuerte ($r = .939^*$) y positiva entre la cantidad de polifenoles y el tamaño de partícula.

6.5.3. Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos, el rendimiento, la temperatura y las propiedades de las CuO-NP.

Tabla 19. Coeficientes de correlación de Pearson para los resultados obtenidos de las CuO-NP.

Correlaciones													
Variables	T	P	F	Y	HS	PDI	ZP	ZOISa	ZOIEc	CS	MICSa	MICEc	PS
T	1	0.000	0.000	0.000	.888*	.782	.008	. ^b	. ^b	.988**	.319	.436	-.023
P	0.000	1	-.883*	.595	-.105	.218	-.553	. ^b	. ^b	-.055	.055	-.292	.705
F	0.000	-.883*	1	-.149	.176	-.087	.850*	. ^b	. ^b	.004	.327	.426	-.741
Y	0.000	.595	-.149	1	.079	.310	.291	. ^b	. ^b	-.109	.677	.115	.217
HS	.888*	-.105	.176	.079	1	.928**	.201	. ^b	. ^b	.910*	.350	.424	-.024
PDI	.782	.218	-.087	.310	.928**	1	.094	. ^b	. ^b	.798	.301	.201	.293
ZP	.008	-.553	.850*	.291	.201	.094	1	. ^b	. ^b	-.029	.442	.204	-.397
ZOISa	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	1	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b
ZOIEc	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b	1	. ^b	. ^b	. ^b	. ^b
CS	.988**	-.055	.004	-.109	.910*	.798	-.029	. ^b	. ^b	1	.209	.383	.005
MICSa	.319	.055	.327	.677	.350	.301	.442	. ^b	. ^b	.209	1	.795	-.502
MICEc	.436	-.292	.426	.115	.424	.201	.204	. ^b	. ^b	.383	.795	1	-.801
PS	-.023	.705	-.741	.217	-.024	.293	-.397	. ^b	. ^b	.005	-.502	-.801	1

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas). **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Variables consideradas en la correlación: polifenoles (P), flavonoides (F), rendimiento (Y), la temperatura (T) y las propiedades de las CuO-NP, que incluyen: tamaño de cristalito (CS), tamaño hidrodinámico (HS), PDI, potencial zeta (ZP), zona de inhibición (ZOI), donde Sa: *S. aureus* y Ec: *E. coli*, concentración mínima inhibitoria (MIC) y tamaño de partícula (PS).

Por su parte, con las CuO-NP (Tabla 19), se encontró una correlación positiva fuerte entre la temperatura con el tamaño hidrodinámico ($r = 0.888$) y el tamaño de cristalito ($r = 0.988$). Además, se observó que los flavonoides tienen una correlación positiva con el potencial zeta ($r = 0.850$). En cuanto al tamaño hidrodinámico, este mostró una correlación positiva significativa con el PDI ($r = 0.928$) y con el tamaño de cristalito ($r = 0.910$).

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los metabolitos secundarios de plantas desempeñan dos roles diferenciados en la síntesis bioasistida: (i) actúan como agentes reductores y estabilizadores en el caso de la plata,³⁴ y (ii) funcionan como agentes quelantes que modulan la nucleación y el crecimiento en los óxidos de cobre y zinc.^{38,149} El extracto vegetal utilizado durante la síntesis mostró un efecto sobre la morfología, el tamaño, la dispersidad y la estabilidad coloidal de las NP. Sin embargo, este comportamiento no puede explicarse únicamente a partir del contenido total de polifenoles o flavonoides, dado que la formación de nanomateriales, especialmente en sistemas de óxidos metálicos como ZnO y CuO, depende en gran medida de variables fisicoquímicas del medio, incluyendo el pH de reacción, la naturaleza química del precursor metálico y los mecanismos de hidrólisis-condensación que conducen a la nucleación del óxido.^{150,151} Por tanto, las correlaciones observadas mediante el análisis de Pearson deben interpretarse como asociaciones parciales dentro de un sistema de complejidad multicausal, en el que los metabolitos orgánicos actúan juntamente con parámetros de síntesis para definir las características finales de las NP.

El análisis estadístico mediante correlación de Pearson no reveló asociaciones significativas entre el contenido total de polifenoles o flavonoides y los parámetros fisicoquímicos. Esto sugiere que la relación extracto–NP depende en mayor medida de la composición cualitativa (posición y número de grupos –OH) que de la cantidad total de compuestos fenólicos o cloruros presentes en el medio. Estudios previos han evidenciado que la disposición espacial de los grupos hidroxilo modula tanto la fuerza reductora como la capacidad de recubrimiento de los metabolitos, lo que a su vez influye en la velocidad de nucleación y en la energía superficial de las NP resultantes.^{152–155}

Los resultados indican que la contribución de los extractos vegetales va más allá de una simple interacción con polifenoles y responde a una sinergia entre la composición fitoquímica, condiciones de síntesis y la naturaleza del metal precursor. Desde un punto de vista electroquímico, la formación de AgNP puede explicarse por la viabilidad termodinámica de la reducción de Ag^+ a Ag^0 , favorecida por la diferencia positiva de potencial ($\Delta E > 0$) entre los potenciales de oxidación de los polifenoles y el potencial estándar del par Ag^+/Ag^0 .¹⁵⁶ En contraste, para Cu^{2+} y Zn^{2+} , cuyos potenciales de reducción son

considerablemente menores, la transferencia electrónica directa desde los metabolitos resulta termodinámicamente desfavorable ($\Delta E < 0$), lo que impide la formación de especies metálicas y favorece rutas alternativas.¹⁵⁶

En estos sistemas, la síntesis de CuO y ZnO ocurre principalmente a través de mecanismos de hidrólisis y condensación, donde el pH del medio promueve la formación de hidróxidos metálicos intermedios (por ejemplo, $\text{Zn}(\text{OH})_2$ o $\text{Cu}(\text{OH})_2$), los cuales posteriormente se transforman en óxidos mediante procesos de deshidratación, especialmente durante el tratamiento térmico.³⁸ De esta manera, los metabolitos vegetales no solo actúan como donadores de electrones en sistemas redox favorables, sino también como agentes complejantes y moduladores del entorno químico, dirigiendo la ruta de formación del nanomaterial.^{157,158}

Respecto a los rendimientos de síntesis, se observó que el contenido de polifenoles mostró una relación directa con los rendimientos de las AgNP. El extracto de *A. arvensis* presentó los mayores valores de polifenoles (90.8 ± 1.5 mg EAG/g E) y los rendimientos más altos ($89.6 \pm 1.2\%$), lo que sugiere que estos compuestos desempeñan un papel clave en la síntesis bioasistida.⁸ Su elevada capacidad para donar electrones y su interacción con la superficie de las NP mediante impedimentos estéricos e interacciones electrostáticas favorecen tanto la nucleación como la estabilidad de los nanomateriales, lo que se traduce en un mayor rendimiento de síntesis.^{7,159,160} Esto fue respaldado por los resultados de correlación donde se observó que el uso de extractos con altos contenidos de polifenoles favorece mayores rendimientos.³⁵ Esto puede atribuirse como se mencionó anteriormente a la composición cualitativa del extracto, lo que les confiere una mayor eficiencia en la donación de electrones y en la estabilización de las AgNP mediante enlaces con la superficie.^{134,161}

En el caso de las CuO-NP, el mayor rendimiento se observó en *H. rovirosae* ($87.5 \pm 1.6\%$) y *A. arvensis* ($82.4 \pm 1.2\%$) seguido de *I. jinicuil* ($78.7 \pm 1.0\%$) pero sin una correlación directa con el contenido de polifenoles y flavonoides. Esto responde a la naturaleza multivariada, de la síntesis donde posiblemente influyen las especies químicas presentes en el medio de reacción, como los iones cloruro (Cl^-).^{162,163} los cuales podrían influir en la especiación del Cu^{2+} mediante la formación de complejos clorados, cuya distribución depende de la concentración de Cl^- y de las condiciones del medio.¹⁶⁴ La detección de Cl mediante EDS en algunas muestras sugiere la permanencia de especies cloradas residuales; sin embargo, los

resultados no permiten establecer una relación directa entre su presencia y el rendimiento final de las CuO-NP. Por lo tanto, la conversión de Cu^{2+} en CuO probablemente depende de la acción conjunta de los metabolitos del extracto vegetal, la composición del medio de reacción y el tratamiento térmico aplicado. Para las ZnO-NP, se observaron rendimientos elevados según el extracto vegetal utilizado, destacando *A. arvensis* con valores cercanos al 92 %, en contraste con *H. rovirosae* e *I. jinicuil*, cuyos rendimientos fueron menores (≈ 71 % y ≈ 76 %, respectivamente). Donde, probablemente la función principal de los polifenoles y flavonoides en la formación de los óxidos metálicos sea la quelación del ión metálico. Un aspecto a destacar de los iones Cl^- presentes en el medio se observó en AgNP, donde el análisis de DRX reveló la coexistencia de Ag^0 y AgCl, indicio de la participación de Cl^- en el proceso de crecimiento.^{164, 165}

Así mismo, el tratamiento a 500 °C tuvo un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas de las AgNP, ZnO-NP y CuO-NP. En términos de tamaño promedio de cristalito, en las AgNP incrementó de 12–21 a 40–51 nm, según la ecuación de Scherrer. De manera similar, las ZnO-NP mostraron un ligero aumento en el tamaño de cristalito, de 20–23 a 24–27 nm. Sin embargo, las CuO-NP experimentaron una ligera reducción en el tamaño promedio, particularmente en las obtenidas con los extractos de *H. rovirosae* e *I. jinicuil*. Este comportamiento sugiere que la eliminación de compuestos orgánicos y el proceso de sinterización¹⁶⁶ promovido por la calcinación indujeron cambios en la estructura y tamaño de las NP, aunque dependiendo del material, como en el caso de CuONP.^{167–169} Adicionalmente, la cristalinidad también mejoró con la calcinación. En las AgNP y CuO-NP, se promovió la formación de fases bien definidas en CuO-NP y un aumento de la fase Ag^0 (y disminución de la fase AgCl) en la AgNP. Respecto a las ZnO-NP, el tratamiento térmico intensificó los picos correspondientes a la estructura wurtzita, reflejando un mayor orden cristalino y una menor presencia de defectos estructurales.

Sin embargo, la calcinación afectó negativamente la estabilidad coloidal debido a modificaciones en la composición y estructura de la superficie, como la reducción de la carga superficial, lo que favoreció la tendencia a la aglomeración.^{170,171} A 500 °C, como se mencionó anteriormente, los compuestos orgánicos adsorbidos en la superficie se descomponen o volatilizan, eliminando la capa estabilizadora y reduciendo la repulsión

electrostática entre partículas. Este proceso, junto con la sinterización parcial promueve una mayor coalescencia entre partículas y una disminución del área superficial disponible, lo que incrementa la tendencia a la aglomeración.^{167,169} Como consecuencia, los valores de potencial zeta disminuyeron de -3 a -15 mV, indicando menor estabilidad coloidal, principalmente observada en las ZnO-NP. Este efecto fue notable en el aumento del tamaño hidrodinámico medido por DLS, evidenciando una mayor formación de agregados. Cabe señalar que, aunque los recubrimientos vegetales proporcionaron inicialmente una dispersión más homogénea (bajos PDI a 60 °C), la protección estérica fue insuficiente para evitar la aglomeración una vez eliminada por la calcinación.^{3,172}

En este estudio se observó un comportamiento dual similar, las muestras con potencial zeta más negativo (-16 a -19 mV) presentaron PDI bajos ≤ 0.43 , y tamaños hidrodinámicos pequeños de 77–127 nm como en el caso de **Zn-Aa-60** y **Zn-Ij-60**, mientras que aquellas con potenciales menos negativos (-6 a -10 mV) mostraron PDI altos ≥ 0.5 y tamaños mayores a 300 nm, confirmando una aglomeración creciente (**Zn-Hr-60**, **Zn-Hr-500** y **Zn-Ij-500**). Por tanto, el descenso del potencial zeta tras la calcinación, junto con la pérdida parcial del recubrimiento orgánico, explica la agregación detectada por DLS y FESEM. En contraste, los sólidos secados a 60 °C conservaron una fracción significativa de compuestos orgánicos adsorbidos, lo que compensó en parte la reducción de la repulsión electrostática y mantiene la estabilidad coloidal durante los ensayos antibacterianos.

Sin embargo, es importante puntualizar que el potencial zeta constituye un indicador clave de la estabilidad de una suspensión coloidal.¹⁷² Valores elevados en magnitud (positivos o negativos) implican fuertes fuerzas de repulsión entre NP y, por tanto, menor tendencia a la agregación, mientras que valores cercanos a cero favorecen la aglomeración.¹⁷² Las NP obtenidas por síntesis bioasistida presentaron potenciales zeta entre -3 y -20.1 mV, correspondientes a una estabilidad limitada a corto plazo.¹⁷³ No obstante, la presencia de recubrimientos orgánicos procedentes del extracto vegetal puede mantener la dispersión incluso con potenciales por debajo de ± 30 mV.¹⁷⁴

En cuanto a la actividad antibacteriana, se resalta el desempeño individual de cada nanomaterial estudiado en función de sus propiedades. Tras la calcinación, el tamaño hidrodinámico de las AgNP aumentó significativamente, alcanzando valores entre 140 y 583

nm, acompañado de un incremento en la polidispersidad (PDI hasta 0.635) y una disminución relativa en la magnitud del potencial zeta (-14.3 a -20 mV), lo que sugiere una mayor tendencia a la agregación. Este comportamiento coloidal probablemente limitó la difusión de las partículas en el medio sólido, reflejándose en una reducción de los halos de inhibición, particularmente frente a *S. aureus* y *E. coli* en las muestras tratadas a 500 °C. En contraste, las AgNP obtenidas a 60 °C, con menores tamaños hidrodinámicos (desde 77 hasta 127 nm) y cargas superficiales más negativas, presentaron una mejor dispersión y mayor movilidad en las redes poliméricas del agar, lo que favoreció su interacción con las bacterias.

Sin embargo, en ensayos en medio líquido (microdilución), se observó un comportamiento distinto, donde algunas muestras calcinadas, como **Ag-Aa-500** y **Ag-Hr-500**, mostraron una disminución en los valores de MIC (0.312 mg·mL⁻¹ frente a 0.625 mg·mL⁻¹ en sus contrapartes a 60 °C), indicando una mayor eficacia antibacteriana. Este efecto puede atribuirse a la eliminación del recubrimiento orgánico durante la calcinación, lo que expone una superficie metálica más reactiva y facilita la liberación de iones Ag⁺. En este sentido, diversos estudios han demostrado que los metabolitos residuales de origen vegetal pueden actuar como agentes estabilizantes, pero también como una barrera que limita la disolución iónica y, por tanto, la biodisponibilidad de Ag⁺ en sistemas acuosos.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Así, mientras que en agar la actividad está dominada por la difusión y estabilidad coloidal, en caldo de cultivo domina el efecto de la liberación iónica, lo que explica la mejora en la mayoría de las muestras bajo estas condiciones de calcinación. Como lo demuestra Le Ouay & Stellacci en su estudio,¹⁷⁸ la actividad antibacteriana de las NP de plata no depende únicamente de la presencia del núcleo metálico, sino fundamentalmente de los procesos que ocurren en su superficie, particularmente la disolución oxidativa que conduce a la liberación de especies Ag⁺, consideradas los principales agentes responsables del efecto antimicrobiano.¹⁷⁶ En este sentido, los autores destacan que la eficacia de las AgNP es altamente sensible a la química superficial y a la presencia de especies en el medio que pueden modificar dicha disolución.¹⁷⁷

Este planteamiento es consistente con lo reportado por Xiu et al. (2012),¹⁷⁹ quienes demostraron que la actividad antibacteriana de las AgNP en medios acuosos está dominada por la fracción iónica liberada, más que por la NP en sí misma, sugiriendo además que

condiciones que restringen la liberación de Ag^+ reducen significativamente su efecto antimicrobiano.¹⁷⁶

De manera análoga a lo observado en las AgNP, en el caso de las ZnO-NP tras la calcinación, el tamaño hidrodinámico aumento a 451–744 nm, el potencial zeta indica que las partículas se aglomeran, lo que probablemente contribuyó a que los halos de inhibición disminuyeran a valores inferiores a 13.3 mm frente a *S. aureus* y entre 8–10 mm frente a *E. coli*, sin embargo, la superficie inorgánica sin recubrimiento de compuestos de las plantas podría favorecer la liberación de Zn^{2+} en ensayos con caldo de cultivo, ya que se observó que las MIC bajan a $0.156 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MBC $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en las tres muestras. En contraste, las ZnO-NP obtenidas a 60 °C presentaron tamaños hidrodinámicos menores (153–399 nm), valores de PDI relativamente más bajos y potenciales zeta más negativos (hasta -17.5 mV), lo que sugiere una mayor estabilidad coloidal y una mejor dispersión en el medio sólido, favoreciendo su difusión y contacto con las células bacterianas, y por ende halos de inhibición superiores en la difusión en disco.

No obstante, este comportamiento se invierte en condiciones de microdilución, donde la presencia de metabolitos residuales provenientes de los extractos vegetales puede actuar como agentes estabilizantes pero también como una barrera fisicoquímica que limita la disolución del ZnO y muy probablemente la liberación de Zn^{2+} .¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ En este sentido, la calcinación a 500 °C elimina en gran medida dichos compuestos orgánicos, exponiendo una superficie más reactiva que facilita los procesos de disolución y generación de especies iónicas en medio acuoso, lo que posiblemente incrementa la biodisponibilidad del Zn^{2+} y, por ende, su actividad antibacteriana.^{180,181} Este comportamiento ha sido reportado para óxidos metálicos,^{180–182} donde la liberación de iones y la generación de ROS constituyen los principales mecanismos de acción en sistemas líquidos, a diferencia de los ensayos en agar donde predominan factores como el tamaño, la agregación y la movilidad de las partículas. Como lo demuestra Raghupathi et al. (2011) en su estudio,¹⁸² la actividad antibacteriana de las ZnO-NP está asociada principalmente a la interacción directa con la superficie bacteriana y a la generación de ROS, mientras que la liberación de Zn^{2+} en solución es limitada bajo condiciones acuosas. En este contexto, es razonable plantear que la presencia de metabolitos residuales provenientes de los extractos vegetales en las ZnO-NP obtenidas a 60 °C tal como

en AgNP actúan como una barrera fisicoquímica que puede modificar la interacción superficial del material con el medio y con las células bacterianas. Únicamente **Zn-Ij-500** pierde este beneficio: su tamaño hidrodinámico de 744 nm y PDI 0.585 forman agregados densos que duplican la MIC.

Por su parte, las CuO-NP confirman que el tamaño, la dispersión y la solubilidad deben coincidir para lograr una acción eficaz. A 60 °C no se observaron halos de inhibición, lo cual se asoció a su baja solubilidad y limitada liberación de iones Cu^{2+} , lo cual restringe la difusión en la matriz gelificada e impide la interacción electrostática con la pared celular de las bacterias evaluadas.¹⁸³ Su tamaño hidrodinámico (173–251 nm) y potencial zeta (–14 a –20 mV) indicaron una dispersión moderada; no obstante, en la técnica de microdilución **Cu-Ij-60** y **Cu-Hr-60** mostraron actividad bactericida con MIC/MBC de 1.25/2.5–5 mg·mL⁻¹, atribuida a partículas de 22–32 nm y mayor solubilidad iónica.¹⁸⁴ Al calcinar, el tamaño hidrodinámico superó 300 nm, la sinterización redujo defectos Cu–O y las MIC aumentaron a 5–10 mg·mL⁻¹, perdiéndose el modo de acción bactericida salvo en **Cu-Ij-500**.¹⁸⁵ En conjunto, el incremento del tamaño hidrodinámico, asociado a una mayor tendencia a la agregación, la repulsión electrostática limitada y la quelación de Cu^{2+} justifican la ausencia de halos y las MIC elevadas, confirmando que en este material la proximidad partícula-célula en microdilución aumenta la solubilidad de Cu^{2+} y la actividad antibacteriana.

En conjunto, los datos demuestran que en medios sólidos la dispersión coloidal, caracterizada por tamaños hidrodinámicos bajos, PDI reducidos y potenciales zeta mayor a -10 mV, modula la respuesta antimicrobiana, mientras que en medios líquidos predomina la reactividad superficial, como la exposición de Ag^0 , superficie ZnO libre de recubrimiento orgánico o defectos estructurales en CuO. Este balance debe guiar la elección de temperatura de tratamiento y el origen del extracto vegetal para aplicaciones específicas, como las NP secadas a 60 °C son más adecuadas para usos tópicos, mientras que las calcinadas a 500 °C son más efectivas en medios fluidos, donde se favorece una mayor liberación iónica y actividad bactericida sostenida.¹⁸⁶ Si bien, el tipo de extracto y la temperatura son factores clave, otros elementos también juegan un papel importante en la actividad antibacteriana.

Estos resultados sugieren que, aunque el tratamiento térmico puede reducir el tamaño de las zonas de inhibición en el ensayo de difusión de AgNP y ZnO-NP (sin generar diferencias

estadísticamente significativas), la interacción directa partícula–bacteria evaluada mediante microdilución puede verse favorecida en determinadas condiciones experimentales, reflejándose en una mayor acción bactericida.¹²⁵ En este sentido, la conservación de tamaños efectivos pequeños y distribuciones de tamaño homogéneas (bajos valores de PDI) constituye un factor relevante para optimizar la actividad antibacteriana, condición que se observó con mayor claridad en las AgNP sintetizadas con extracto de *A. arvensis* a 60 °C.

Las correlaciones de Pearson respaldan estas tendencias. En las AgNP, la temperatura se asoció con un incremento del tamaño de cristalito ($r = 0.962$) y del tamaño de partícula ($r = 0.867$), mientras que el tamaño hidrodinámico mostró una correlación negativa con el halo de inhibición frente a *S. aureus* ($r = -0.854$). Este comportamiento sugiere que el aumento del tamaño efectivo de partícula podría limitar su dispersión y su alcance de interacción en el medio sólido, influyendo indirectamente en la magnitud de la zona de inhibición observada.¹⁸² Por su parte, ZnO-NP mostraron que la temperatura incrementa el tamaño hidrodinámico ($r = 0.804$) y reduce el potencial zeta ($r = 0.894$), factores que explican la disminución de halos a 500 °C, aunque la MIC frente a *E. coli* disminuyó drásticamente ($r = -1.000$) gracias a la mayor liberación de Zn^{2+} en caldo. En CuO-NP, la calcinación incrementó simultáneamente el tamaño hidrodinámico ($r = 0.888$) y el cristalito ($r = 0.988$), reduciendo defectos reactivos; mientras que los flavonoides se correlacionen positivamente con el potencial zeta ($r = 0.850$), lo que coincide con la mejor estabilidad y actividad de **Cu-Ij-60** y **Cu-Ij-500**. En conjunto, estos coeficientes reafirman que la temperatura modula tanto la arquitectura cristalina como la estabilidad coloidal y, por ende, la bioactividad observable.^{187,188}

En general, aunque las NP exhibieron actividad antibacteriana, su efectividad fue generalmente inferior a la de la amikacina, que presentó zonas de inhibición significativamente mayores (21 mm contra *E. coli* y 16 mm contra *S. aureus*). La amikacina, un antibiótico convencional, tiene un mecanismo de acción específico que interfiere directamente con la síntesis proteica bacteriana, lo cual es altamente eficiente.^{197,198} No obstante, su uso clínico también presenta limitaciones importantes, como el riesgo de nefrotoxicidad y ototoxicidad, la necesidad de administración controlada y la posible aparición de cepas resistentes.^{189,190} En contraste, las NP actúan mediante mecanismos menos

específicos, como la generación de ROS, la alteración de la integridad la membrana bacteriana y la liberación de iones metálicos.¹⁹¹ Si bien estos mecanismos pueden ser efectivos, son más dependientes de las condiciones del medio y de la composición de la superficie de las NP, lo que puede explicar su menor actividad comparativa.¹⁹² No obstante, las NP ofrecen ventajas como la posibilidad de usarse en combinación con antibióticos para reducir la resistencia bacteriana.^{193–195}

En conjunto, los resultados obtenidos permiten evidenciar que tanto la composición fitoquímica de los extractos como la temperatura de tratamiento térmico influyen de manera significativa en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las NP sintetizadas. No obstante, dicha influencia no sigue un comportamiento lineal ni uniforme entre sistemas, sino que depende de la interacción específica entre el tipo de extracto, el metal precursor y las condiciones de síntesis. Si bien el tratamiento a 60 °C favoreció en general la obtención de NP de menor tamaño, con mayor recubrimiento orgánico y mejor estabilidad coloidal, las muestras calcinadas a 500 °C mostraron, en diversos casos, una mayor eficacia antibacteriana, posiblemente asociada a una mayor cristalinidad y disponibilidad superficial de especies activas. Estos hallazgos indican que la relación entre las condiciones de síntesis y las propiedades finales de las NP es de carácter multifactorial, por lo que la hipótesis planteada se cumple de manera parcial y debe interpretarse en función del sistema específico evaluado.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Este estudio demostró que los extractos acuosos de *A. arvensis*, *H. rovirosae* e *I. jinicuil* permiten la síntesis bioasistida de NP de Ag, ZnO y CuO, cuyas propiedades fisicoquímicas y antibacterianas son moduladas por la composición fitoquímica y las condiciones de tratamiento térmico.

El tratamiento térmico a 500 °C incrementó la cristalinidad y la liberación iónica en medios líquidos, pero también provocó mayor crecimiento de partícula, pérdida de recubrimientos orgánicos y reducción de la estabilidad coloidal, efectos que disminuyeron la movilidad en medios sólidos y redujo las zonas de inhibición. En contraste, las muestras secadas a 60 °C mantuvieron menores tamaños hidrodinámicos, distribuciones más homogéneas (PDI bajos) y potencial zeta más negativo, condiciones que favorecieron la difusión y la interacción bacteriana en el ensayo de disco-difusión.

La actividad antibacteriana estuvo fuertemente influenciada por el extracto vegetal, destacando *I. jinicuil* como el más eficiente para generar halos amplios y bajas concentraciones mínimas inhibitorias, tanto en AgNP como en ZnO-NP. En CuO-NP, la actividad antibacteriana se observó únicamente en el método de microdilución, donde la proximidad partícula-célula probablemente favoreció la solubilidad iónica.

En todos los casos, las NP mostraron menor efectividad que la amikacina, lo que confirma que, si bien su posible mecanismo de acción múltiple (que aunque no fue evaluado, los reportados por la literatura para estos materiales son: ROS, liberación iónica, alteración de membrana) es efectivo, depende más de la composición superficial y de las condiciones del medio que un antibiótico convencional. No obstante, su potencial radica en la posibilidad de optimizar su diseño para aplicaciones específicas y, especialmente, en su uso combinado con antibióticos para potenciar la eficacia y reducir el riesgo de resistencia bacteriana.

En términos generales, *A. arvensis* mostró un desempeño fisicoquímico más consistente, favoreciendo mayores rendimientos de síntesis y la obtención de NP con tamaños más pequeños y distribuciones de tamaño más homogéneas. No obstante, *I. jinicuil* destacó por su mayor actividad antibacteriana, atribuida a una estabilidad coloidal relativamente superior asociada a su composición fitoquímica. En conjunto, estos resultados indican que la selección

del extracto vegetal puede orientarse en función de la propiedad objetivo del nanomaterial, ya sea estructural o biofuncional.

No obstante, la ausencia de correlación lineal entre el contenido total de polifenoles y algunos parámetros estructurales sugiere la conveniencia de profundizar en la identificación molecular de los metabolitos clave mediante técnicas como HPLC-MS o UHPLC-QTOF, con el fin de dilucidar mecanismos de nucleación y recubrimiento que influyen sobre la síntesis y la funcionalidad de las NP.

En términos de aplicación, los resultados obtenidos sugieren que estas NP pueden ser potencialmente aplicadas en el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos funcionales en superficies inertes, particularmente en contextos donde la proliferación microbiana representa un problema sanitario o ambiental. Por ejemplo, su incorporación en recubrimientos para materiales cerámicos (azulejos y mosaicos), con el objetivo de evaluar su eficacia en la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias asociados al síndrome del edificio enfermo, así como su estabilidad y durabilidad bajo condiciones de humedad y uso prolongado.

Asimismo, estas NP podrían aplicarse en recubrimientos protectores para embarcaciones, donde la actividad antimicrobiana y antifouling permitiría reducir la colonización biológica en superficies expuestas a ambientes acuáticos, contribuyendo a disminuir procesos de bioincrustación. En el ámbito hospitalario, se vislumbra su uso en superficies de contacto frecuente (paredes, pisos, mobiliario), donde podrían actuar como agentes complementarios en la reducción de cargas microbianas y en el control de infecciones nosocomiales, particularmente mediante estrategias combinadas con antibióticos. Finalmente, se plantea su aplicación en tratamiento de aguas a escala piloto, especialmente en el marco de proyectos de formación científica, evaluando su capacidad bactericida en sistemas controlados. Estas líneas de investigación permitirán no solo validar el desempeño de las NP en condiciones reales, sino también optimizar su diseño en función del tipo de aplicación, integrando variables como estabilidad coloidal, adherencia a superficies y liberación controlada de especies activas.

BIBLIOGRAFÍA

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Gallegos-García, A. J.; Lobato-García, C. E.; González-Cortazar, M.; Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; Álvarez-Fitz, P.; Pérez-García, M. D.; López-Rodríguez, R.; Ble-González, E. A.; Medrano-Sánchez, E. J.; Feldman, M. R.; Bugarin, A.; Gómez-Rivera, A. Preliminary Phytochemical Profile and Bioactivity of *Inga jinicuil* Schltdl & Cham. Ex G. Don. *Plants* **2022**, *11* (6), 754.
- (2) Ble-González, E. A.; Gómez-Rivera, A.; Zamilpa, A.; López-Rodríguez, R.; Lobato-García, C. E.; Álvarez-Fitz, P.; Gutierrez-Roman, A. S.; Perez-García, M. D.; Bugarin, A.; González-Cortazar, M. Ellagitannin, Phenols, and Flavonoids as Antibacterials from *Acalypha arvensis* (Euphorbiaceae). *Plants* **2022**, *11* (3), 322.
- (3) Iravani, S. Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Green Chem.* **2011**, *13* (10), 2638–2650.
- (4) Mittal, A. K.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Extracts. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (2), 346–356.
- (5) Makarov, V. V.; Love, A. J.; Sinitsyna, O. V.; Makarova, S. S.; Yaminsky, I. V.; Tiliansky, M. E.; Kalinina, N. O. "Green" Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae* **2014**, *6* (1), 35–44.
- (6) Ghaffari-Moghaddam, M.; Hadi-Dabanlou, R.; Khajeh, M.; Rakhshanipour, M.; Shameli, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, *31* (4), 548–557.
- (7) Acharya, C.; Mishra, S.; Chaurasia, S. K.; Pandey, B. K.; Dhar, R.; Pandey, J. K. Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Biometabolites: Mechanisms and Applications. *Biometals* **2024**, *37* (1), 1–25.
- (8) Marslin, G.; Siram, K.; Maqbool, Q.; Selvakesavan, R. K.; Kruszka, D.; Kachlicki, P.; Franklin, G. Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Materials* **2018**, *11* (6), 940.
- (9) Jadoun, S.; Arif, R.; Jangid, N. K.; Meena, R. K. Green Synthesis of Nanoparticles Using Plant Extracts: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19* (1), 355–374.
- (10) Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos> (consultado el 25 de enero de 2025).
- (11) Salem, S. S.; Fouda, A. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: An Overview. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, *199* (1), 344–370.
- (12) Akhras, N.; Çelekli, A.; Bozkurt, H. Influence of Calcination Temperature on the Structure and Antimicrobial Properties of *Arthrospira platensis*-Mediated Zinc Oxide Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2025**, *17* (1), 11.

- (13) Elshazly, E. H.; Abd elfadeel, G.; Yang, L.; Li, X.; Ewais, E. A.; Sadek, A. M.; Taha, T. M.; Fathy, O.; Atta, O. M.; Liu, W. Z. Sustainable Biosynthesis, Physiochemical Characterization, Cytotoxicity, and Antimicrobial Evaluation of Novel Chromium Oxide Nanoparticles. *Front. Chem.* **2025**, *13*, 1584199.
- (14) González-Fernández, S.; Lozano-Iturbe, V.; García, B.; Andrés, L. J.; Menéndez, M. F.; Rodríguez, D.; Vazquez, F.; Martín, C.; Quirós, L. M. Antibacterial Effect of Silver Nanorings. *BMC Microbiol.* **2020**, *20* (1), 171.
- (15) Sharma, S.; Kumar, K.; Thakur, N.; Chauhan, S.; Chauhan, M. S. The Effect of Shape and Size of ZnO Nanoparticles on Their Antimicrobial and Photocatalytic Activities: A Green Approach. *Bull. Mater. Sci.* **2020**, *43* (1), 20.
- (16) Naghdi, S.; Sajjadi, M.; Nasrollahzadeh, M.; Rhee, K. Y.; Sajadi, S. M.; Jaleh, B. *Cuscuta reflexa* Leaf Extract Mediated Green Synthesis of the Cu Nanoparticles on Graphene Oxide/Manganese Dioxide Nanocomposite and Its Catalytic Activity toward Reduction of Nitroarenes and Organic Dyes. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2018**, *86*, 158–173.
- (17) Akintelu, S. A.; Oyebamiji, A. K.; Olugbeko, S. C.; Latona, D. F. Green Chemistry Approach towards the Synthesis of Copper Nanoparticles and Its Potential Applications as Therapeutic Agents and Environmental Control. *Curr. Res. Green Sustainable Chem.* **2021**, *4*, 100176.
- (18) Mali, S. C.; Dhaka, A.; Githala, C. K.; Trivedi, R. Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using *Celastrus paniculatus* Willd. Leaf Extract and Their Photocatalytic and Antifungal Properties. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *27*, e00518.
- (19) Pang, Z.; Chen, J.; Wang, T.; Gao, C.; Li, Z.; Guo, L.; Xu, J.; Cheng, Y. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 621276.
- (20) Seca, A. M. L.; Pinto, D. C. G. A. Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. *Medicines* **2019**, *6* (2), 66.
- (21) Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Raja, S. S. S.; Vijayakumar, R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*; Vijayakumar, R., Raja, S. S. S., Eds.; IntechOpen, 2018; pp 3–21.
- (22) Savithramma, N.; Rao, M. L.; Suhrulatha, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *Middle-East J. Sci. Res.* **2011**, *8* (3), 579–584.
- (23) Jain, C.; Khatana, S.; Vijayvergia, R. Bioactivity of Secondary Metabolites of Various Plants: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2019**, *10* (2), 494–504.
- (24) Kamran, S.; Sinniah, A.; Abdulghani, M. A. M.; Alshawsh, M. A. Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers* **2022**, *14* (5), 1100.

- (25) Barredo Hernández, C. O. Perfil fitoquímico mediante técnicas cromatográficas de extractos orgánicos de *Hampea rovirosae* Standl. Tesis de Licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México, 2023.
- (26) Giovannini, P.; Howes, M. J. R. Medicinal Plants Used to Treat Snakebite in Central America: Review and Assessment of Scientific Evidence. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *199*, 240–256.
- (27) Jones, R. W.; Cruz-Torres, M. F.; Duarte-Fernández, M. A. Phylogenetic Analysis of the Genus *Hampea* (Malvales: Malvaceae: Gossypieae). *An. Inst. Biol., Ser. Bot.* **1992**, *63* (1), 1–11.
- (28) Jones, R. W.; Cruz-Torres, M. F.; López-González, C.; Duarte-Fernández, M. A. Conservation Status of the Genus *Hampea* (Malvaceae: Gossypieae) in Mexico. *Bot. Sci.* **2018**, *96* (3), 426–442.
- (29) Vargas Simón, G.; Pire, R. *Inga jinicuil* Schltdl. Árbol multiuso; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco: Villahermosa, Tabasco, México, 2017.
- (30) Vargas, G.; Pire, R. Correlación entre las características morfológicas del fruto y las semillas de cuijinicuil (*Inga jinicuil* Schltdl y Cham. ex. G. Don.). *Proc. Interam. Soc. Trop. Hortic.* **2014**, *55*, 82–84.
- (31) Murjani, B. O.; Kadu, P. S.; Bansod, M.; Vaidya, S. S.; Yadav, M. D. Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Current Status, Promises, and Challenges. *Carbon Lett.* **2022**, *32* (5), 1207–1226.
- (32) Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (1), 76–83.
- (33) Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B. Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical and Biological Methods. *Res. Pharm. Sci.* **2014**, *9* (6), 385–406.
- (34) Keat, C. L.; Aziz, A.; Eid, A. M.; Elmarzugli, N. A. Biosynthesis of Nanoparticles and Silver Nanoparticles. *Bioresour. Bioprocess.* **2015**, *2* (1), 47.
- (35) Kulak, M.; Gulmez Samsa, C. Flavonoids Mediated Nanomaterials Synthesis, Characterization, and Their Applications. In *Secondary Metabolites Based Green Synthesis of Nanomaterials and Their Applications*; Springer Nature Singapore, 2023; pp 49–65.
- (36) Sahu, N.; Soni, D.; Chandrashekhar, B.; Satpute, D. B.; Saravanadevi, S.; Sarangi, B. K.; Pandey, R. A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Flavonoids: Hesperidin, Naringin and Diosmin, and Their Antibacterial Effects and Cytotoxicity. *Int. Nano Lett.* **2016**, *6* (3), 173–181.

- (37) Tene, T.; Bellucci, S.; Pachacama, J. et al. A Facile and Green Approach for the Preparation of Silver Nanoparticles on Graphene Oxide with Favorable Antibacterial Activity. *Nanomaterials* **2024**, *14* (17), 1455.
- (38) Azizi, S.; Mohamad, R.; Shahri, M. M.; McPhee, D. J. Green Microwave-Assisted Combustion Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: Characterization and Biomedical Applications. *Molecules* **2017**, *22* (2), 301.
- (39) Nasrollahzadeh, M.; Sajadi, S. M.; Rostami-Vartooni, A.; Hussin, S. M. Green Synthesis of CuO Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Thymus vulgaris* L. Leaves and Their Catalytic Performance for N-Arylation of Indoles and Amines. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *466*, 113–119.
- (40) Nasrollahzadeh, M.; Sajadi, S. M.; Maham, M. *Tamarix gallica* Leaf Extract Mediated Novel Route for Green Synthesis of CuO Nanoparticles and Their Application for N-Arylation of Nitrogen-Containing Heterocycles under Ligand-Free Conditions. *RSC Adv.* **2015**, *5* (51), 40628–40635.
- (41) Marslin, G.; Selvakesavan, R. K.; Franklin, G.; Sarmiento, B.; Dias, A. C. Antimicrobial Activity of Cream Incorporated with Silver Nanoparticles Biosynthesized from *Withania somnifera*. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 5955–5963.
- (42) Ahmad, N.; Sharma, S.; Alam, M. K.; Singh, V. N.; Shamsi, S. F.; Mehta, B. R.; Fatma, A. Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles Using Dried Medicinal Plant of Basil. *Colloids Surf., B* **2010**, *81* (1), 81–86.
- (43) Elumalai, K.; Velmurugan, S. Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activities of Zinc Oxide Nanoparticles from the Leaf Extract of *Azadirachta indica* (L.). *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *345*, 329–336.
- (44) Diallo, A.; Ngom, B. D.; Park, E.; Maaza, M. Green Synthesis of ZnO Nanoparticles by *Aspalathus linearis*: Structural & Optical Properties. *J. Alloys Compd.* **2015**, *646*, 428–435.
- (45) Ball, V. Is the Interfacial Electrochemical Behavior of Quercetin the Same as That of Catechol Plus Resorcinol? *Surfaces* **2024**, *7* (3), 653–665.
- (46) Ziyatdinova, G.; Chernousova, N. Sensitive Voltammetric Sensor for Thymol and Carvacrol Based on the Electropolymerized Thymolphtalein. *Eng. Proc.* **2022**, *31* (1), 60.
- (47) Honda, T.; Takemura, K.; Matsumae, S. et al. Quantification of Caffeine in Coffee Cans Using Electrochemical Measurements, Machine Learning, and Boron-Doped Diamond Electrodes. *PLoS One* **2024**, *19* (3), e0298331.
- (48) Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (22), 4916–4922.

- (49) Dobes, J.; Zitka, O.; Sochor, J. et al. Electrochemical Tools for Determination of Phenolic Compounds in Plants: A Review. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, 8 (4), 4520–4542.
- (50) Bard, A. J.; Parsons, R.; Jordan, J. *Standard Potentials in Aqueous Solutions*; Marcel Dekker: New York, 1985.
- (51) Okaiyeto, K.; Ojemaye, M. O.; Hoppe, H.; Mabinya, L. V.; Okoh, A. I. Phytofabrication of Silver/Silver Chloride Nanoparticles Using Aqueous Leaf Extract of *Oedera genistifolia*: Characterization and Antibacterial Potential. *Molecules* **2019**, 24 (23), 4382.
- (52) Hassan, K. T.; Ibraheem, I. J.; Hassan, O. M. et al. Facile Green Synthesis of Ag/AgCl Nanoparticles Derived from *Chara* Algae Extract and Evaluating Their Antibacterial Activity and Synergistic Effect with Antibiotics. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, 9 (4), 105359.
- (53) Alshgari, R. A.; Ujjan, Z. A.; Shah, A. A. et al. ZnO Nanostructures Doped with Various Chloride Ion Concentrations for Efficient Photocatalytic Degradation of Methylene Blue in Alkaline and Acidic Media. *Molecules* **2022**, 27 (24), 8726.
- (54) Sanjini, N. S.; Winston, B.; Velmathi, S. Effect of Precursors on the Synthesis of CuO Nanoparticles under Microwave for Photocatalytic Activity towards Methylene Blue and Rhodamine B Dyes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2017**, 17 (1), 495–501.
- (55) Banerjee, P.; Satapathy, M.; Mukhopahayay, A.; Das, P. Leaf Extract Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Widely Available Indian Plants: Synthesis, Characterization, Antimicrobial Property and Toxicity Analysis. *Bioresour. Bioprocess.* **2014**, 1 (1), 3.
- (56) Selvaraj, V.; Sagadevan, S.; Muthukrishnan, L.; Johan, M. R.; Podder, J. Eco-Friendly Approach in Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Optical, Surface Morphological and Antimicrobial Properties. *J. Nanostructure Chem.* **2019**, 9 (2), 153–162.
- (57) Khanal, L. N.; Sharma, K. R.; Paudyal, H.; Parajuli, K.; Dahal, B.; Ganga, G. C.; Pokharel, Y. R.; Kalauni, S. K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Root Extracts of *Rubus ellipticus* Sm. and Comparison of Antioxidant and Antibacterial Activity. *J. Nanomater.* **2022**, 2022, 1832587.
- (58) Bala, N.; Saha, S.; Chakraborty, M.; Maiti, M.; Das, S.; Basu, R.; Nandy, P. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Hibiscus subdariffa* Leaf Extract: Effect of Temperature on Synthesis, Anti-Bacterial Activity and Anti-Diabetic Activity. *RSC Adv.* **2015**, 5 (7), 4993–5003.
- (59) Selim, Y. A.; Azb, M. A.; Ragab, I.; Abd El-Azim, M. H. M. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Deverra tortuosa* and Their Cytotoxic Activities. *Sci. Rep.* **2020**, 10 (1), 3445.

- (60) López-González, R.; Gutiérrez, M. H.; García, R. L.; Gómez-Cornelio, S. A.; Lobato, C.; Gómez-Rivera, A.; Quintana-Owen, P.; Alvarez-Lemus, M. A. ZnO Nanomaterials with Enhanced Antimicrobial Activity Obtained by *Eichhornia crassipes* Aqueous Extract-mediated Synthesis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2024**, *99* (6), 1438–1448.
- (61) Sivaraj, R.; Rahman, P. K. S. M.; Rajiv, P.; Salam, H. A.; Venckatesh, R. Biogenic Copper Oxide Nanoparticles Synthesis Using *Tabernaemontana divaricata* Leaf Extract and Its Antibacterial Activity against Urinary Tract Pathogen. *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *133*, 178–181.
- (62) Melkamu, W. W.; Feleke, E. G. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Leaf Extract of *Justicia schimperiana* and Their Antibacterial Activity. *Res. Sq.* **2022**.
- (63) Turakhia, B.; Divakara, M. B.; Santosh, M. S.; Shah, S. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles: A Promising Approach in the Development of Antibacterial Textiles. *J. Coat. Technol. Res.* **2020**, *17* (2), 531–540.
- (64) Riwayati, I.; Winardi, S.; Madhania, S.; Shimada, M.; Kusdianto. Green Synthesis of ZnO Nanoparticles Using *Cosmos caudatus*: Effects of Calcination Temperature and Precursor Type on Photocatalytic and Antimicrobial Activities. *Results Eng.* **2024**, *24*, 103594.
- (65) Baba, I. A.; Abdulkareem, A. S.; Oladejo, T. J. Biogenic ZnO Nanoparticles from *Ixora coccinea*: Effect of Calcination on Selected Heavy Metal Removal from Brackish Water. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage.* **2026**, *25*, 101114.
- (66) El-Beltagi, H. S.; Ragab, M.; Osman, A.; El-Masry, R. A.; Alwutayd, K. M.; Althagafi, H.; Alqahtani, L. S.; Alazragi, R. S.; Alhajri, A. S.; El-Saber, M. M. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles via Neem Extract and Their Anticancer and Antibacterial Activities. *PeerJ* **2024**, *12*, e17588.
- (67) Khan, J.; Naseem, I.; Bibi, S.; Ahmad, S.; Altaf, F.; Hafeez, M.; Almoneef, M. M.; Ahmad, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) Using *Debregeasia salicifolia* for Biological Applications. *Materials* **2023**, *16* (1), 129.
- (68) Siakavella, I. K.; Lamari, F.; Papoulis, D.; Orkoula, M.; Gkolfi, P.; Lykouras, M.; Avgoustakis, K.; Hatziantoniou, S. Effect of Plant Extracts on the Characteristics of Silver Nanoparticles for Topical Application. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (12), 1244.
- (69) Abdollahzadeh, H.; Pazhang, Y.; Zamani, A.; Sharafi, Y. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Walnut Shell and Their Size Dependent Anticancer Effects on Breast and Colorectal Cancer Cell Lines. *Sci. Rep.* **2024**, *14* (1), 20323.
- (70) Geremew, A.; Palmer, L.; Johnson, A.; Reeves, S.; Brooks, N.; Carson, L. Multi-Functional Copper Oxide Nanoparticles Synthesized Using *Lagerstroemia indica* Leaf Extracts and Their Applications. *Heliyon* **2024**, *10* (9), e30178.

- (71) Saikumari, N.; Dev, S. M.; Dev, S. A. Effect of Calcination Temperature on the Properties and Applications of Bio Extract Mediated Titania Nano Particles. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1734.
- (72) Fakhredin, M.; Shariatmadar Tehrani, F.; Aliannezhadi, M. pH and Temperature Influences on Eco-Friendly Synthesized Copper Oxide Nanoparticles Using Clove Extract for Brain Cancer Treatment. *Results Phys.* **2026**, *80*, 108541.
- (73) Prayitno, B.; Musyarofah; Tajalla, G. U. N.; Nafisah, A. R.; Norhidayah, S.; Kartika, S. A. The Effect of Calcination Temperature and Holding Time on Structural Properties of Calcia Powders Derived from Eggshell Waste. *Indones. Phys. Rev.* **2025**, *8* (1), 281–299.
- (74) Lee, S. H.; Jun, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (4), 865.
- (75) Wan Mat Khalir, W. K. A.; Shameli, K.; Jazayeri, S. D.; Othman, N. A.; Che Jusoh, N. W.; Hassan, N. M. Biosynthesized Silver Nanoparticles by Aqueous Stem Extract of *Entada spiralis* and Screening of Their Biomedical Activity. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 620.
- (76) Mudhafar, M.; Zainol, I.; A.J., A.; Abd, M. Y.; Alsailawi, H. A.; Ghazaly, N. M.; Hussein, R. M.; Zorah, M. The Effect of Fish Collagen on the Silver Nanoparticles Sizes and Shapes Using Modified Microwave-Assisted Green Synthesis Method and Their Antibacterial Activities. *Heliyon* **2024**, *10* (12), e32837.
- (77) González, A. L.; Noguez, C. Influence of Morphology on the Optical Properties of Metal Nanoparticles. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **2006**, *3* (5), 603–617.
- (78) Álvarez Macías, C. Estudio de las propiedades optoelectrónicas y de la fotodegradación de películas delgadas de silicio polimorfo. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, 2013.
- (79) Bin Ali, M.; Iftikhar, T.; Majeed, H. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles for the Industrial Biofortification of (*Pleurotus pulmonarius*) Mushrooms. *Heliyon* **2024**, *10* (19), e37927.
- (80) Aroob, S.; Carabineiro, S. A. C.; Taj, M. B. et al. Green Synthesis and Photocatalytic Dye Degradation Activity of CuO Nanoparticles. *Catalysts* **2023**, *13* (3), 502.
- (81) Mageshwari, K.; Sathyamoorthy, R. Organic Free Synthesis of Flower-like Hierarchical CuO Microspheres by Reflux Condensation Approach. *Appl. Nanosci.* **2013**, *3* (2), 161–166.
- (82) Kolahalam, L. A.; Prasad, K. R. S.; Krishna, P. M.; Supraja, N.; Shanmugan, S. The Exploration of Bio-Inspired Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and in-Vitro Biological Investigations. *Heliyon* **2022**, *8* (6), e09726.

- (83) Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2–3), 157–170.
- (84) Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767* (9), 1073–1101.
- (85) Griffiths, P. R. Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Science* **1983**, *222* (4621), 297–302.
- (86) PAM-XIAMEN. ¿Cuál es la prueba de espectroscopía infrarroja de transformación de Fourier (FTIR)? <https://www.powerwaywafer.com/es/ftir.html> (consultado el 11 de agosto de 2025).
- (87) Taha, M.; Hassan, M.; Essa, S.; Tartor, Y. Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Spectroscopy for Rapid and Accurate Identification of Yeasts Isolated from Human and Animals. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2013**, *1* (1), 15–20.
- (88) Titus, D.; Samuel, E. J. J.; Roopan, S. M. Nanoparticle Characterization Techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*; Elsevier, 2018; pp 303–319.
- (89) Cullity, B. D.; Stock, S. R. *Elements of X-Ray Diffraction*, 3rd ed.; Pearson Education Limited: Harlow, U.K., 2014.
- (90) Giannini, C.; Ladisa, M.; Altamura, D.; Siliqi, D.; Sibillano, T.; De Caro, L. X-Ray Diffraction: A Powerful Technique for the Multiple-Length-Scale Structural Analysis of Nanomaterials. *Crystals* **2016**, *6* (8), 87.
- (91) Askeland, D. R.; Wright, W. J. *Ciencia e ingeniería de materiales*, 7ª ed.; Cengage Learning: Ciudad de México, 2017.
- (92) Kabekkodu, S. N.; Dosen, A.; Blanton, T. N. PDF-5+; A Comprehensive Powder Diffraction File for Materials Characterization. *Powder Diffr.* **2024**, *39* (2), 73–78.
- (93) Patterson, A. L. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. *Phys. Rev.* **1939**, *56* (10), 978–982.
- (94) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409–427.
- (95) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*; Dover Publications: Mineola, NY, 2000.
- (96) Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57* (11), 4814–4820.
- (97) Farkas, N.; Kramar, J. A. Dynamic Light Scattering Distributions by Any Means. *J. Nanopart. Res.* **2021**, *23* (5), 120.

- (98) Maguire, C. M.; Rösslein, M.; Wick, P.; Prina-Mello, A. Characterisation of Particles in Solution – A Perspective on Light Scattering and Comparative Technologies. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2018**, *19* (1), 732–745.
- (99) Malm, A. V.; Corbett, J. C. W. Improved Dynamic Light Scattering Using an Adaptive and Statistically Driven Time Resolved Treatment of Correlation Data. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 13587.
- (100) Xu, R. Progress in Nanoparticles Characterization: Sizing and Zeta Potential Measurement. *Particuology* **2008**, *6* (2), 112–115.
- (101) Malvern Instruments Ltd. *Zetasizer Nano User Manual*, MAN0485, Issue 1.1; Worcestershire, U.K., 2013.
- (102) Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *309* (2), 194–224.
- (103) Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W. M.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C. Scanning Electron Microscope (SEM) Instrumentation. In *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*; Springer: New York, 2018; pp 65–91.
- (104) Joshi, M.; Bhattacharyya, A.; Ali, S. W. Characterization Techniques for Nanotechnology Applications in Textiles. *Indian J. Fibre Text. Res.* **2008**, *33* (3), 304–317.
- (105) Havrdova, M.; Polakova, K.; Skopalik, J.; Vujtek, M.; Mokdad, A.; Homolkova, M.; Tucek, J.; Nebesarova, J.; Zboril, R. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) as an Approach for Nanoparticle Detection inside Cells. *Micron* **2014**, *67*, 149–154.
- (106) Fernández Martínez, P. Partes del microscopio electrónico. <https://www.microscopioelectronico.top/partes-del-microscopio-electronico/> (consultado el 9 de agosto de 2025).
- (107) Inkson, B. J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*; Hübschen, G., Irisarri, I. K., Ed.; Woodhead Publishing, 2016; pp 17–43.
- (108) Brodusch, N.; Demers, H.; Gauvin, R. Electron Diffraction Techniques in the SEM. In *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*; Springer: Singapore, 2018; pp 85–105.
- (109) Brito, J. L. Análisis superficial de muestras sólidas: Análisis químico cualitativo y cuantitativo mediante XPS. <https://www.slideserve.com/erma/> (consultado el 9 de agosto de 2025).

- (110) Korin, E.; Froumin, N.; Cohen, S. Surface Analysis of Nanocomplexes by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, 3 (6), 882–889
- (111) Baer, D. R.; Engelhard, M. H. XPS Analysis of Nanostructured Materials and Biological Surfaces. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2010**, 178–179, 415–432.
- (112) Bhardwaj, N.; Puri, S.; Kumari, A.; Chauhan, A.; Kumar, A. Investigation on Antioxidant, Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Neuropsychiatry Potential of Phyto-Mediated ZnONPs Using *Colebrookea oppositifolia*. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2024**, 97, 105748.
- (113) Yusuf-Omoloye, N. A.; Adeyemi, F. M.; Sule, W. F.; Azeez, L.; Oyedara, O. O.; Wahab, A. A.; Ajigbewu, O. H.; Lateef, A. Green-Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of *Azanza garckeana* Seed Extract Silver Nanoparticles against Vancomycin-Resistant Enterococci. *Next Nanotechnol.* **2024**, 6, 100035.
- (114) Irfan, M.; Munir, H.; Ismail, H. *Moringa oleifera* Gum Based Silver and Zinc Oxide Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization and Their Antibacterial Potential against MRSA. *Biomater. Res.* **2021**, 25 (1), 17.
- (115) Khairy, T.; Amin, D. H.; Salama, H. M. et al. Antibacterial Activity of Green Synthesized Copper Oxide Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. *Sci. Rep.* **2024**, 14 (1), 24147.
- (116) Salam, M. A.; Al-Amin, M. Y.; Pawar, J. S.; Akhter, N.; Lucy, I. B. Conventional Methods and Future Trends in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Saudi J. Biol. Sci.* **2023**, 30 (3), 103582.
- (117) Perez-Gavilan, A.; de Castro, J. V.; Arana, A. et al. Antibacterial Activity Testing Methods for Hydrophobic Patterned Surfaces. *Sci. Rep.* **2021**, 11 (1), 6610.
- (118) Ngamsurachab, P.; Praipipat, P. Antibacterial Activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* of Extracted *Piper betle* Leaf Materials by Disc Diffusion Assay and Batch Experiments. *RSC Adv.* **2022**, 12 (41), 26435–26447.
- (119) Bovo, F.; Lazzarotto, T.; Ambretti, S.; Gaibani, P. Comparison of Broth Microdilution, Disk Diffusion and Strip Test Methods for Cefiderocol Antimicrobial Susceptibility Testing on KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics* **2023**, 12 (3), 614.
- (120) Vergalli, J.; Réfrégiers, M.; Ruggerone, P.; Winterhalter, M.; Pagès, J. M. Advances in Methods and Concepts Provide New Insight into Antibiotic Fluxes across the Bacterial Membrane. *Commun. Biol.* **2024**, 7 (1), 1335.
- (121) Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nat. Protoc.* **2008**, 3 (2), 163–175.

- (122) Petiti, J.; Revel, L.; Divieto, C. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors* **2024**, *14* (4), 156.
- (123) Lacuna, A. R. G.; Dato, M. C.; Loterio, L. M. M.; Dayrit, G. B.; Villanueva, S. Y. A. M.; Lota, M. M. M. In-Vitro Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Contact Time of Povidone-Iodine against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella aerogenes* Using Micro Suspension Test, Colorimetric Resazurin Microplate Assay, and Dey Engley Neutralizer Assay. *Acta Med. Philipp.* **2025**, *59* (4), 113.
- (124) Hoelzer, K.; Cummings, K. J.; Warnick, L. D.; Schukken, Y. H.; Siler, J. D.; Gröhn, Y. T.; Davis, M. A.; Besser, T. E.; Wiedmann, M. Agar Disk Diffusion and Automated Microbroth Dilution Produce Similar Antimicrobial Susceptibility Testing Results for *Salmonella* Serotypes Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i-, but Differ in Economic Cost. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8* (12), 1281–1288.
- (125) Soria-Castro, M.; De la Rosa-García, S. C.; Quintana, P.; Gómez-Cornelio, S.; Sierra-Fernandez, A.; Gómez-Ortiz, N. Broad Spectrum Antimicrobial Activity of $\text{Ca}(\text{Zn}(\text{OH})_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and ZnO Nanoparticles Synthesized by the Sol–Gel Method. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2019**, *89* (1), 284–294.
- (126) Wisniewski, S. J.; Brannan, G. D. Correlation (Coefficient, Partial, and Spearman Rank) and Regression Analysis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, 2024.
- (127) Razanamahandry, L. C.; Bashir, A. K. H.; Kaviyarasu, K.; Mekuto, L.; Ntwampe, S. K. O.; Maaza, M. Modelling Nanoparticles Parameters for Antimicrobial Activity. *MRS Advances* **2023**, *8*, 281–287.
- (128) Hajian, M. H.; Ghorbanpour, M.; Abtahi, F.; Hadian, J. Differential Effects of Biogenic and Chemically Synthesized Silver-Nanoparticles Application on Physiological Traits, Antioxidative Status and Californidine Content in California Poppy (*Eschscholzia californica* Cham). *Environ. Pollut.* **2022**, *292*, 118300.
- (129) Ershov, V. A.; Ershov, B. G. Effect of Silver Nanoparticle Size on Antibacterial Activity. *Toxics* **2024**, *12* (11), 801. <https://doi.org/10.3390/TOXICS12110801/S1>.
- (130) Schober, P.; Schwarte, L. A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth. Analg.* **2018**, *126* (5), 1763–1768.
- (131) Alós, J. I. Resistencia a los antibióticos: una crisis global. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, *33* (10), 692–699.
- (132) iSanidad. Estudio global: La resistencia antimicrobiana ya mata más que el sida, con 1,27 millones de muertes directas en 2019. <https://isanidad.com/205961/> (consultado el 6 de agosto de 2025).

- (133) OMS. Antimicrobial Resistance Expected to Cause 5.2 Million Deaths in the Western Pacific by 2030. <https://www.who.int/westernpacific/news/item/13-06-2023-antimicrobial-resistance-expected-to-cause-5.2-million-deaths-in-the-western-pacific-by-2030> (consultado el 6 de agosto de 2025).
- (134) Latif, M. S.; Abbas, S.; Kormin, F.; Mustafa, M. K. Green Synthesis of Plant-Mediated Metal Nanoparticles: The Role of Polyphenols. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2019**, *12* (7), 75–84.
- (135) Alhalili, Z. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles CuO NPs from *Eucalyptus globulus* Leaf Extract: Adsorption and Design of Experiments. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15* (5), 103739.
- (136) Ahmed, S.; Saifullah; Ahmad, M.; Swami, B. L.; Ikram, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Azadirachta indica* Aqueous Leaf Extract. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2016**, *9* (1), 1–7.
- (137) Tănase, M. A.; Marinescu, M.; Oancea, P. et al. Antibacterial and Photocatalytic Properties of ZnO Nanoparticles Obtained from Chemical versus *Saponaria officinalis* Extract-Mediated Synthesis. *Molecules* **2021**, *26* (7), 2072.
- (138) Phiwdang, K.; Suphankij, S.; Mekprasart, W.; Pecharapa, W. Synthesis of CuO Nanoparticles by Precipitation Method Using Different Precursors. *Energy Procedia* **2013**, *34*, 740–745.
- (139) Bouchabou, M.; Rives López, J. M.; Román Martínez, M. C.; Lillo-Ródenas, M. A. Evaluating H₂ Production by Ultraviolet-Induced Water Splitting over (Cu or Ni)–TiO₂ Nanoparticle Photocatalysts. *ACS Appl. Nano Mater.* **2025**, *8* (9), 8646–8662.
- (140) Muñoz-Bernal, Ó. A.; Torres-Aguirre, G. A.; Núñez-Gastélum, J. A. et al. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim.-Biol.* **2017**, *20* (2), 23–28.
- (141) Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal. Methods* **2010**, *3* (2), 90–97.
- (142) Cury, G. C. Revisión experimental del intervalo de pH para la determinación de cloruros por el método de Mohr. Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2006.
- (143) Raj, S.; Mali, S. C.; Trivedi, R. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Enicostemma axillare* (Lam.) Leaf Extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *503* (4), 2814–2819.

- (144) Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S. A.; Boritz, C.; Mulfinger, L. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J. Chem. Educ.* **2007**, *84* (2), 322–325.
- (145) Baruah, S.; Dutta, J. Hydrothermal Growth of ZnO Nanostructures. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2009**, *10* (1), 013001.
- (146) Mali, S. C.; Raj, S.; Trivedi, R. Biosynthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using *Enicostemma axillare* (Lam.) Leaf Extract. *Biochem. Biophys. Rep.* **2019**, *20*, 100699.
- (147) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*, M26-A; Wayne, PA, 1999.
- (148) Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45* (4), 493–496.
- (149) Mutukwa, D.; Taziwa, R.; Khotseng, L. E. A Review of the Green Synthesis of ZnO Nanoparticles Utilising Southern African Indigenous Medicinal Plants. *Nanomaterials* **2022**, *12* (19), 3456.
- (150) Swain, M.; Mishra, D.; Sahoo, G. A Review on Green Synthesis of ZnO Nanoparticles. *Discover Appl. Sci.* **2025**, *7* (1), 997.
- (151) Siddiqui, H.; Qureshi, M. S.; Haque, F. Z. pH-Dependent Single-Step Rapid Synthesis of CuO Nanoparticles and Their Optical Behavior. *Opt. Spectrosc.* **2017**, *123* (6), 903–912.
- (152) Nemčková, K.; Svitková, V.; Sochr, J.; Gemeiner, P.; Labuda, J. Gallic Acid-Coated Silver Nanoparticles as Perspective Drug Nanocarriers: Bioanalytical Study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, *414* (18), 5493–5505.
- (153) Alzharani, S.; Astudillo-Calderón, S.; Pintos, B.; Pérez-Urria, E.; Manzanera, J. A.; Martín, L.; Gomez-Garay, A. Role of Synthetic Plant Extracts on the Production of Silver-Derived Nanoparticles. *Plants* **2021**, *10* (8), 1671.
- (154) Rodríguez-Félix, F.; Graciano-Verdugo, A. Z.; Moreno-Vásquez, M. J. et al. Trends in Sustainable Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Agri-Food Waste Extracts and Their Applications in Health. *J. Nanomater.* **2022**, *2022*, 8874003.
- (155) Wang, Z.; Yang, H. C.; He, F.; Peng, S.; Li, Y.; Shao, L.; Darling, S. B. Mussel-Inspired Surface Engineering for Water-Remediation Materials. *Matter* **2019**, *1* (1), 115–155.
- (156) Yang, J.; Cui, J.; Zhang, H.; Zhang, H.; Zhu, J. Kinetic and Thermodynamic Study of Ag⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ Ion Adsorption on LTA for High-Performance Antibacterial Coating. *Coatings* **2024**, *14* (12), 1524.

- (157) Mobarak, M. B.; Sikder, M. F.; Muntaha, K. S. et al. Plant Extract-Mediated Green-Synthesized CuO Nanoparticles for Environmental and Microbial Remediation: A Review Covering Basic Understandings to Mechanistic Study. *Nanoscale Adv.* **2025**, 7 (9), 2418–2445.
- (158) Ahmed, S.; Annu; Chaudhry, S. A.; Ikram, S. A Review on Biogenic Synthesis of ZnO Nanoparticles Using Plant Extracts and Microbes: A Prospect towards Green Chemistry. *J. Photochem. Photobiol., B* **2017**, 166, 272–284.
- (159) Jaison, J. P.; Balasubramanian, B.; Gangwar, J. et al. Green Synthesis of Bioinspired Nanoparticles Mediated from Plant Extracts of Asteraceae Family for Potential Biological Applications. *Antibiotics* **2023**, 12 (3), 543.
- (160) Roucoux, A.; Schulz, J.; Patin, H. Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts? *Chem. Rev.* **2002**, 102 (10), 3757–3778.
- (161) Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J. M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (5), 1768–1774.
- (162) Pacioni, N. L.; Pardoe, A.; McGilvray, K. L.; Chrétien, M. N.; Scaiano, J. C. Synthesis of Copper Nanoparticles Mediated by Photogenerated Free Radicals: Catalytic Role of Chloride Anions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9 (6), 766–774.
- (163) Zhang, N.; Tang, J.; Ma, Y.; Liang, M.; Zeng, D.; Hefter, G. A Spectroscopic Study of Solvent Effects on the Formation of Cu(II)–Chloride Complexes in Aqueous Solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, 23 (11), 6807–6814.
- (164) Zhao, X.; Zhang, J.; Wang, B.; Zada, A.; Humayun, M. Biochemical Synthesis of Ag/AgCl Nanoparticles for Visible-Light-Driven Photocatalytic Removal of Colored Dyes. *Materials* **2015**, 8 (5), 2043–2053.
- (165) Zhou, Y.; Chen, R.; He, T. et al. Biomedical Potential of Ultrafine Ag/AgCl Nanoparticles Coated on Graphene with Special Reference to Antimicrobial Performances and Burn Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (24), 15067–15075.
- (166) Dudina, D. V.; Mukherjee, A. K. Reactive Spark Plasma Sintering: Successes and Challenges of Nanomaterial Synthesis. *J. Nanomater.* **2013**, 2013, 625218.
- (167) Kayani, Z. N.; Saleemi, F.; Batool, I. Effect of Calcination Temperature on the Properties of ZnO Nanoparticles. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2015**, 119 (2), 713–720.
- (168) Vasiljević, Z.; Dojčinović, M. P.; Vujančević, J. D. et al. Exploring the Impact of Calcination Parameters on the Crystal Structure, Morphology, and Optical Properties of Electrospun Fe₂TiO₅ Nanofibers. *RSC Adv.* **2021**, 11 (51), 32358–32368.

- (169) Chan, Y. B.; Selvanathan, V.; Tey, L. H. et al. Effect of Calcination Temperature on Structural, Morphological and Optical Properties of Copper Oxide Nanostructures Derived from *Garcinia mangostana* L. Leaf Extract. *Nanomaterials* **2022**, *12* (20), 3589.
- (170) Verma, R.; Chauhan, A.; Neha; Batoo, K. M.; Kumar, R.; Hadhi, M.; Raslan, E. H. Effect of Calcination Temperature on Structural and Morphological Properties of Bismuth Ferrite Nanoparticles. *Ceram. Int.* **2021**, *47* (3), 3680–3691.
- (171) Saikumari, N.; Dey, S. M.; Dev, S. A. Effect of Calcination Temperature on the Properties and Applications of Bio Extract Mediated Titania Nano Particles. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1642.
- (172) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? *J. Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351.
- (173) Németh, Z.; Csóka, I.; Semmani Jazani, R.; Sipos, B.; Haspel, H.; Kozma, G.; Kónya, Z.; Dobó, D. G. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (9), 1798.
- (174) Thammawithan, S.; Talodthaisong, C.; Srichaiyapol, O.; Patramanon, R.; Hutchison, J. A.; Kulchat, S. Andrographolide Stabilized-Silver Nanoparticles Overcome Ceftazidime-Resistant *Burkholderia pseudomallei*: Study of Antimicrobial Activity and Mode of Action. *Sci. Rep.* **2022**, *12* (1), 10565.
- (175) Khina, A. G.; Krutyakov, Y. A. Similarities and Differences in the Mechanism of Antibacterial Action of Silver Ions and Nanoparticles. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2021**, *57* (6), 683–693.
- (176) Hamad, A.; Khashan, K. S.; Hadi, A. Silver Nanoparticles and Silver Ions as Potential Antibacterial Agents. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2020**, *30* (12), 4811–4828.
- (177) Yin, I. X.; Zhang, J.; Zhao, I. S.; Mei, M. L.; Li, Q.; Chu, C. H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 2555–2562.
- (178) Le Ouay, B.; Stellacci, F. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: A Surface Science Insight. *Nano Today* **2015**, *10* (3), 339–354.
- (179) Xiu, Z. M.; Zhang, Q. B.; Puppala, H. L.; Colvin, V. L.; Alvarez, P. J. J. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Lett.* **2012**, *12* (8), 4271–4275.
- (180) Govindasamy, G. A.; Mydin, R. B. S. M. N.; Sreekantan, S.; Harun, N. H. Effect of Calcination Temperature on Physicochemical and Antimicrobial Properties of Green Synthesised ZnO/C/Ca Nanocomposites Using *Calotropis gigantea* Leaves. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **2021**, *12* (1), 015013.

- (181) Vitasovic, T.; Caniglia, G.; Eghtesadi, N. et al. Antibacterial Action of Zn²⁺ Ions Driven by the In Vivo Formed ZnO Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16* (24), 30847–30859.
- (182) Raghupathi, K. R.; Koodali, R. T.; Manna, A. C. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27* (7), 4020–4028.
- (183) Vincent, M.; Duval, R. E.; Hartemann, P.; Engels-Deutsch, M. Contact Killing and Antimicrobial Properties of Copper. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124* (5), 1032–1046.
- (184) Flores-Rábago, K. M.; Rivera-Mendoza, D.; Vilchis-Nestor, A. R. et al. Antibacterial Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles (CuONPs) Using *Ganoderma sessile*. *Antibiotics* **2023**, *12* (8), 1251.
- (185) Gudkov, S. V.; Burmistrov, D. E.; Fomina, P. A.; Validov, S. Z.; Kozlov, V. A. Antibacterial Properties of Copper Oxide Nanoparticles (Review). *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (21), 11563.
- (186) Krychowiak-Maśnicka, M.; Wojciechowska, W. P.; Bogaj, K. et al. The Substantial Role of Cell and Nanoparticle Surface Properties in the Antibacterial Potential of Spherical Silver Nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2024**, *17*, 227–241.
- (187) Pourali, P.; Baserisalehi, M.; Afsharnezhad, S. et al. The Effect of Temperature on Antibacterial Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles. *Biometals* **2013**, *26* (1), 189–196.
- (188) Sadoq, B. E.; Britel, M. R.; Bouajaj, A. et al. A Review on Antibacterial Activity of Nanoparticles. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2023**, *13* (5), 405.
- (189) Zhang, H.; Mi, Z.; Wang, J.; Zhang, J. d-Histidine Combated Biofilm Formation and Enhanced the Effect of Amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* in Vitro. *Arch. Microbiol.* **2024**, *206* (4), 118.
- (190) Yi, L.; Cao, M.; Chen, X. et al. In Vitro Antimicrobial Synergistic Activity and the Mechanism of the Combination of Naringenin and Amikacin Against Antibiotic-Resistant *Escherichia coli*. *Microorganisms* **2024**, *12* (9), 1871.
- (191) Godoy-Gallardo, M.; Eckhard, U.; Delgado, L. M. et al. Antibacterial Approaches in Tissue Engineering Using Metal Ions and Nanoparticles: From Mechanisms to Applications. *Bioact. Mater.* **2021**, *6* (12), 4470–4490.
- (192) Chandra, H.; Kumari, P.; Bontempi, E.; Yadav, S. Medicinal Plants: Treasure Trove for Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *24*, 101518.
- (193) Amini, S. M. Preparation of Antimicrobial Metallic Nanoparticles with Bioactive Compounds. *Mater. Sci. Eng., C* **2019**, *103*, 109809.

- (194) El-Seedi, H. R.; El-Shabasy, R. M.; Khalifa, S. A. M. et al. Metal Nanoparticles Fabricated by Green Chemistry Using Natural Extracts: Biosynthesis, Mechanisms, and Applications. *RSC Adv.* **2019**, 9 (42), 24539–24559.
- (195) Iwuozor, K. O.; Emenike, E. C. Green Synthesis of Copper Nanoparticles and Investigation of Its Antimicrobial Properties. *Alanya J. Chem. Biol.* **2022**, 6 (1), 93–105.

ANEXOS



Medicinal Plants Extract for the Bio-Assisted Synthesis of Ag/AgCl Nanoparticles with Antibacterial Activity

Jorge Luis Torres-López^{1,2} · Stephania Lázaro-Mass³ · Susana De la Rosa-García⁴ · Mayra A. Alvarez-Lemus⁵ · Abraham Gómez-Rivera¹ · Rosendo López-González⁵ · Carlos Ernesto Lobato-García¹ · Getsemani Morales-Mendoza⁵ · Sergio Gómez-Cornelio^{2,5}

Received: 8 September 2024 / Accepted: 21 October 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

The increasing antibiotic resistance necessitates sustainable methods for synthesizing antibacterial nanoparticles. This study focuses on the bio-assisted synthesis of silver/silver chloride nanoparticles (Ag/AgCl-NPs) using aqueous extracts of *Acalypha arvensis*, *Hampea rovirosae*, and *Inga jinicuil*. Polyphenols and flavonoids were quantified, and functional groups were analyzed via Fourier-transform infrared to assess their influence on the properties of Ag/AgCl-NPs. The effects of thermal treatment at 60 and 500 °C on the NPs' size, morphology, and antibacterial efficacy were assessed. UV–Vis spectroscopy indicated absorption peaks between 430 and 449 nm, while X-ray diffraction analysis confirmed the presence of metallic Ag and a cubic AgCl structure, with crystallite sizes ranging from 11–51 and 28–60 nm, respectively. Dynamic light scattering showed hydrodynamic sizes of up to 127.2 ± 0.9 nm at 60 °C and up to 348.9 ± 10.7 nm at 500 °C. Field emission scanning electron microscopy micrographs exhibited a quasi-spherical morphology with significant agglomeration; showing particle sizes between 55 ± 11 and 81 ± 28 nm at 60 °C, and up to 135 ± 65 nm at 500 °C. X-ray photoelectron spectroscopy confirmed the metallic silver (Ag⁰), organic molecules, and absorbed chlorides on the NP surface. Pearson correlation analysis indicated a strong positive correlation between polyphenol content and NPs yield ($r = 0.922$), while it indicated a strong negative correlation with flavonoid content ($r = -0.996$). Additionally, a negative correlation was found between hydrodynamic size and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ($r = -0.854$). The Ag/AgCl-NPs, after drying at 60 and 500 °C, were tested against *Escherichia coli* and *S. aureus* with minimum bactericidal concentrations below 19 µg/mL against *E. coli*. Minimum inhibitory concentration (MIC) for Ag/AgCl-NPs synthesized with *A. arvensis* and *H. rovirosae* extracts were above 312 µg/mL for *S. aureus*, while those synthesized with *I. jinicuil* showed MIC as low as 156 µg/mL. These results highlight the potential of medicinal plant extracts in the synthesis of Ag/AgCl with enhanced antibacterial properties.

Keywords Polyphenols · Flavonoids · Antibacterial activity · Bio-assisted synthesis · Medicinal plants

✉ Sergio Gómez-Cornelio
sagomezcornelio@gmail.com

- ¹ Academic Division of Basic Sciences, Juarez Autonomous University of Tabasco, Cunduacan, Mexico
- ² Biotechnology Laboratory, Polytechnic University of the Center, Centro, Mexico
- ³ Applied Physics Department, CINVESTAV-Merida, Merida, Mexico
- ⁴ Applied Microbiology Laboratory, Academic Division of Biological Sciences, Juarez Autonomous University of Tabasco, Villahermosa, Mexico
- ⁵ Nanotechnology Laboratory, Academic Division of Engineering and Architecture, Juarez Autonomous University of Tabasco, Cunduacan, Mexico

Introduction

In the tropical regions of Mexico, a diverse array of medicinal plants, such as *Acalypha arvensis*, *Hampea rovirosae*, and *Inga jinicuil*, are traditionally used for their therapeutic and nutritional benefits (Fig S1). *A. arvensis* is particularly renowned for its anti-inflammatory properties and has demonstrated significant antibacterial activity against *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* [1]. *I. jinicuil* is valued for its nutritional contributions and anti-inflammatory effects, with its phytochemical profile showing efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* and *S. aureus* [2]. Meanwhile, *H. rovirosae*, traditionally used to

treat wounds and headaches, is noted for its high tannin and polyphenol content [3].

Recent studies have demonstrated that plant secondary metabolites, such as polyphenols and flavonoids, can directly facilitate the reduction of metallic ions, acting as reductants during the synthesis of metallic nanoparticles (NPs) [4]. This bio-assisted synthesis aligns with green chemistry principles [5], emphasizing waste minimization and the reduction of hazardous chemical reagents [6]. Moreover, polyphenols and flavonoids also serve as chelating agents during the synthesis process, contributing to the development of sustainable nanotechnological applications [7, 8]. The synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using plant extracts offers significant advantages over conventional methods, including lower toxicity and reduced environmental impact. These plant secondary metabolites adhere to the NP surface, enhancing their stability and functionality [9, 10]. Calcination further refines the physical properties of AgNPs, specifically improving their crystallinity and purity. This process promotes thermal dissociation, leading to more defined crystalline structures and facilitating the agglomeration of smaller particles after the removal of organic stabilizers [11].

The interest in AgNPs is driven by their proven antibacterial efficacy, which is crucial in the context of escalating antibiotic resistance. Silver has long been recognized for its antibacterial properties and has been researched for various applications to combat pathogenic microorganisms [12–14]. AgNPs, synthesized through both conventional and biological methods, exhibit superior bactericidal activity due to their greater surface area-to-volume ratio, enhancing interactions with microbial cell membranes [15, 16].

Additionally, the synthesis of AgNPs and silver chloride (AgCl) has been reported without the need to add external chloride sources, using only *Oedera genistifolia* leaf extract and a silver nitrate (AgNO_3) solution. This eco-friendly approach, which relies solely on plant extracts as a reducing and stabilizing agent, stands out for its efficiency and sustainability. The resulting Ag/AgCl-NPs demonstrated enhanced antibacterial activity and low cytotoxicity in HeLa cells [17]. This composite not only retains the bactericidal effects of silver but also generates reactive oxygen species under light irradiation, further increasing its bactericidal efficacy [18, 19]. The addition of AgCl improves the stability and broadens antibacterial activity of the composite against a range of bacterial strains. Consequently, the Ag/AgCl composite is positioned as a highly promising material for applications in antibacterial coatings, wound dressings, and other biomedical fields [20].

This study capitalizes on the advantages of bio-assisted synthesis methods, using plant extracts rich in polyphenols and flavonoids to biosynthesize Ag/AgCl-NPs from *A. arvensis*, *H. rovirosae*, and *I. jinicuil*. The primary goal was to evaluate how these extracts affect the physical and

functional characteristics of the NPs, including their antibacterial efficacy. We employed a comprehensive suite of characterization techniques, including Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, ultraviolet–visible (UV–Vis) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), dynamic light scattering (DLS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and field emission scanning electron microscopy (FESEM), to examine their size, crystalline structure, surface composition, and morphological features. The effects of two thermal treatments, specifically drying at 60 °C and calcination at 500 °C, on the NPs' antibacterial efficacy were also evaluated. The antibacterial activity was determined through diffusion and microdilution assays to establish the minimum inhibitory and bactericidal concentrations, elucidating the influence of temperature and the specific plant source used. Pearson correlation analysis was performed to explore potential relationships between the polyphenol and flavonoid contents and the yields and properties of the NPs. The novelty of this study lies in the use of previously unexplored medicinal plants, such as *A. arvensis*, *I. jinicuil*, and *H. rovirosae*, for the synthesis of NPs that stand out for their ethnobotanical significance. Additionally, it highlights the correlation between metabolites present in the plant extracts, such as polyphenols and flavonoids, and the NPs' properties, providing a deeper understanding of their influence on antibacterial efficacy. Pearson's analysis was used to establish key correlations between their physicochemical properties and activity.

Materials and Methods

Bio-Assisted Synthesis of Ag/AgCl-NPs

The leaves of *I. jinicuil* (Ij) and *H. rovirosae* (Hr), along with the aerial parts of *A. arvensis* (Aa), were collected in Tabasco, Mexico (18°00'00"N, 92°40'00"W) between August and November 2023. The plant materials were washed with distilled water, air-dried at room temperature for 72 h, and then finely ground. Aqueous extractions were performed by heating 15 g of each powdered plant material in 100 mL of distilled water at 60 °C for 30 min, followed by cooling the mixture to room temperature. The extracts were filtered using vacuum filtration and Whatman filter no. 1 and stored at 4 °C. To detect chloride ions (Cl^-) in the extracts, the Mohr method was employed, using 0.1 M silver nitrate (AgNO_3 ; 95–100%; Meyer, Mexico) for precipitation titration. A 50 mL volume of the filtered extract was analyzed for Cl^- after centrifugation. The Cl^- concentration in the extracts was further confirmed by EDS and XPS analysis.

For the synthesis of silver/silver chloride nanoparticles (Ag/AgCl-NPs), 20 mL of plant extracts were gradually added to 600 mL of 1 mM AgNO_3 solution. The reaction

was performed in darkness to avoid photoactivation of AgNO_3 and maintained at 60 °C with stirring (200 rpm) for 2 h until the solution turned dark brown. The resulting solution was centrifuged at 4500 rpm for 60 min [21], the precipitate was washed three times with distilled water, and then dried at 60 °C. A separate batch of the precipitate was calcined at 500 °C for 4 h to assess the effect of calcination on the crystallinity, size, and morphology of the Ag/AgCl-NPs (Fig. S2). Six distinct products were obtained and labeled as NPs-Aa-60, NPs-Hr-60, and NPs-Ij-60 for those treated at 60 °C, and NPs-Aa-500, NPs-Hr-500, and NPs-Ij-500 for those subjected to calcination at 500 °C.

The yield of the synthesized Ag/AgCl-NPs was calculated using the following formula (1) [22]:

$$\% \text{Yield} = \frac{\text{Experimental mass of AgNPs}}{\text{Theoretical mass of AgNPs}} \times 100\%. \quad (1)$$

Determination of Total Polyphenol and Flavonoid Content and FTIR Analysis of Aqueous Extract

To quantify polyphenols and flavonoids, 25 mL of the concentrated extract from each plant was lyophilized. Total polyphenol content was measured using a modified Folin-Ciocalteu method based on Erum Iqbal et al. [23], with gallic acid ($\geq 97.0\%$; Sigma Aldrich, MO, USA) as the standard. Samples were prepared at 5 mg/mL in methanol ($\geq 99.8\%$, Merck, Darmstadt, Germany). For the assay, 100 μL of the sample was mixed with 1400 μL of distilled water, 250 μL of Folin-Ciocalteu reagent (1 mol L^{-1} ; Sigma Aldrich, MO, USA), and 250 μL of sodium carbonate (Na_2CO_3 , 20 wt%, $\geq 99.5\%$; Sigma Aldrich, MO, USA). The mixture was incubated for 2 h, and absorbance was measured at 760 nm (spectrophotometer GENESYS™ 10S; Menlo Park, CA, USA).

For flavonoids, the method adapted from Zhu et al. [24] was used. A calibration curve was established with rutin as a standard ($\geq 94.0\%$; Sigma Aldrich, MO, USA). Samples were prepared at 5 mg/mL in methanol. For each 100 μL of sample, 1250 μL of distilled water, 75 μL of sodium nitrite (NaNO_2 , 5 wt%, $\geq 99.0\%$; Sigma Aldrich, MO, USA), 150 μL of aluminum chloride (AlCl_3 , 10 wt%, 98%; Merck, Darmstadt, Germany), and 500 μL of sodium hydroxide (NaOH , 1 mol L^{-1} , $\geq 97.0\%$; Merck, Darmstadt, Germany) were added. Absorbance was measured at 510 nm, with all measurements performed in triplicate.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was conducted to identify the functional groups potentially responsible for the reduction and stabilization of AgNPs. Lyophilized aqueous extracts were analyzed using an FTIR spectrometer (Nicolet iS50; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) equipped with an attenuated total reflectance

module and a diamond crystal. Spectra were collected across a range from 4000 to 400 cm^{-1} using 32 scans at a set resolution.

Characterization of Ag/AgCl-NPs

Following the synthesis, the colloidal silver solution's absorbance was analyzed using a UV–Vis spectrophotometer (VE-8000A; VELAB, Mexico) between 300 and 700 nm to assess the surface plasmon resonance characteristic of Ag^0 . FTIR was also performed on the NPs after treatments at 60 °C and subsequent calcination at 500 °C, using the same analytical conditions as for the initial extract analysis.

X-ray diffraction (XRD) analysis was performed to identify the crystalline phases of the NPs using a D8 advance diffractometer (Bruker, MA, USA) equipped with $\text{Cu-K}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Scans were carried out from 20° to $80^\circ 2\theta$, with a step size of 0.02° and a step time of 0.3 s. Crystallite size was calculated using the Scherrer equation (2):

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (2)$$

where k is the Scherrer constant, β represents the full width at half maximum (FWHM, in radians), and θ is the diffraction angle.

Particle size and zeta potential were measured using Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). The Ag/AgCl-NPs were dispersed in distilled water at concentrations ranging from 0.1 to $0.0125 \text{ mg mL}^{-1}$ and sonicated for 30 min using a Cole-Parmer 8891R-MT ultrasonic cleaner with an operating frequency of $42 \text{ kHz} \pm 6\%$. Measurements were taken at $20 \pm 5^\circ \text{C}$, using a light wavelength of 633 nm and standard fluid properties including a dielectric constant of 79.9, refractive index of 1.333, and viscosity of 1.000 cP. Zeta potential was assessed with the same DLS system using a ZEN1002-Zeta Dip CELL electrode.

The morphology and size of the Ag/AgCl-NPs were observed using Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) on a JSM-7600F (JEOL, Tokyo, Japan). Samples were mounted on carbon tape and coated with a gold–palladium alloy. Elemental composition was analyzed using Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDS) equipped with the Oxford-EDS system. Additional chemical characterization was performed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) with a K-Alpha Surface Analysis instrument (K-Alpha, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), using monochromatic $\text{Al K}\alpha$ X-radiation (1486.6 eV) in constant-pass energy mode.

Antibacterial assays

The antibacterial efficacy of Ag/AgCl nanoparticles (Ag/AgCl-NPs) was evaluated against *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram-positive) using the disc diffusion and micro-dilution methods [25]. An overnight bacterial culture was adjusted to an optical density of 0.08–0.07 at 600 nm, corresponding to approximately 1×10^8 CFU mL⁻¹. To assess the impact of thermal treatment at 60 and 500 °C on Ag/AgCl-NPs bioactivity, the disc diffusion method was employed. For each 10 × 10 cm plate, 31.5 mL of trypticase soy agar (TSA) was mixed with 3.5 mL of inoculum and poured before solidification. Paper discs were impregnated with 20 µL of an Ag/AgCl-NPs suspension (100 mg/mL) in sterile water and placed equidistantly on the agar inoculated with bacteria. Sterile distilled water and amikacin (100 µg/mL) were used as negative and positive controls, respectively. The plates were incubated at 37 °C for 24 h in triplicate, and inhibition zones were measured with a Vernier caliper.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined following a modified Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol [26]. Serial twofold dilutions of Ag/AgCl-NPs (from 5000 to 2 µg/mL) were prepared in 96-well microtiter plates. Each well received 100 µL of diluted NPs and 100 µL of bacterial suspension (1×10^6 CFU/mL). Sterile distilled water and amikacin (100 µg/mL) were used as controls. MIC was determined after 24 h of incubation at 37 °C by adding a 1% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride to detect viable bacteria. MBC was established by subculturing 10 µL from each well onto TSA plates, with the absence of visible growth indicating bactericidal activity. An MBC/MIC ratio ≤ 4 classified the action as bactericidal, while a ratio > 4 was considered bacteriostatic [25, 27].

Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical differences were evaluated using analysis of variance (ANOVA) at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$), followed by Tukey's post hoc test. The analysis included data from

the quantification of polyphenols and flavonoids, NPs yield, and antibacterial screening results. Additionally, correlation analyses were conducted to assess relationships among various parameters, including temperature (T), polyphenols (P), flavonoids (F), yield (Y), crystallite size (CS), hydrodynamic size (HS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), zone of inhibition (ZOI), minimum inhibitory concentration (MIC), and particle size (PS). These relationships were quantified using the Pearson correlation coefficient (r). Statistical significance was set at p -values less than 0.05 or 0.01. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics software, version 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

Results

High contents of polyphenols and flavonoids, exceeding 50 mg per g of extract, were detected in each plant extract (Table 1). The polyphenol levels exhibited an increasing trend in the order of *A. arvensis* $>$ *H. rovirosae* $>$ *I. jinicuil*, with statistically significant differences observed between *I. jinicuil* and the other two plants. Conversely, the flavonoid content followed a decreasing trend from *A. arvensis* $<$ *H. rovirosae* $<$ *I. jinicuil*; however, these differences were not statistically significant. In the synthesis of Ag/AgCl-NPs using 15% w/v extract concentration from each plant, a yield trend of *A. arvensis* $>$ *H. rovirosae* $>$ *I. jinicuil* was observed, with significant differences. This pattern aligns with the variations in polyphenol content, suggesting a significant correlation between polyphenol levels and NP yields. Chloride ion (Cl⁻) concentrations in the extracts of the three medicinal plants were also determined, with values of 18.4 ± 0.5 mmol/L for *A. arvensis*, 31.6 ± 0.5 mmol/L for *H. rovirosae*, and 24.2 ± 0.7 mmol/L for *I. jinicuil* (Table 1).

FTIR analyses of the extracts from the three plants revealed distinct characteristic signals (Fig. 1d). Peaks were observed at 526, 1043, 1215, 1380, 1590, 2929, and 3244 cm⁻¹. The broad band at 3244 cm⁻¹ suggests O–H stretching. In the 1260–1000 cm⁻¹ region, the peak at 1215 cm⁻¹, attributed to C–O stretching, and the signal at 1380 cm⁻¹, likely indicating O–H bending in phenolic compounds, stand out. The strong band at 1590 cm⁻¹ is likely associated with C=C stretching in aromatic rings.

Table 1 Quantification of total polyphenols, flavonoids, chloride ions (Cl⁻) in extracts, and yield of Ag/AgCl-NPs from *A. arvensis*, *H. rovirosae*, and *I. jinicuil*

Plant	Polyphenols (mg GAE/g E)	Flavonoids (mg RE/g E)	Cl ⁻ ions (mmol/L)	Yield (%)
<i>A. arvensis</i>	90.8 ± 1.5^a	75.8 ± 9.7^a	18.4 ± 0.5^a	89.6 ± 1.2^a
<i>H. rovirosae</i>	85.6 ± 7.4^a	84.5 ± 2.5^a	31.6 ± 0.5^b	75.7 ± 5.2^b
<i>I. jinicuil</i>	60.0 ± 2.8^b	90.13 ± 2.5^a	24.2 ± 0.7^c	63.3 ± 2.8^c

Mean values are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistically significant differences were identified using Tukey's test ($p < 0.05$), where different letters (a, b, c) indicate significant differences between groups. Sample size (n) = 3.

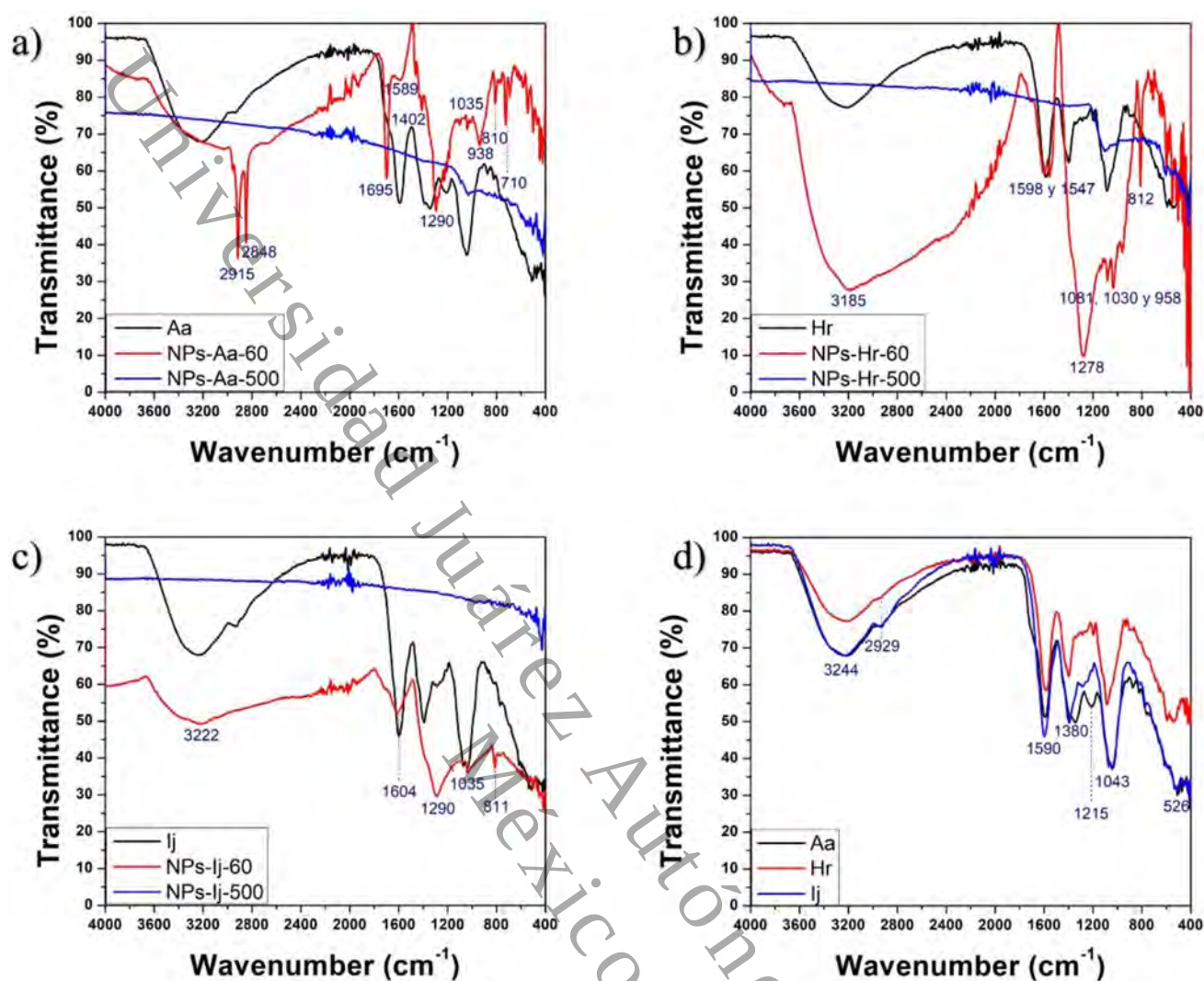


Fig. 1 FTIR spectral analysis of the plant extracts and Ag/AgCl-NPs synthesized at 60 and 500 °C for: **a** *A. arvensis* (NPs-Aa), **b** *H. rovirosae* (NPs-Hr), and **c** *I. jinicuil* (NPs-Ij); Panel **d** provides a comparative analysis of the plant extracts.

Signals around 2000 cm^{-1} are identified as overtone regions, which are typical of aromatic compounds. The peaks at 2929 cm^{-1} are generally attributed to symmetric stretching of H–C–H in alkanes. Signals in the 880–500 cm^{-1} range suggest the presence of C–H or C=C bonds, while the bands in the 900–400 cm^{-1} region are typically related to out-of-plane bending vibrations of C–H in aromatic rings. Additionally, the peak at 1043 cm^{-1} is associated with C–O stretching vibrations of alcohol groups.

The physicochemical properties of the biosynthesized Ag/AgCl-NPs were evaluated by comparing samples dried at 60 °C and calcined at 500 °C. UV–Vis spectroscopy revealed characteristic absorption bands between 430 and 450 nm, indicative of surface plasmon resonance, highlighting the presence of metallic silver (Fig. 2).

FTIR analysis of the Ag/AgCl-NPs dried at 60 °C revealed spectral peaks similar to those of the plant extracts, though with discernible variations. For instance, in the case of the NPs-Aa-60, peaks at 2850 and 2908 cm^{-1} correspond to C–H stretching, while a peak at 1695 cm^{-1} indicates carbonyl group (C=O) vibrations. Additionally, a peak at 1290 cm^{-1} is generally associated with O–H bending vibrations (Fig. 1a). In NPs-Hr-60, a pronounced band at 1278 cm^{-1} is attributed to C–N stretching related to aromatic amines, while a peak at 812 cm^{-1} indicates C=C bending. Typically, peaks between 1500 and 500 cm^{-1} are associated with the presence of C–Cl, and C–O (Fig. 1b). For NPs-Ij-60, spectral similarities to the initial extract were observed, suggesting the retention of polyphenols and flavonoids in the NPs synthesized at 60 °C (Fig. 1c). On the other hand, Ag/

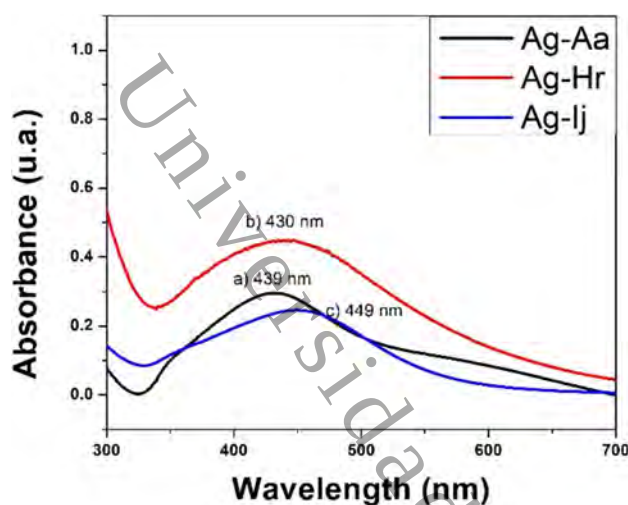


Fig. 2 UV-Vis spectra of Ag/AgCl-NPs synthesized from the extracts of **a** *A. arvensis* (Ag-Aa), **b** *H. rovirosae* (Ag-Hr), and **c** *I. jinicuil* (Ag-Ij).

AgCl-NPs calcined at 500 °C exhibited overtones near 2000 cm^{-1} , likely due to residual organic compounds not fully eliminated during calcination. Additionally, a distinct band at 400 cm^{-1} was observed, characteristic of the stretching vibrations of heavier atoms, such as those found in Ag-Cl bonds, indicating the presence of Ag/AgCl structures.

XRD analysis revealed distinctive crystalline characteristics of the synthesized Ag/AgCl-NPs (Fig. 3). The diffraction patterns showed significant peaks at 2θ values of 38.14°, 46.27°, 64.6°, and 77.4°, corresponding to the Bragg planes (111), (200), (220), and (311) of a face-centered cubic structure of metallic silver. Additional peaks at 2θ values of 27.85°, 32.28°, 44.36°, 54.88°, 57.63°, 67.56°, and 74.49° were attributed to the planes (111), (200), (220), (311), (222), (400), and (331) of AgCl. These patterns correspond to the Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) reference PDF numbers #00-004-0783 for Ag and PDF #01-071-5209 for AgCl. Samples calcined at 500 °C showed sharper and more defined diffraction peaks, indicating an increase in crystallite size and enhanced crystallinity (Fig. 3b). Additionally, the intensified reflections of metallic silver suggest a higher proportion of Ag^0 relative to AgCl,

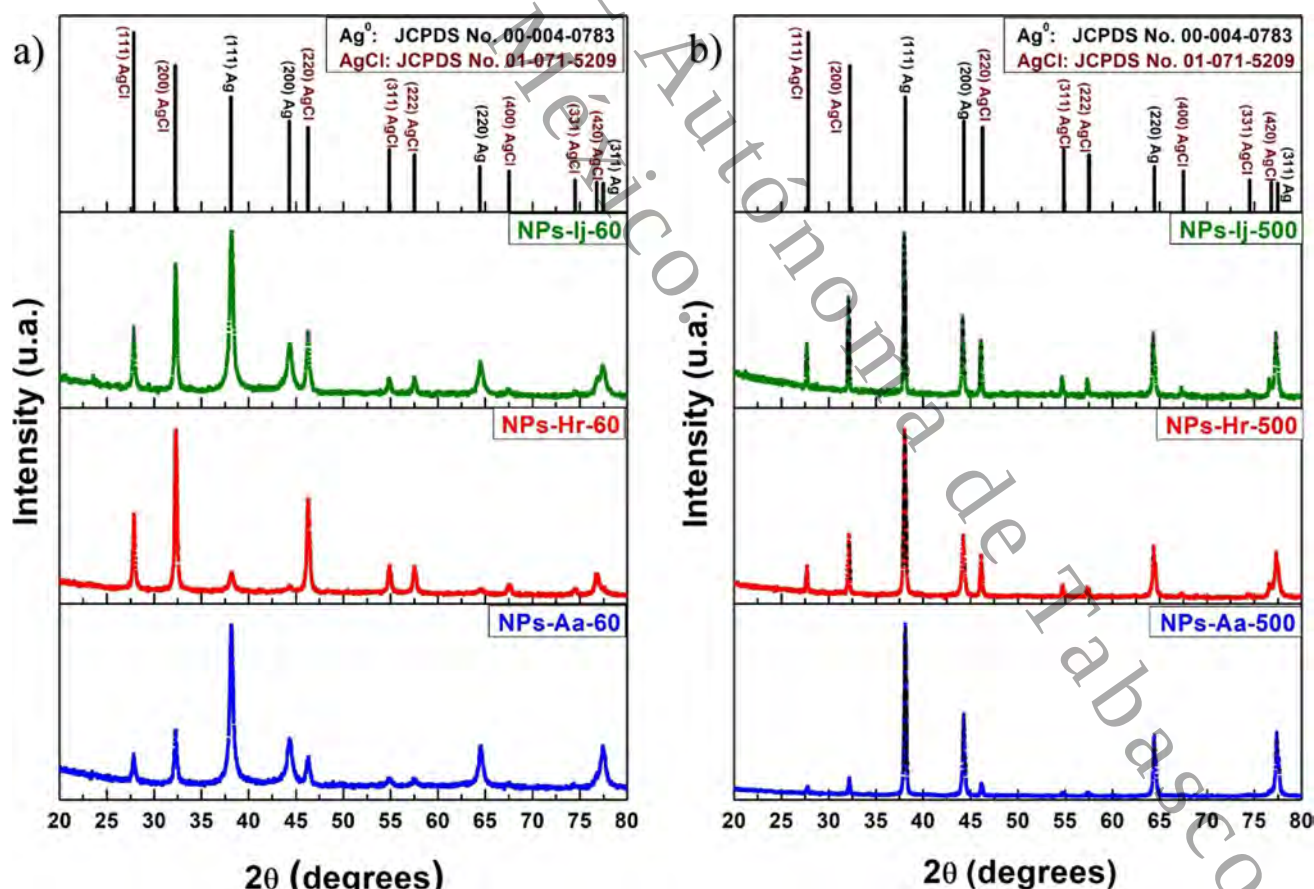


Fig. 3 X-ray diffraction patterns of Ag and AgCl NPs synthesized using extracts from *A. arvensis*, *H. rovirosae*, and *I. jinicuil*, dried at 60 °C (a) and calcined at 500 °C (b).

particularly in NPs-Ij-500 and NPs-Hr-500 compared to NPs-Aa-500, where the peaks associated with AgCl were either imperceptible or absent. Using the Scherrer equation, the crystallite sizes of Ag^0 were estimated to range from 12 to 21 nm at 60 °C and from 40 to 51 nm at 500 °C, while sizes for AgCl varied from 28 to 34 nm and from 46 to 60 nm, respectively (Table 2).

DLS was employed to assess the hydrodynamic size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of Ag/AgCl-NPs in aqueous solution. Ag/AgCl-NPs dried at 60 °C exhibited relatively homogeneous size distributions, ranging from 10 to 400 nm. Notably, the NPs-Aa-60 and NPs-Ij-60 samples displayed bimodal distributions, meaning the size data showed two distinct peaks, with a less intense peak representing sizes from 7 to 35 nm and a more pronounced peak ranging from 37 to 400 nm. In contrast, Ag/AgCl-NPs calcined at 500 °C exhibited monodisperse distributions, though particle sizes varied depending on the plant extract. The smallest particles were observed in the NPs-Ij-500 sample, ranging from 106 to 190 nm, while the largest particles

were found in the NPs-Hr-500 sample, with sizes ranging from 459 to 712 nm (Fig. 4).

For the Ag/AgCl-NPs treated at 60 °C, the average hydrodynamic sizes were recorded at 77.6 ± 3.3 nm for NPs-Aa-60 and 127.2 ± 0.9 nm for NPs-Hr-60 (Table 3). In contrast, NPs subjected to calcination at 500 °C demonstrated broader size distributions, from 140.6 ± 18.2 nm for NPs-Ij-500 to 582.7 ± 65.1 nm for Ag-Hr-500. This variability was reflected in the polydispersity index (PDI). Ag/AgCl-NPs treated at 60 °C displayed PDI values suggesting a trend towards monodispersity, with values of 0.271 for NPs-Hr-60 and 0.369 for NPs-Ij-60. However, calcined Ag/AgCl-NPs exhibited a PDI of 0.349 for NPs-Aa-500 and a marked increase in polydispersity for NPs-Hr-500 (0.635), indicating changes in size homogeneity post-calcination. Zeta potential measurements remained negative across all samples, ranging from -167 ± 0.7 to -18.9 ± 1.8 mV for those treated at 60 °C, and from -14.3 ± 0.6 to -20.0 ± 3.3 mV for calcined samples. These values, being less negative

Table 2 Crystallite size of Ag and AgCl NPs, dried at 60 °C and calcined at 500 °C, calculated using the Scherrer equation.

Nanoparticles	Crystallite size (nm)	
	60 °C	500 °C
Ag-Aa	12	45
Ag-Hr	16	40
Ag-Ij	21	51
AgCl-Aa	28	46
AgCl-Hr	34	48
AgCl-Ij	32	60

Table 3 Hydrodynamic size, polydispersity index, and zeta potential of Ag/AgCl-NPs synthesized using medicinal plant extracts.

Nanoparticles	Hydrodynamic size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
NPs-Aa-60 °C	77.6 ± 3.3	0.425	-16.7 ± 0.7
NPs-Hr-60 °C	127.2 ± 0.9	0.271	-18.9 ± 1.8
NPs-Ij-60 °C	121.4 ± 3.1	0.369	-18.9 ± 0.8
NPs-Aa-500 °C	348.9 ± 10.7	0.349	-20.0 ± 3.3
NPs-Hr-500 °C	582.7 ± 65.1	0.635	-14.3 ± 0.6
NPs-Ij-500 °C	140.6 ± 18.2	0.565	-14.7 ± 0.9

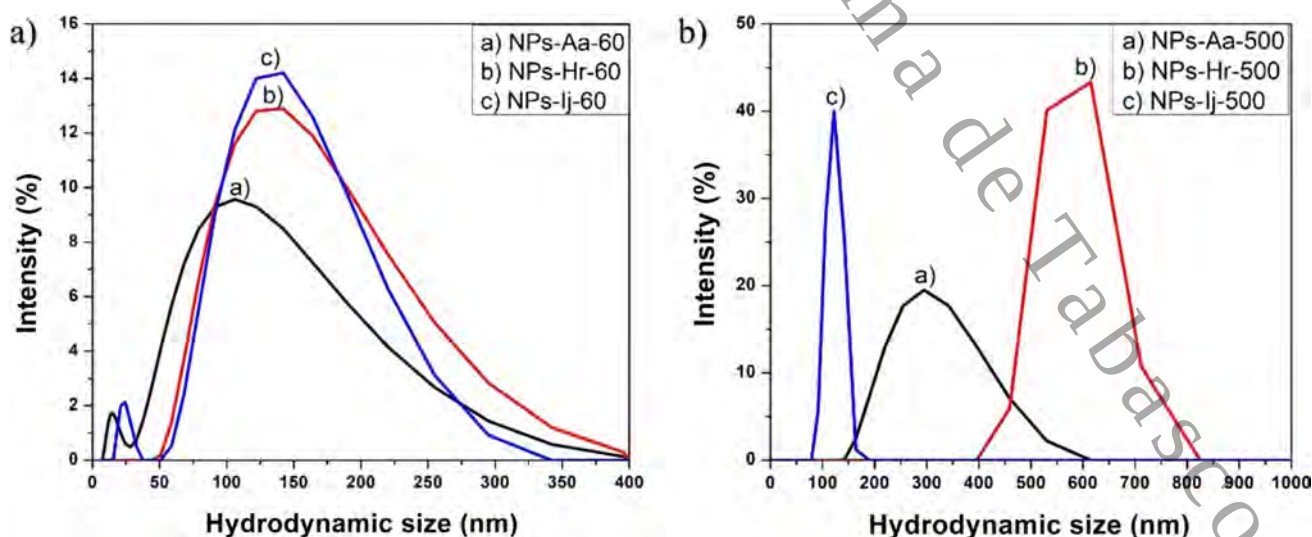


Fig. 4 Hydrodynamic diameter distribution of Ag/AgCl-NPs synthesized from medicinal plant extracts, dried at 60 °C (a) and calcined at 500 °C (b).

than -30 mV, suggest moderate stability in all variants of Ag/AgCl-NPs.

FESEM micrographs revealed that the Ag/AgCl-NPs synthesized at 60°C predominantly exhibited a quasi-spherical morphology, with average particle sizes ranging from 55 ± 11 to 81 ± 28 nm. In contrast, Ag/AgCl-NPs treated at 500°C tended to display a more irregular morphology, with average sizes reaching up to 135 ± 65 nm (Fig. 5). EDS analysis showed that the Ag content in NPs dried at 60°C ranged

from 50 to 63 wt%, while calcination at 500°C significantly increased the Ag content, with values reaching up to 96 wt%. In Ag/AgCl-NPs dried at 60°C , the C and O content varied widely, with higher levels observed in NPs-Ij-60 and NPs-Aa-60, respectively (Table 4). Upon calcination at 500°C , the O content decreased significantly, with NPs-Ij-500 showing no detectable oxygen, and the C content remained consistently low, not exceeding 5.8 wt%. Variations in chlorine (Cl) content were also significant, ranging from 5.6 to

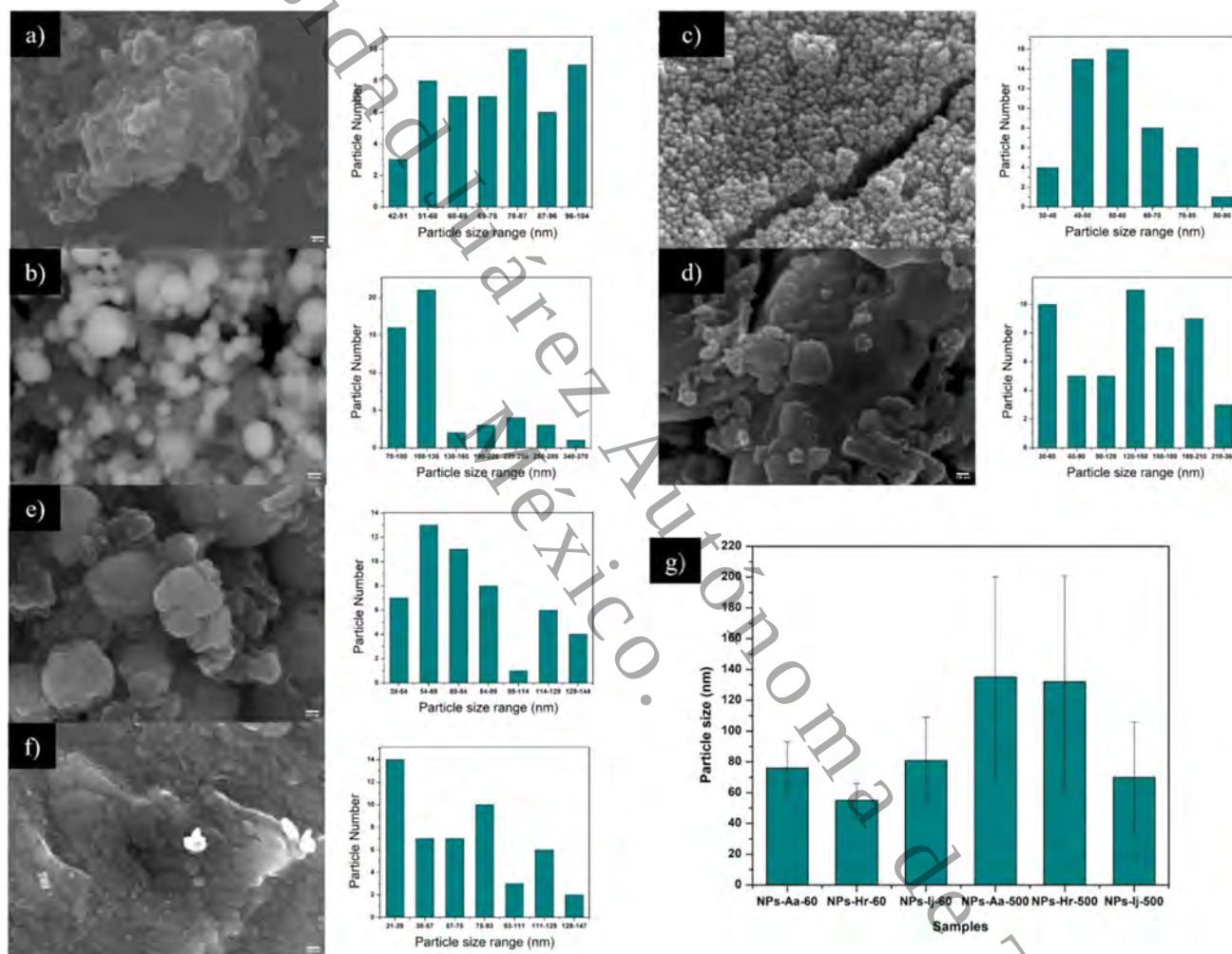


Fig. 5 FESEM micrographs of Ag/AgCl-NPs synthesized using medicinal plant extracts at 60°C (a, c, e) and 500°C (b, d, f). a, b NPs-Aa; c, d NPs-Hr; e, f NPs-Ij. g Average particle size distribution of the synthesized Ag/AgCl-NPs

Table 4 EDS analysis of Ag/AgCl-NPs synthesized using medicinal plant extracts at 60°C and 500°C .

Element	Ag/AgCl-NPs (60°C) W%			Ag/AgCl-NPs (500°C) W%		
	Aa	Hr	Ij	Aa	Hr	Ij
C	3.6	15.9	21.00	5.0	5.8	3.7
O	27.8	8.5	21.0	16.7	12.7	0.0
Cl	5.6	13.6	6.7	5.2	9.3	0.5
Ag	63.0	62.0	51.3	73.1	72.2	96.3

13.6 wt% in NPs dried at 60 °C and from 0.5 to 9.3 wt% in those calcined at 500 °C. The presence of C and O is primarily attributed to residuals from the plant extracts, while Cl reflects the formation of AgCl compounds (Table 4).

The XPS spectra (Fig. 6), revealed prominent peaks at 368 eV and 374 eV, corresponding to the Ag 3d_{5/2} and Ag 3d_{3/2} transitions, respectively, indicating that the majority of the Ag remains in its metallic state with minimal oxidation. The symmetry and sharp definition of these peaks suggest a homogeneous elemental distribution on the surface of the Ag/AgCl-NPs. Further XPS analysis (Fig. 6b and d) provided insight into the elemental composition of the Ag/AgCl-NPs. A peak observed around 532 eV confirms the presence of oxygen (O1s), likely associated with carbonyl (C=O) or hydroxyl (–OH) groups. The peak near 285 eV corresponds to carbon (C1s), indicative of C–C and C–H bonds from organic compounds, while the peak at 198 eV represents chlorides (Cl2p_{3/2}). These findings (Figs. S3, S4)

suggest that the surface of the Ag/AgCl-NPs is coated with organic molecules, forming a stabilizing organic layer. A comparison of the spectra from the two thermal treatments (Fig. 6a and c), revealed that the most notable difference is the increased peak intensities after calcination at 500 °C, suggesting higher purity of the Ag/AgCl-NPs. Both spectra confirm that metallic silver (Ag⁰) is the predominant oxidation state, consistent with the results obtained from XRD and EDS analyses.

The bioactivity of Ag/AgCl-NPs dried at 60 °C and calcined at 500 °C was evaluated using the disc diffusion technique. The results showed that Ag/AgCl-NPs dried at 60 °C consistently produced larger inhibition zones compared to those calcined at 500 °C (Fig. 7). Specifically, an increase of 14–36% in inhibition was observed against *S. aureus* and 6–27% against *E. coli*. Despite these differences, the variations in inhibition zones were not statistically significant ($p > 0.05$). The inhibition zone of the control was 31 ± 1.7

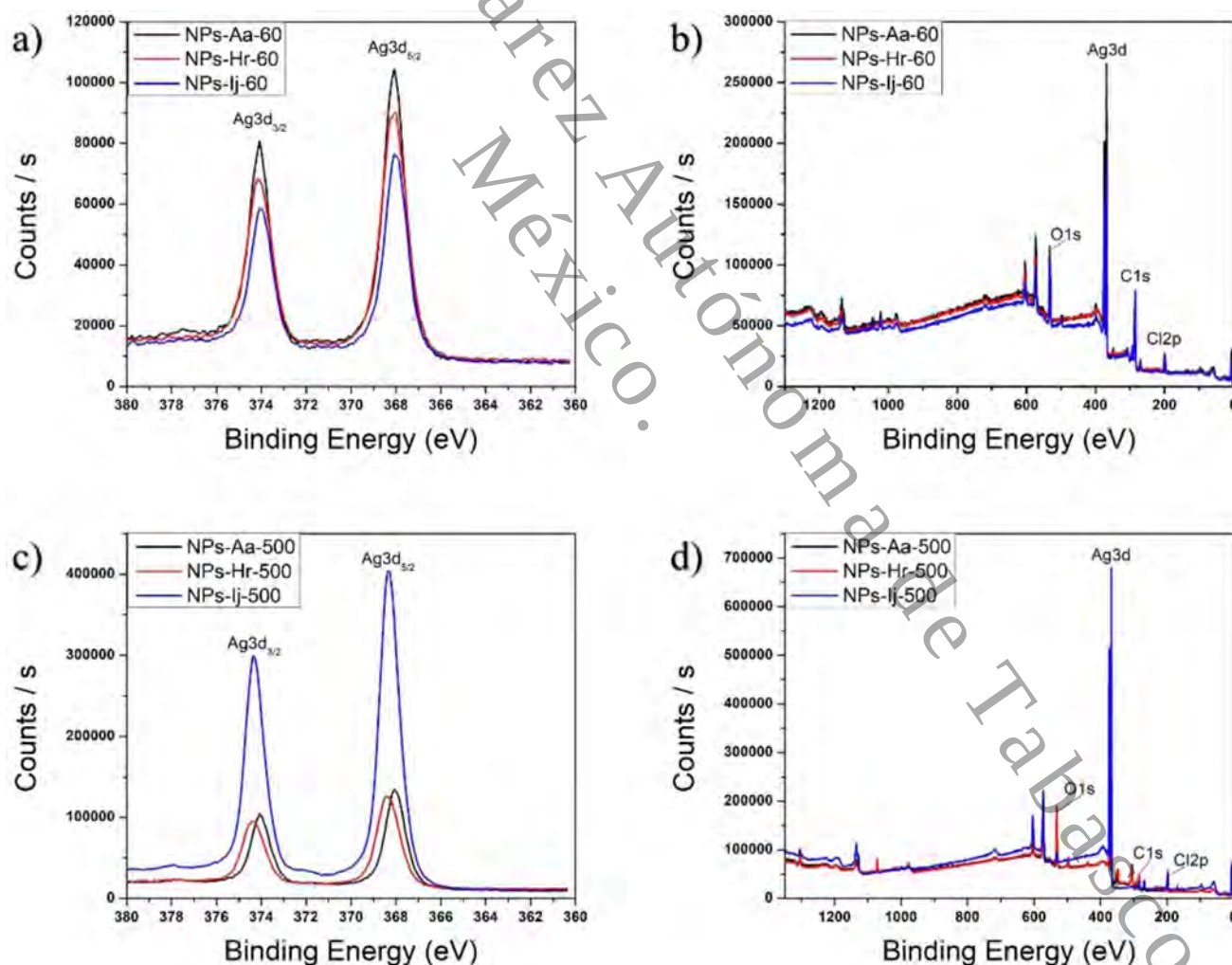


Fig. 6 XPS spectra of Ag/AgCl-NPs synthesized using medicinal plant extracts. High-resolution Ag 3d at **a** 60 °C and **c** 500 °C. Survey spectra at **b** 60 °C and **d** 500 °C

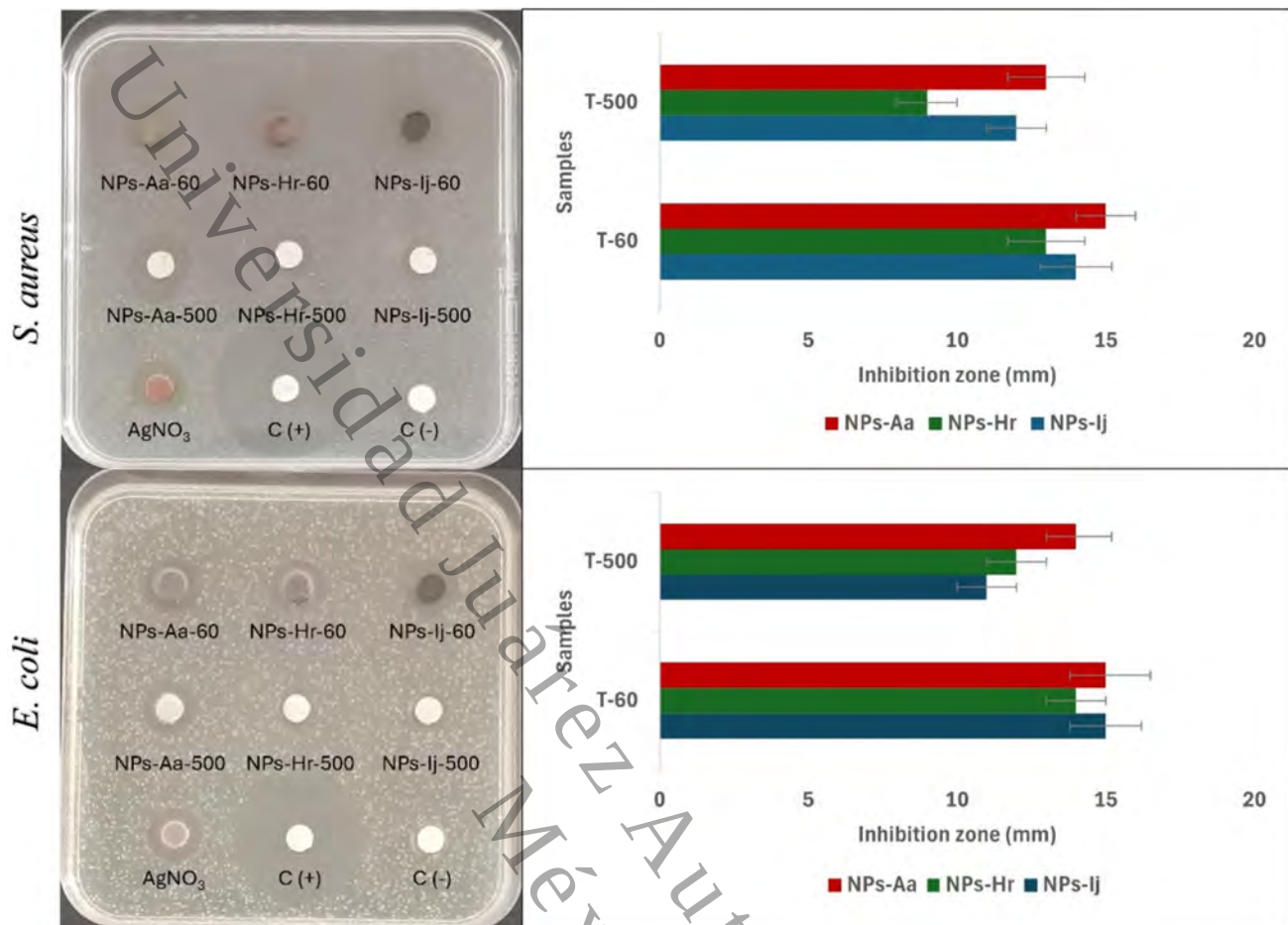


Fig. 7 Antibacterial evaluation by disc diffusion of Ag/AgCl-NPs synthesized at 60 and 500 °C against **a** *S. aureus* and **b** *E. coli*

against *E. coli*, while for *S. aureus*, it was 32 ± 2 in the disc diffusion test.

The MIC and MBC of the Ag/AgCl-NPs obtained from the extracts of the three plants were determined using the microdilution technique, with concentrations ranging from

5000 to 2 $\mu\text{g/mL}$ (Table 5 and Fig. S5). The results show that for *S. aureus*, NPs-Aa-500 and NPs-Hr-500 exhibited significantly lower MICs (312 $\mu\text{g/mL}$) compared to those synthesized at 60 °C (625 $\mu\text{g/mL}$). Conversely, NPs-Ij-60

Table 5 Antibacterial activity of Ag/AgCl-NPs against *S. aureus* and *E. coli*: MIC and MBC values ($\mu\text{g/mL}$) and the mode of action

Bacterium	Nanoparticles	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC/MIC	Mode of action
<i>S. aureus</i>	NPs-Aa-60	625	1250	2	Bactericide
	NPs-Aa-500	312	312	1	Bactericide
	NPs-Hr-60	625	1250	2	Bactericide
	NPs-Hr-500	312	312	1	Bactericide
	NPs-Ij-60	156	312	2	Bactericide
	NPs-Ij-500	5000	>5000	1	Not defined
<i>E. coli</i>	NPs-Aa-60	39	78	2	Bactericide
	NPs-Aa-500	4	19	5	Bactericide
	NPs-Hr-60	19	78	4	Bactericide
	NPs-Hr-500	19	19	1	Bactericide
	NPs-Ij-60	9	19	2	Bactericide
	NPs-Ij-500	39	78	2	Bactericide

displayed a much lower MIC (156 $\mu\text{g/mL}$) than those calcined at 500 $^{\circ}\text{C}$ (5000 $\mu\text{g/mL}$).

For *E. coli*, NPs-Aa-500 showed a drastic reduction in MIC (4 $\mu\text{g/mL}$) compared to those synthesized at 60 $^{\circ}\text{C}$ (39 $\mu\text{g/mL}$). On the other hand, NPs-Hr exhibited the same MIC at both temperatures (19 $\mu\text{g/mL}$), but the MBC at 500 $^{\circ}\text{C}$ was more effective (19 $\mu\text{g/mL}$) compared to 60 $^{\circ}\text{C}$ (78 $\mu\text{g/mL}$). NPs-Ij-60 exhibited a lower MIC (9 $\mu\text{g/mL}$) compared to those synthesized at 500 $^{\circ}\text{C}$ (39 $\mu\text{g/mL}$).

When comparing both thermal treatments, NPs synthesized at 500 $^{\circ}\text{C}$ generally exhibited enhanced antibacterial efficiency, as evidenced by lower MIC and MBC values, particularly for NPs-Aa. However, in some cases, such as NPs-Ij against *S. aureus* and *E. coli*, NPs synthesized at 60 $^{\circ}\text{C}$ were more effective, suggesting that calcination temperatures do not always enhance antibacterial activity. The Ag/AgCl-NPs were found to exhibit bactericidal activity in all cases. For the control, the MIC for *S. aureus* was 19 $\mu\text{g/mL}$, while for *E. coli* the MIC was 9 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 8 shows strong and significant positive correlations between polyphenol content (P) and NPs yield (Y) ($r=0.922$), as well as between the polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) ($r=0.928$). Conversely, strong and significant negative correlations were observed between polyphenols content (P) and flavonoids content (F) ($r=-0.883$), flavonoids content (F) and NPs yield (Y) ($r=-0.996$), and hydrodynamic size (HS) and zone of inhibition against *S. aureus* (ZOISa) ($r=-0.854$). The remaining correlations were not statistically significant, indicating

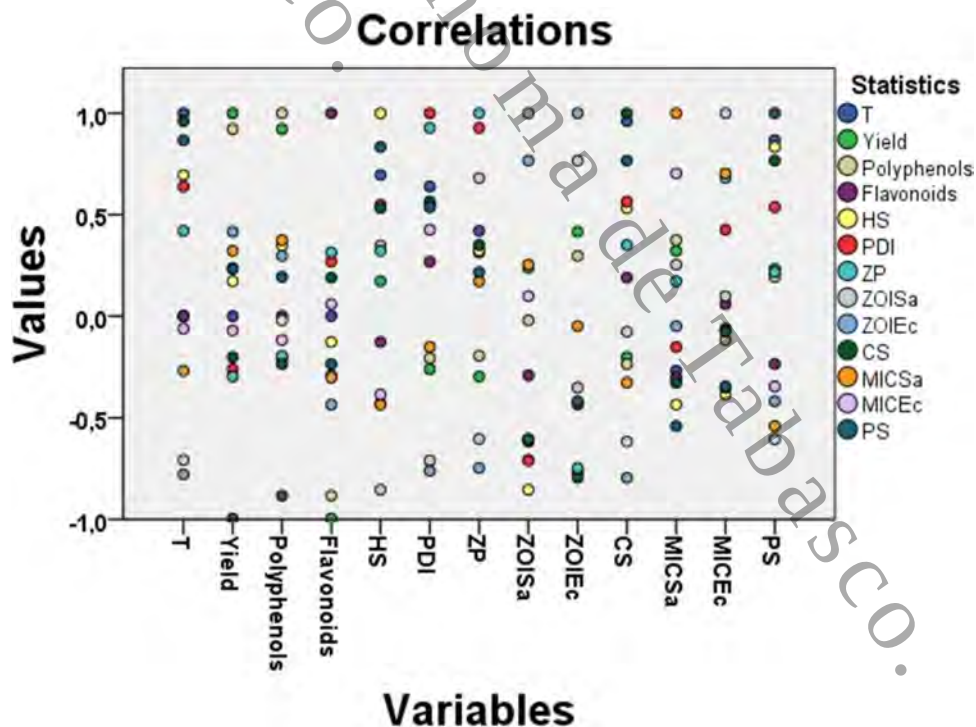
insufficient evidence to conclude a relationship between these variables (Table S1).

Discussion

The study confirmed the effectiveness of bio-assisted synthesis methods for producing Ag/AgCl-NPs using plant extracts from *A. arvensis*, *H. rovirosae*, and *I. jinicuil*. Polyphenol and flavonoid content in these extracts significantly influenced the physical, structural, and antibacterial properties of the Ag/AgCl-NPs, particularly under different thermal treatment. As confirmed by FTIR and XPS analyses (Fig. 1 and 6), polyphenols and flavonoids acted as both reducing and stabilizing agents during the synthesis of NPs, while chloride ions (Cl^-) in the medium facilitated Ag/AgCl-NPs formation (Table 1 and Fig. 9) [28]. These bioactive compounds not only contributed to the formation of the NPs but also to their colloidal stability, preventing agglomeration through steric hindrance [29, 30], as supported by the DLS results, which indicated relatively homogeneous hydrodynamic size distributions at 60 $^{\circ}\text{C}$ compared to those calcined at 500 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4 and Table 3).

Significant variations in polyphenol content were observed between the *I. jinicuil* extract and those from *A. arvensis* and *H. rovirosae* correlated directly with NPs yield. However, the trend for flavonoids was inverse, where lower flavonoid concentration resulted in higher Ag/AgCl-NPs yields. This phenomenon can be attributed to the rapid

Fig. 8 Pearson's correlations coefficients between the polyphenols (P) and flavonoids (F) of the plants used, and the properties of the Ag/AgCl-NPs including yield (Y), crystallite size (CS), hydrodynamic size (HS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), zone of inhibition (ZOI), where Sa: *S. aureus* and Ec: *E. coli*, minimum inhibitory concentration (MIC), and particle size (PS)



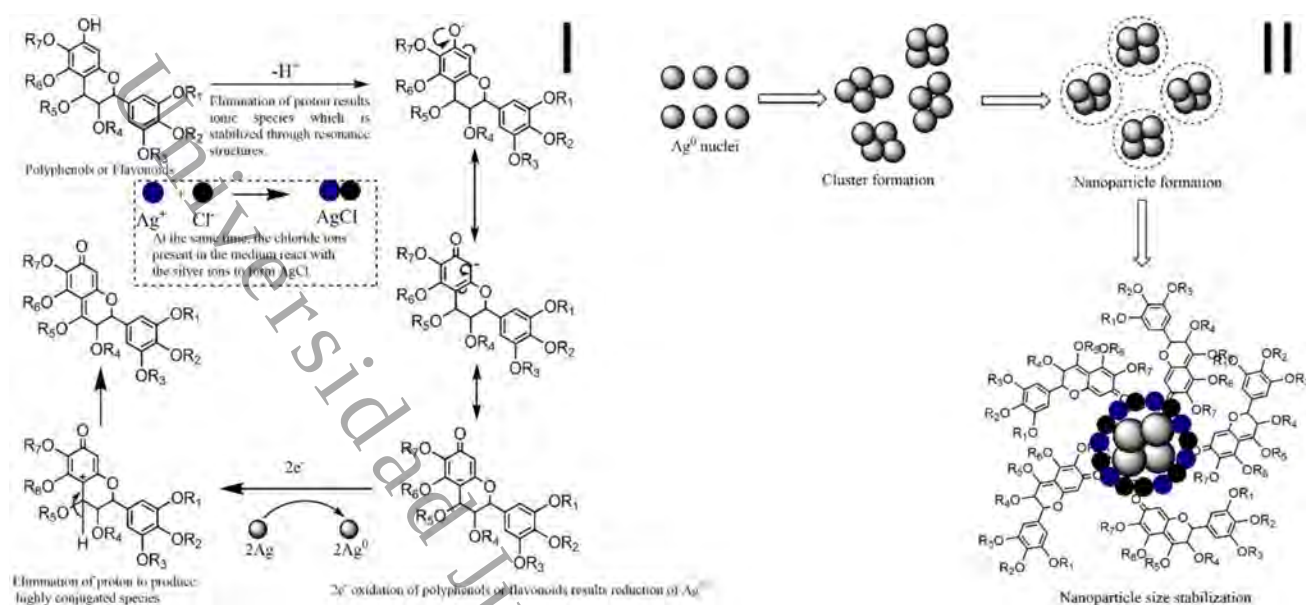


Fig. 9 Reaction mechanism for the formation of Ag/AgCl-NPs [28]. (I) The reduction process mediated by the polyphenols and flavonoids present in the extracts is depicted. (II) The formation and stabilization of Ag/AgCl-NPs are illustrated

action of flavonoids in reducing silver ions and their chelating properties, stabilizing smaller particles and inhibiting further growth, which reduces the overall NP mass [5, 31]. These results align with previous studies on the influence of plant extract composition on NPs characteristics [32].

Ag/AgCl-NPs exhibit efficient optical properties, including plasmonic resonance. UV–Vis absorption peaks between 430 and 450 nm (Fig. 2) align with previous studies, which report resonances typically within the 400–440 nm range [33, 34]. Variations in UV–Vis wavelengths can be explained by differences in particle size, with smaller particles absorbing at shorter wavelengths (blue shift), and larger ones at longer wavelengths (red shift). The shape and aggregation of the NPs also influence these variations, as does the presence of AgCl on the NP surface, which alters the optical properties compared to pure metallic silver (Ag^0), shifting the absorption peaks. The red shift (typically indicative of larger particle sizes) observed for polydisperse Ag/AgCl-NPs (Table 3) underscores the sensitivity of NPs to size and their surrounding dielectric environment [35].

XRD analysis showed sharper and more intense diffraction peaks for Ag/AgCl-NPs calcined at 500 °C compared to those treated at 60 °C (Fig. 3), suggesting higher crystallinity and a greater prevalence of metallic Ag formation at elevated temperatures. This was further confirmed by XPS analysis (Fig. 6), confirming that metallic silver (Ag^0) was the predominant phase in both thermal treatments [36]. EDS results also demonstrated an increased proportion of metallic Ag after calcination (Table 4 and Fig. 6), implying enhanced purity. However, as shown in

Figs. 4, 5 and Table 3, an increase in particle size and polydispersity was noted in Ag/AgCl-NPs calcined at 500 °C. Elevated temperatures enhance atomic rearrangement, reducing crystallographic defects and improving overall crystallinity. The removal of stabilizing organic compounds further encourages the unrestricted growth of silver crystals. Despite some agglomeration, calcination led to the formation of larger, more defined particles, as evidenced by irregular shapes and increased agglomeration compared to Ag/AgCl-NPs dried at 60 °C. The variability in particle size and morphology could be linked to the fact that, at high temperatures (500 °C), silver and chlorine atoms exhibit greater thermal mobility. This promotes the coalescence of smaller particles or crystals into larger units, resulting in larger crystal sizes. This phenomenon, known as sintering, occurs when particles fuse together to minimize total surface energy [37].

The coexistence of Ag and AgCl, as detected by XRD, EDS, and XPS, suggests a heterostructure or possibly a core–shell configuration (Figs. 3, 6, 9, and Table 4), where a metallic Ag core is surrounded by an AgCl shell along with organic molecules [38]. The formation of this structure is likely due to chlorine present during synthesis, which promotes the deposition of AgCl on the Ag surface [39]. The presence of AgCl enhances the antibacterial efficacy by generating a negative charge on the NPs surface, preventing aggregation through electrostatic repulsion and increasing colloidal stability [40]. This was further supported by consistently negative zeta potential values across all samples (Table 3), indicating moderate stability, similar to AgNPs

obtained through other plant-based methods, which typically exhibit values below -25 mV [21, 41].

A significant positive correlation between the polydispersity index and zeta potential suggests that higher polydispersity could still promote colloidal stability despite particle size variability. This interaction between surface charge and particle dispersion is crucial for maintaining the NPs stability in suspension. Surface modification of NPs plays a vital role in their interaction with biological systems, influencing bioavailability and toxicity [42]. In addition to stabilizing the NPs, AgCl contributes to antibacterial properties, commonly utilized in biomedical applications, such as dressings and bandages [18, 43]. The Ag/AgCl combination generates Ag^+ ions and reactive oxygen species (ROS) under light irradiation, which effectively kill both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Fig. 10) [29, 44, 45].

Polyphenols and flavonoids not only stabilize the Ag/AgCl-NPs but also enhance their antibacterial efficacy [30, 46]. Studies indicate that polyphenols induce ROS generation within bacterial cells, causing lipid peroxidation and damage to proteins and nucleic acids, ultimately resulting in cell death [47]. Flavonoids inhibit key bacterial enzymes like DNA gyrase, disrupting replication processes [48]. These compounds also destabilize bacterial membranes by binding to bilayer lipids, forming pores, and disrupting osmotic balance. Combined with the controlled release of Ag^+ ions, these mechanisms significantly enhance bactericidal activity against *S. aureus* and *E. coli*.

Although inhibition zones ranging from 9 to 15 mm were observed against *E. coli* and *S. aureus*, the differences in antibacterial efficacy between the calcined and non-calcined NPs were not statistically significant. This suggests that while NPs size may affect the inhibition zone (ZOI), it is not the only factor determining antibacterial performance [44]. At higher NPs concentrations, the amount of silver ions released could be similar in calcined and non-calcined samples, thereby reducing differences in ZOI [40]. Zeta potential values being comparable across samples also imply similar colloidal stability. Moreover, antibacterial activity is influenced not only by silver ion release but also by ROS generation and interaction with bacterial membranes, which were consistent across both samples.

These factors help explain the differences between liquid media and agar-based assay. In liquid media, NPs maintain more direct and sustained contact with the cells, often increasing their antibacterial efficacy [25, 49]. As seen in disc diffusion (Fig. 7) and microdilution assays (Table 5 and Fig. S5), the Ag/AgCl-NPs exhibited different antibacterial behaviors. In the diffusion assays, NPs must traverse a solid medium (agar) to reach bacteria, potentially limiting diffusion and reducing inhibition capacity, as observed with NPs-Ij-60. Conversely, in microdilution assays, lower MIC values were consistently observed for *E. coli* compared to *S. aureus*, underscoring the relevance of using medicinal plants with known antibacterial properties (Table 5) [1, 2]. The MBC/MIC ratio confirmed that the Ag/AgCl-NPs exhibit

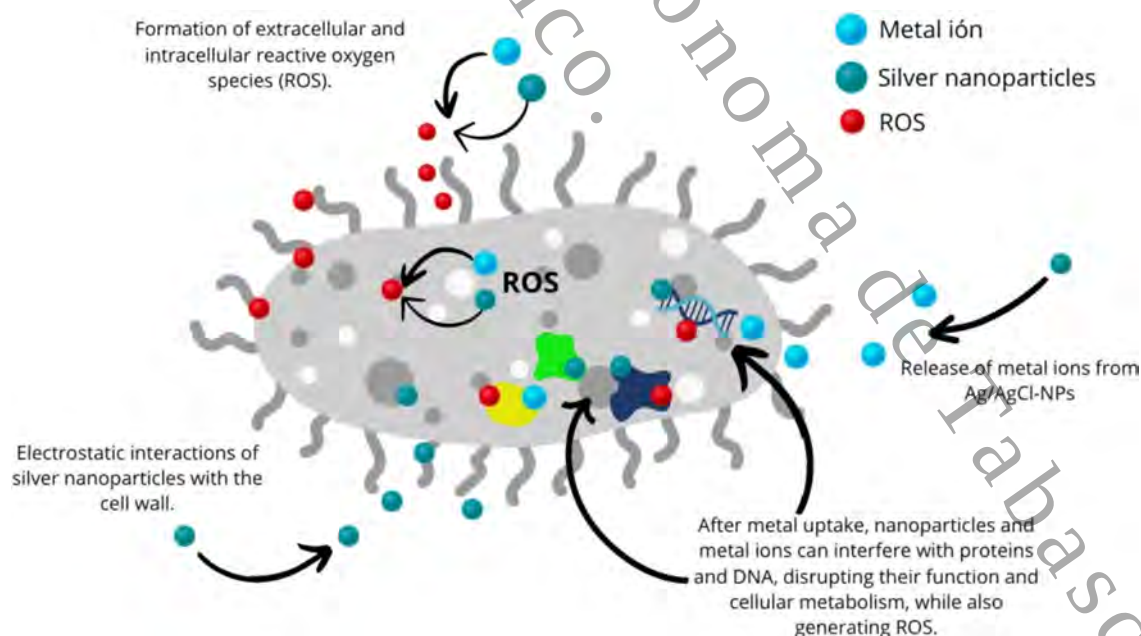


Fig. 10 Mechanism of action of Ag/AgCl-NPs on bacterial cells [44]: The NPs electrostatically interact with the cell wall, facilitating the release of metal ions. Once absorbed, these metal ions interfere with proteins and DNA, disrupting their functions and cellular metabo-

lism. Additionally, ROS are generated both inside and outside the cell, further contributing to cellular damage and ultimately leading to bacterial death

bactericidal activity against both *E. coli* and *S. aureus*. This supports the synergistic mechanisms involving organic compounds, AgCl, and metallic Ag, which enhances the bactericidal action and reduce the potential for bacterial resistance development [50]. The observed bactericidal effect of Ag/AgCl-NPs at low concentrations in the microdilution assay can be attributed to structural differences in the bacterial cell walls. In the case of *E. coli*, a Gram-negative bacterium, its thinner and more permeable outer membrane facilitates the penetration of nanoparticles and the subsequent release of silver ions. This interaction leads to an increased generation of reactive oxygen species (ROS), enhancing the bactericidal activity (Fig. 10). In contrast, *S. aureus*, a Gram-positive bacterium, possesses a thicker peptidoglycan layer, which serves as a protective barrier, thereby reducing the overall efficacy of the nanoparticles [44, 51].

Prior studies [52, 53] emphasize the importance of plant extracts as reducing and stabilizing agents in Ag/AgCl-NPs synthesis. In this study, extracts from *A. arvensis*, *H. rovirosae*, and *I. jinicuil* demonstrated a significant correlation between polyphenol and flavonoid content with NPs yield, a finding aligning with the study of Vankdoth et al. [54]. They attribute the catalytic and morphological properties of the NPs to the phytochemical composition of the extracts. Biological synthesis methods, supported by previous research [55], have been shown to improve NP biocompatibility due to the presence of bioactive secondary metabolites. All synthesized NPs demonstrated significant antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*, in line with previous reports that emphasize the broad-spectrum efficacy of Ag/AgCl-NPs [56–58]. Sarvepalli et al. [55] also confirmed that biologically synthesized NPs display enhanced antibacterial efficacy.

The correlations identified are essential for optimizing NP synthesis. A positive correlation between polyphenol content and NPs yield suggests that higher levels of polyphenol enhance NPs production, which is advantageous for large-scale applications. Conversely, the negative correlation with flavonoids indicates that these compounds contribute to the formation of smaller, more stable NPs, ideal for drug delivery systems and antibacterial coatings. The interplay between the PDI and zeta potential further underscores the importance of colloidal stability and size uniformity, both of which are crucial for effective dispersion in solutions. Smaller NPs, with a higher surface area, demonstrated increased antibacterial activity in diffusion assays against *S. aureus*, likely due to enhanced silver ion release and overall effectiveness [44, 59]. The tailoring metabolite concentrations in plant extracts present an opportunity to further refine NPs properties for specific applications. The bio-assisted synthesis of Ag/AgCl-NPs using medicinal plant extracts offers a sustainable and eco-friendly approach with strong antibacterial potential. Nevertheless, optimizing synthesis

conditions remains crucial to fully harness the capabilities of these NPs [60].

Polyphenols and flavonoids play a critical role in influencing the yield and stability of Ag/AgCl-NPs. However, compared to ZnO/CuO composites, Ag/AgCl-NPs show a higher tendency for agglomeration, particularly after calcination, which can reduce surface area and lower antibacterial efficiency (Table S2; [61–67]). Future research should explore synergies with other metal oxides to enhance NPs stability and broaden their antibacterial applications. Despite these challenges, the plant-based synthesis of Ag/AgCl-NPs holds significant promise for biomedical applications and the prevention of biofouling on marine vessels.

Conclusions

The bio-assisted synthesis of Ag/AgCl-NPs using extracts from *H. rovirosae*, *I. jinicuil*, and *A. arvensis* proves to be an efficient, eco-friendly method. The phytochemicals, particularly polyphenols and flavonoids, play a crucial role in the reduction and stabilization of NPs, significantly influencing their physical properties and broad-spectrum antibacterial efficacy. Ag/AgCl-NPs predominantly exhibit bactericidal activity, crucial for addressing microbial resistance. Temperature significantly impacts the biosynthesis process. Ag/AgCl-NPs dried at 60 °C demonstrated smaller, more uniform sizes, and enhanced stability compared to those calcined at 500 °C, which showed increased polydispersity. Lower temperatures help preserve bioactive compounds that contribute to NP stability and efficacy. Analytical techniques such as FTIR, DLS, XPS, and FESEM confirmed that organic compounds from the plant extracts contribute to stabilizing Ag/AgCl-NPs. XPS analysis indicated that metallic silver (Ag⁰) predominates, suggesting high purity, with polyphenol content correlating directly with NP yield. Polyphenols not only facilitate silver ion reduction by donating electrons but also enhance nanoparticle production by preventing agglomeration. The presence of adsorbed chlorides and organic molecules on the NP surface forms a protective layer, enhancing colloidal stability through electrostatic repulsion and preventing aggregation. Using medicinal plant extracts for Ag/AgCl-NPs biosynthesis offers a sustainable alternative to conventional methods, delivering both environmental benefits and enhanced antibacterial efficacy. The specific phytochemical composition of these extracts is critical in determining NP synthesis, stabilization, and antibacterial functionality. Thermal treatment allows for precise control over nanoparticle properties: temperatures below 100 °C preserve size and morphology, while higher temperatures (200–500 °C) promote sintering, altering size and shape but improving crystallinity.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10876-024-02722-w>.

Acknowledgements The authors would like to acknowledge Patricia Quintana for the use of the LANNBIO facilities (CINVESTAV, Mérida) and the technical assistance of Victor Rejón Moo with SEM.

Author Contributions Author contributions J.L.T.L.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Roles/Writing—original draft. S.L.M.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review, and editing. S.R.G.: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Roles/Writing—original draft, Writing—review, and editing. M.A.L.: Data curation, Funding acquisition, Formal analysis, Investigation, Project administration, Writing - review, and editing. A.G.R.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review, and editing. R.L.G.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review, and editing. C.L.G.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review, and editing. G.M.M.: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Writing—review, and editing. S.G.C.: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Resources, Supervision, Methodology, Project administration, Roles/Writing—original draft, Writing - review, and editing. All authors reviewed the manuscript.

Funding This research was funded by CCYTET under Grant Number PRODECTI-2022-01/75, by CONAHcyT under Grant Number CF-2023-I-566 and by the Project EPM 219430 "Advanced Materials for Biofilm and Biofouling Inhibition".

Data Availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Ethical Approval Not applicable

Research Involving Humans and Animals Statement This manuscript does not contain any studies with human participants or animals performed by the authors.

Informed Consent The study does not involve any human subjects, therefore consent to participate is not applicable.

References

1. E. A. Ble-González, A. Gómez-Rivera, A. Zamilpa, R. López-Rodríguez, C. E. Lobato-García, P. Álvarez-Fitz, and M. González-Cortazar (2022). Ellagitannin, phenols, and flavonoids as antibacterials from *Acalypha arvensis* (Euphorbiaceae). *Plants* **11**, 300. <https://doi.org/10.3390/plants11030300>.
2. Gallegos-García AJ, Lobato-García CE, González-Cortazar M, Herrera-Ruiz M, Zamilpa A, Álvarez-Fitz P, Pérez-García MD, López-Rodríguez R, Ble-González EA, Medrano-Sánchez EJ, Feldman MR, Bugarin A, Gómez-Rivera A (2022) Preliminary phytochemical profile and bioactivity of *Inga jinicuil* Schltdl & Cham. ex G. Don. *Plants* **11**:794. <https://doi.org/10.3390/plants11060794>
3. Jones, RW, Cruz-Torres MF, López-González C, Duarte-Fernández MA (2018) Conservation status the genus *Hampea* (Malvaceae: Gossypieae) in Mexico. *Bot Sci* **96**:426-442. <https://doi.org/10.17129/botsci.1857>
4. G. Marslin, K. Siram, Q. Maqbool, R. K. Selvakesavan, D. Kruszka, P. Kachlicki, and G. Franklin (2018). Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Materials* **11**, 940. <https://doi.org/10.3390/ma11060940>.
5. S. Irvani (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem* **13**, 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>.
6. M. Ghaffari-Moghaddam, R. Hadi-Dabanlou, M. Khajeh, M. Rakhshanipour, and K. Shameli (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. *Korean J Chem Eng* **31**, 548–557. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0014-6>.
7. K. Parvathalu, S. Chinmayee, and B. Preethi (2023). Green synthesis of silver nanoparticles using *Argyrea nervosa* leaf extract and their antimicrobial activity. *Plasmonics* **18**, 1075–1108. <https://doi.org/10.1007/s11468-023-01835-8>.
8. V. Selvaraj, S. Sagadevan, L. Muthukrishnan, M. R. Johan, and J. Podder (2019). Eco-friendly approach in synthesis of silver nanoparticles and evaluation of optical, surface morphological and antimicrobial properties. *J Nanostructure Chem* **9**, 153–162. <https://doi.org/10.1007/s40097-019-0306-9>.
9. M. Das and R. P. Bodroth (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Flavonoids and Assessment of Their Antimicrobial Properties. *BioNanoSci.* **13**, 186–193. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-01045-2>.
10. S. Jadoun, R. Arif, and N. K. Jangid (2021). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. *Environ Chem Lett* **19**, 355–374. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>.
11. L. Gharibshahi, E. Saion, E. Gharibshahi, A. H. Shaari, and K. A. Matori (2017). Structural and optical properties of Ag nanoparticles synthesized by thermal treatment method. *Materials* **10**, 402. <https://doi.org/10.3390/ma10040402>.
12. W. R. Li, X. B. Xie, Q. S. Shi, H. Y. Zeng, Y. S. Ou-Yang, and Y. B. Chen (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>.
13. C. Krishnaraj, E. G. Jagan, S. Rajasekar, P. Selvakumar, P. T. Kalaiichelvan, and N. J. C. S. B. B. Mohan (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces* **76**, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.008>.
14. A. Frei, A. D. Verderosa, A. G. Elliott, J. Zuegg, and M. A. Blaskovich (2023). Metals to combat antimicrobial resistance. *Nat Rev Chem* **7**, 202–224. <https://doi.org/10.1038/s41570-023-00463-4>.
15. E. D. Cavassin, L. F. P. de Figueiredo, and J. P. Otoch (2015). Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnol* **13**, 64. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0120-6>.
16. S. González-Fernández, V. Lozano-Iturbe, and B. García (2020). Antibacterial effect of silver nanorings. *BMC Microbiol* **20**, 172. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01854-z>.
17. K. Okaiyeto, M. O. Ojemaye, H. Hoppe, L. V. Mabinya, and A. I. Okoh (2019). Phytofabrication of Silver/Silver Chloride Nanoparticles Using Aqueous Leaf Extract of *Oedera genistifolia*: Characterization and Antibacterial Potential. *Molecules* **24**, 4382. <https://doi.org/10.3390/molecules24234382>.
18. Y. Zhou, R. Chen, T. He, K. Xu, D. Du, N. Zhao, and Y. Lin (2016). Biomedical potential of ultrafine Ag/AgCl nanoparticles coated on graphene with special reference to antimicrobial performances and burn wound healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 15067–15075. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03021>.
19. Y. Zhu, H. Liu, L. Yang, and J. Liu (2012). Study on the synthesis of Ag/AgCl nanoparticles and their photocatalytic properties.

- Mater Res Bull* **47**, 3452–3458. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.07.005>.
20. Y. Zhou, R. Chen, and T. He (2016). Biomedical potential of ultrafine Ag/AgCl nanoparticles coated on graphene with special reference to antimicrobial performances and burn wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 11603–11612. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03021>.
 21. S. Raj, S. C. Mali, and R. Trivedi (2018). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochem Biophys Res Commun* **503**, 2814–2819. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.045>.
 22. Vogel AI, Tatchell AR, Furnis BS, Hannaford AJ, PWG Smith (1996) Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th Edition. Prentice Hall. ISBN 0-582-46236-3.
 23. E. Iqbal, K. A. Salim, and L. B. Lim (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *J King Saud Univ Sci* **27**, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2015.02.003>.
 24. H. Zhu, Y. Wang, Y. Liu, Y. Xia, and T. Tang (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Anal Methods* **3**, 90–97. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9091-2>.
 25. M. Soria-Castro, S. C. De la Rosa-García, P. Quintana, S. Gómez-Cornelio, A. Sierra-Fernández, and N. Gómez-Ortiz (2019). Broad spectrum antimicrobial activity of $\text{Ca}(\text{Zn}(\text{OH})_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and ZnO nanoparticles synthesized by the sol–gel method. *J Sol-Gel Sci Technol* **89**, 284–294. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4759-y>.
 26. Clinical and Laboratory Standards Institute (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne CLSI, PA 19.
 27. R. Mogana, A. Adhikari, M. N. Tzar, R. Ramliza, and C. J. B. C. M. Wiart (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC complement med ther* **20**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2837-5>.
 28. A. K. Singh, M. Talat, D. P. Singh, and O. N. Srivastava (2010). Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalization with amine group. *J Nanopart Res* **12**, 1667–1675. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9835-3>.
 29. M. Kulak and Samsa C. Gulmez (2023). Flavonoids Mediated Nanomaterials Synthesis, Characterization, and Their Applications. *Secondary Metabolites Based Green Synthesis of Nanomaterials and Their Applications* **1**, 49–65. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0927-8_3.
 30. A. Hassanvand, S. Saadatmand, and Yazdi H. Lari (2021). Biosynthesis of NanoSilver and Its Effect on Key Genes of Flavonoids and Physicochemical Properties of *Viola tricolor* L. *Iran J Sci Technol Trans Sci* **45**, 805–819. <https://doi.org/10.1007/s40095-021-01091-7>.
 31. N. Sahu, D. Soni, and B. Chandrashekar (2016). Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. *Int Nano Lett* **6**, 173–181. <https://doi.org/10.1007/s40089-016-0184-9>.
 32. M. A. Ali, T. Ahmed, W. Wu, A. Hossain, R. Hafeez, M. M. Islam Masum, and B. Li (2020). Advancements in plant and microbe-based synthesis of metallic nanoparticles and their antimicrobial activity against plant pathogens. *Nanomaterials* **10**, 1146. <https://doi.org/10.3390/nano10061146>.
 33. P. Mulvaney (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir* **12**, 788–800. <https://doi.org/10.1021/la9502711>.
 34. L. Mulfinger, S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, and C. Boritz (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *J Chem Educ* **84**, 322. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>.
 35. K. B. Mogensen and K. Kneipp (2014). Size-dependent shifts of plasmon resonance in silver nanoparticle films using controlled dissolution: monitoring the onset of surface screening effects. *J Phys Chem C* **118**, 28075–28083. <https://doi.org/10.1021/jp505632n>.
 36. A. Mirzaei, K. Janghorban, and B. Hashemi (2016). Characterization and optical studies of PVP-capped silver nanoparticles. *J Nanostruct Chem* **7**, 37–46. <https://doi.org/10.1007/s40097-016-0212-3>.
 37. L. Zhuo, Q. Wang, and J. Sun (2024). Size-dependent thermal properties and sintering behaviors of silver nanoparticles: insights from molecular dynamics simulation. *Appl. Phys. A* **130**, 394. <https://doi.org/10.1007/s00339-024-07552-1>.
 38. Y. Qin, Y. Cui, and Z. Tian (2017). Synthesis of Ag@AgCl Core-Shell Structure Nanowires and Its Photocatalytic Oxidation of Arsenic (III) Under Visible Light. *Nanoscale Res Lett* **12**, 247. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2017-9>.
 39. F. Yang, D. Liu, and T. Wang (2016). Construction of Ag/AgCl nanostructures from Ag nanoparticles as high-performance visible-light photocatalysts. *J Nanopart Res* **18**, 335. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3658-9>.
 40. P. P. Li, H. X. Wu, and A. Dong (2022). Ag/AgX nanostructures serving as antibacterial agents: achievements and challenges. *Rare Met.* **41**, 519–539. <https://doi.org/10.1007/s12598-021-01822-0>.
 41. O. T. Jemilugba, S. Parani, V. Mavumengwana, and O. S. Oluwafemi (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Combretum erythrophyllum* leaves and its antibacterial activities. *Colloid Interface Sci Commun* **31**, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100191>.
 42. R. Abbasi, G. Shineh, and M. Mobaraki (2023). Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. *J Nanopart Res* **25**, 43. <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w>.
 43. R. Kaegi, A. Voegelin, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Siegrist, and M. Burkhardt (2015). Transformation of AgCl nanoparticles in a sewer system—A field study. *Sci Total Environ* **535**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.075>.
 44. M. Godoy-Gallardo, U. Eckhard, L. M. Delgado, Y. J. de Roo Puente, M. Hoyos-Nogués, F. J. Gil, and R. A. Perez (2021). Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioact Mater* **6**, 4470–4490. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033>.
 45. L. A. L. Thi, C. C. Le, and V. T. Pham (2023). Green synthesis of Ag@AgCl nanoparticles using purple Cam leaf: characterization and catalytic activity. *Bull Mater Sci* **46**, 133. <https://doi.org/10.1007/s12034-023-02968-6>.
 46. M. Shiraz, H. Imtiaz, and A. Azam (2024). Phytogetic nanoparticles: synthesis, characterization, and their roles in physiology and biochemistry of plants. *Biometals* **37**, 23–70. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00542-5>.
 47. H. Tsuchiya (2010). Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food chemistry* **120**, 1089–1096. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.057>.
 48. T. T. Cushnie and A. J. Lamb (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>.
 49. R. López-González, M. H. Gutiérrez, R. L. García, S. A. Gómez-Cornelio, C. Lobato, A. Gómez-Rivera, and M. A. Álvarez-Lemus (2024). ZnO nanomaterials with enhanced antimicrobial activity obtained by *Eichhornia crassipes* aqueous extract-mediated synthesis. *J Chem Technol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1002/jctb.7601>.

50. T. C. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, and V. Yadav (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology* **7**, 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>.
51. A. Ebrahimezhad, M. Bagheri, S. M. Taghizadeh, A. Berenjian, and Y. Ghasemi (2016). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using microalgal secretory carbohydrates as a novel anticancer and antimicrobial. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* **7**, 015018. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/1/015018>.
52. U. T. Khatoon, A. Velidandi, and G. V. S. Rao (2023). Sodium borohydride mediated synthesis of nano-sized silver particles: Their characterization, anti-microbial and cytotoxicity studies. *Mater Chem Phys.* **294**, 126997. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126997>.
53. Velidandi A, Dahariya S, Pabbathi NPP, Kalivarathan D, Baadhe RR (2020) A review on synthesis, applications, toxicity, risk assessment, and limitations of plant extracts synthesized silver nanoparticles. *NanoWorld J.* **6**:35–60. <https://doi.org/10.17756/nwj.2020-079>
54. S. Vankdoh, A. Velidandi, M. Sarvepalli, and M. Vangalapati (2022). Role of plant (tulsi, neem and turmeric) extracts in defining the morphological, toxicity and catalytic properties of silver nanoparticles. *Inorg Chem Commun.* **140**, 109476. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109476>.
55. M. Sarvepalli, A. Velidandi, and N. Korrapati (2024). Chemical vs biological silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, and in vitro applications. *Inorg Chem Commun.* **167**, 112667. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112667>.
56. A. Velidandi, N. P. P. Pabbathi, S. Dahariya, S. Kagithoju, and R. R. Baadhe (2022). Bio-fabrication of silver-silver chloride nanoparticles using *Annona muricata* leaf extract: Characterization, biological, dye degradation, and eco-toxicity studies. *Int J Environ Sci Technol.* **19**, 6555–6572. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03461-5>.
57. A. Velidandi, M. Sarvepalli, P. Aramanda, M. L. Amudala, and R. R. Baadhe (2023). Effect of size on physicochemical, antibacterial, and catalytic properties of *Neolamarckia cadamba* (burflower-tree) synthesized silver/silver chloride nanoparticles. *Environ Sci Pollut Res.* **30**, 63231–63249. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26427-1>.
58. A. Velidandi, M. Sarvepalli, P. K. Gandam, and R. R. Baadhe (2023). Silver/silver chloride and gold bimetallic nanoparticles: Green synthesis using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract, characterization, antibacterial, catalytic, and recyclability studies. *Inorg Chem Commun.* **155**, 111107. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111107>.
59. A. Menichetti, A. Mavridi-Prinzezi, D. Mordini, and M. Montalti (2023). effect of size, shape and surface functionalization on the antibacterial activity of silver nanoparticles. *J Funct Biomater.* **14**, 244. <https://doi.org/10.3390/jfb14050244>.
60. A. A. Yaqoob, K. Umar, and M. N. M. Ibrahim (2020). Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Appl Nanosci* **10**, 1369–1378. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01318-w>.
61. Govindasamy GA, Mydin RBMSN, Sreekantan S, Harun NH (2021) Compositions and antimicrobial properties of binary ZnO–CuO nanocomposites encapsulated calcium and carbon from *Calotropis gigantea* targeted for skin pathogens. *Sci Rep.* **11**. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79547-w>
62. G. A. Govindasamy, R. B. S. M. N. Mydin, S. Sreekantan, and N. H. Harun (2021). Effect of calcination temperature on physicochemical and antimicrobial properties of green synthesized ZnO/C/Ca nanocomposites using *Calotropis gigantea* leaves. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* **12**, 015013. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/abe8da>.
63. G. A. Govindasamy, R. B. S. M. N. Mydin, N. H. Harun, W. N. F. W. Effendy, and S. Sreekantan (2023). Giant milkweed plant-based copper oxide nanoparticles for wound dressing application: physicochemical, bactericidal and cytocompatibility profiles. *Chem Pap.* **77**, 1181–1200. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02513-5>.
64. G. A. Govindasamy, R. B. S. M. N. Mydin, W. N. F. W. Effendy, and S. Sreekantan (2022). Novel dual-ionic ZnO/CuO embedded in porous chitosan biopolymer for wound dressing application: Physicochemical, bactericidal, cytocompatibility and wound healing profiles. *Mater Today Commun.* **33**, 104545. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104545>.
65. G. A. Govindasamy, R. B. S. M. N. Mydin, N. K. Gadaime, and S. Sreekantan (2023). Phytochemicals, biodegradation, cytocompatibility and wound healing profiles of chitosan film embedded green synthesized antibacterial ZnO/CuO nanocomposite. *J Polym Environ.* **31**, 4393–4409. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02902-1>.
66. G. A. Govindasamy, S. Sreekantan, K. A. Saharudin, M. T. Ong, P. J. Thavamany, and G. Sahgal (2024). Effect of compositions and heat treatments of polypropylene/PP-g-MAH/CuO-TiO₂ composites on thermal, crystallization, and antimicrobial properties. *BioNanoScience.* <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01453-6>.
67. G. A. Govindasamy, S. Sreekantan, K. A. Saharudin, R. Poliah, M. T. Ong, and P. J. Thavamany (2024). Composition-dependent physicochemical and bactericidal properties of dual Cu-TiO₂ nanoparticles incorporated in polypropylene. *BioNanoScience.* **14**, 770–782. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01339-7>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	SÍNTESIS BIOASISTIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP), ÓXIDO DE ZINC (ZnO-NP) Y ÓXIDO DE COBRE (CuO-NP) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EMPLEANDO EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES
Autor(a) o autores(ras) de la Tesis:	AUTOR: M.C. JORGE LUIS TORRES LÓPEZ BAJO LA DIRECCIÓN DE: DR. CARLOS ERNESTO LOBATO GARCÍA EN CODIRECCIÓN CON: DR. ABRAHAM GÓMEZ RIVERA DR. SERGIO ALBERTO GÓMEZ CORNELIO
ORCID:	0000-0002-8036-1580
Resumen de la Tesis:	La resistencia antibacteriana representa uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel global, debido al incremento de patógenos resistentes a antibióticos convencionales. En este contexto, la síntesis bioasistida de nanopartículas (NP) metálicas y óxidos metálicos surge como una alternativa sostenible y prometedora para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, al combinar eficiencia biológica con menor impacto ambiental. Por ello se sintetizaron NP de base metálica: de plata (AgNP), óxido de zinc (ZnO-NP) y óxido de cobre (CuO-NP) mediante síntesis bioasistida empleando extractos acuosos de <i>Acalypha arvensis</i> Poepp. & Endl., <i>Hampea rovirosae</i> Standl. e <i>Inga jinicuil</i> Schltdl. & Cham. ex G. Don, como agentes de síntesis y estabilización. Los extractos fueron caracterizados mediante FTIR y análisis colorimétricos para la cuantificación de polifenoles, flavonoides y cloruros totales, compuestos asociados con los procesos de formación y estabilización de NP. Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre las

	propiedades fisicoquímicas de los materiales obtenidos, las NP fueron sometidas a dos condiciones: secado a 60 °C y calcinación a 500 °C. La formación de las NP se confirmó mediante espectroscopía UV-Vis, mientras que la difracción de rayos X (DRX) mostró que el tratamiento térmico incrementó el tamaño de cristalito observado en de las AgNP ($\approx 20 - 50$ nanómetros (nm)) y favoreció la formación de fases cristalinas definidas en ZnO-NP y CuO-NP. La microscopía FESEM evidenció cambios en la morfología asociados al tratamiento térmico, y los análisis DLS y potencial zeta permitieron evaluar el tamaño hidrodinámico y la estabilidad coloidal de las suspensiones. La composición elemental y los estados químicos superficiales fueron corroborados mediante EDS y XPS. Los rendimientos de síntesis oscilaron entre 63 % y 92 %, siendo mayores cuando se empleó extracto de <i>A. arvensis</i>. En ensayos de difusión en disco, las NP secadas a 60 °C presentaron halos de inhibición de hasta 15 mm frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) y <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>), mientras que el tratamiento a 500 °C influyó en su actividad antibacteriana. En microdilución, algunas muestras calcinadas de ZnO-NP y AgNP mostraron MIC entre 0.156 y 0.312 mg mL⁻¹. El análisis de correlación de Pearson reveló que la temperatura se correlaciona positivamente con el tamaño de cristalito ($r > 0.96$) y negativamente con el halo de inhibición, mientras que el contenido de flavonoides se relaciona con un mayor potencial zeta y estabilidad coloidal.
--	---

	En conjunto, los resultados muestran que la composición fitoquímica de los extractos y el tratamiento térmico influyen significativamente en el rendimiento, tamaño, morfología, estabilidad coloidal y actividad antibacteriana de las NP obtenidas. Futuras investigaciones deberán enfocarse en la optimización del diseño de las NP y en la evaluación de su uso combinado con antibióticos convencionales para potenciar su eficacia y reducir la resistencia bacteriana. Además, se recomienda el uso de técnicas avanzadas como HPLC-MS o UHPLC-QTOF para identificar los metabolitos clave involucrados en la formación y funcionalidad de las NP.
Palabras claves de la Tesis:	Síntesis bioasistida; nanopartículas de base metálica; propiedades fisicoquímica; tratamientos térmicos; actividad antibacteriana.
Referencias citadas:	Gallegos-García, A. J.; Lobato-García, C. E.; González-Cortazar, M.; Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; Álvarez-Fitz, P.; Pérez-García, M. D.; López-Rodríguez, R.; Ble-González, E. A.; Medrano-Sánchez, E. J.; Feldman, M. R.; Bugarin, A.; Gómez-Rivera, A. Preliminary Phytochemical Profile and Bioactivity of <i>Inga jinicuil</i> Schltdl & Cham. Ex G. Don. <i>Plants</i> 2022, <i>11</i> (6), 754. Ble-González, E. A.; Gómez-Rivera, A.; Zamilpa, A.; López-Rodríguez, R.; Lobato-García, C. E.; Álvarez-Fitz, P.; Gutierrez-Roman, A. S.; Pérez-García, M. D.; Bugarin, A.; González-Cortazar, M. Ellagitannin, Phenols, and Flavonoids as Antibacterials from <i>Acalypha arvensis</i> (Euphorbiaceae). <i>Plants</i> 2022, <i>11</i> (3), 322. Iravani, S. Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. <i>Green Chem.</i> 2011, <i>13</i> (10), 2638–2650. Mittal, A. K.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Extracts. <i>Biotechnol. Adv.</i> 2013, <i>31</i> (2), 346–356. Makarov, V. V.; Love, A. J.; Sinitsyna, O. V.; Makarova, S. S.; Yaminsky, I. V.; Taliansky, M. E.; Kalinina, N. O. "Green" Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. <i>Acta Naturae</i> 2014, <i>6</i> (1), 35–44.

Universidad Juárez del Estado de Durango	Ghaffari-Moghaddam, M.; Hadi-Dabanlou, R.; Khajeh, M.; Rakhshanipour, M.; Shameli, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts. <i>Korean J. Chem. Eng.</i> 2014, <i>31</i> (4), 548–557. Acharya, C.; Mishra, S.; Chaurasia, S. K.; Pandey, B. K.; Dhar, R.; Pandey, J. K. Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Biometabolites: Mechanisms and Applications. <i>Biometals</i> 2024, <i>37</i> (1), 1–25. Marslin, G.; Siram, K.; Maqbool, Q.; Selvakesavan, R. K.; Kruszka, D.; Kachlicki, P.; Franklin, G. Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. <i>Materials</i> 2018, <i>11</i> (6), 940. Jadoun, S.; Arif, R.; Jangid, N. K.; Meena, R. K. Green Synthesis of Nanoparticles Using Plant Extracts: A Review. <i>Environ. Chem. Lett.</i> 2021, <i>19</i> (1), 355–374. Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos (consultado el 25 de enero de 2025). Salem, S. S.; Fouda, A. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: An Overview. <i>Biol. Trace Elem. Res.</i> 2021, <i>199</i> (1), 344–370. Akhras, N.; Çelekli, A.; Bozkurt, H. Influence of Calcination Temperature on the Structure and Antimicrobial Properties of <i>Arthrospira platensis</i>-Mediated Zinc Oxide Nanoparticles. <i>Pharmaceutics</i> 2025, <i>17</i> (1), 11. Elshazly, E. H.; Abd elfadeel, G.; Yang, L.; Li, X.; Ewais, E. A.; Sadek, A. M.; Taha, T. M.; Fathy, O.; Atta, O. M.; Liu, W. Z. Sustainable Biosynthesis, Physiochemical Characterization, Cytotoxicity, and Antimicrobial Evaluation of Novel Chromium Oxide Nanoparticles. <i>Front. Chem.</i> 2025, <i>13</i>, 1584199. González-Fernández, S.; Lozano-Iturbe, V.; García, B.; Andrés, L. J.; Menéndez, M. F.; Rodríguez, D.; Vazquez, F.; Martín, C.; Quirós, L. M. Antibacterial Effect of Silver Nanorings. <i>BMC Microbiol.</i> 2020, <i>20</i> (1), 171. Sharma, S.; Kumar, K.; Thakur, N.; Chauhan, S.; Chauhan, M. S. The Effect of Shape and Size of ZnO Nanoparticles on Their Antimicrobial and Photocatalytic Activities: A Green Approach. <i>Bull. Mater. Sci.</i> 2020, <i>43</i> (1), 20. Naghdi, S.; Sajjadi, M.; Nasrollahzadeh, M.; Rhee, K. Y.; Sajadi, S. M.; Jaleh, B. <i>Cuscuta reflexa</i> Leaf Extract Mediated Green Synthesis of the Cu Nanoparticles on Graphene Oxide/Manganese Dioxide Nanocomposite and Its Catalytic Activity toward Reduction of Nitroarenes and
---	---

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco	Organic Dyes. <i>J. Taiwan Inst. Chem. Eng.</i> 2018, 86, 158–173. Akintelu, S. A.; Oyebamiji, A. K.; Olugbeko, S. C.; Latona, D. F. Green Chemistry Approach towards the Synthesis of Copper Nanoparticles and Its Potential Applications as Therapeutic Agents and Environmental Control. <i>Curr. Res. Green Sustainable Chem.</i> 2021, 4, 100176. Mali, S. C.; Dhaka, A.; Githala, C. K.; Trivedi, R. Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using <i>Celastrus paniculatus</i> Willd. Leaf Extract and Their Photocatalytic and Antifungal Properties. <i>Biotechnol. Rep.</i> 2020, 27, e00518. Pang, Z.; Chen, J.; Wang, T.; Gao, C.; Li, Z.; Guo, L.; Xu, J.; Cheng, Y. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. <i>Front. Plant Sci.</i> 2021, 12, 621276. Seca, A. M. L.; Pinto, D. C. G. A. Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. <i>Medicines</i> 2019, 6 (2), 66. Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Raja, S. S. S.; Vijayakumar, R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In <i>Secondary Metabolites - Sources and Applications</i>; Vijayakumar, R., Raja, S. S. S., Eds.; IntechOpen, 2018; pp 3–21. Savithramma, N.; Rao, M. L.; Suhrulatha, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. <i>Middle-East J. Sci. Res.</i> 2011, 8 (3), 579–584. Jain, C.; Khatana, S.; Vijayvergia, R. Bioactivity of Secondary Metabolites of Various Plants: A Review. <i>Int. J. Pharm. Sci. Res.</i> 2019, 10 (2), 494–504. Kamran, S.; Sinniah, A.; Abdulghani, M. A. M.; Alshawsh, M. A. Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. <i>Cancers</i> 2022, 14 (5), 1100. Barredo Hernández, C. O. Perfil fitoquímico mediante técnicas cromatográficas de extractos orgánicos de <i>Hampea rovirosae</i> Standl. Tesis de Licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México, 2023. Giovannini, P.; Howes, M. J. R. Medicinal Plants Used to Treat Snakebite in Central America: Review and Assessment of Scientific Evidence. <i>J. Ethnopharmacol.</i> 2017, 199, 240–256. Jones, R. W.; Cruz-Torres, M. F.; Duarte-Fernández, M. A. Phylogenetic Analysis of the
---	---

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco	Genus <i>Hampea</i> (Malvales: Malvaceae: Gossypieae). <i>An. Inst. Biol., Ser. Bot.</i> 1992, 63 (1), 1–11. Jones, R. W.; Cruz-Torres, M. F.; López-González, C.; Duarte-Fernández, M. A. Conservation Status of the Genus <i>Hampea</i> (Malvaceae: Gossypieae) in Mexico. <i>Bot. Sci.</i> 2018, 96 (3), 426–442. Vargas Simón, G.; Pire, R. <i>Inga jinicuil</i> Schltdl. Árbol multiuso; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco: Villahermosa, Tabasco, México, 2017. Vargas, G.; Pire, R. Correlación entre las características morfológicas del fruto y las semillas de cuijinicuil (<i>Inga jinicuil</i> Schltdl y Cham. ex. G. Don.). <i>Proc. Interam. Soc. Trop. Hortic.</i> 2014, 55, 82–84. Murjani, B. O.; Kadu, P. S.; Bansod, M.; Vaidya, S. S.; Yadav, M. D. Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Current Status, Promises, and Challenges. <i>Carbon Lett.</i> 2022, 32 (5), 1207–1226. Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. <i>Biotechnol. Adv.</i> 2009, 27 (1), 76–83. Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B. Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical and Biological Methods. <i>Res. Pharm. Sci.</i> 2014, 9 (6), 385–406. Keat, C. L.; Aziz, A.; Eid, A. M.; Elmarzughi, N. A. Biosynthesis of Nanoparticles and Silver Nanoparticles. <i>Bioresour. Bioprocess.</i> 2015, 2 (1), 47. Kulak, M.; Gulmez Samsa, C. Flavonoids Mediated Nanomaterials Synthesis, Characterization, and Their Applications. In <i>Secondary Metabolites Based Green Synthesis of Nanomaterials and Their Applications</i>; Springer Nature Singapore, 2023; pp 49–65. Sahu, N.; Soni, D.; Chandrashekhar, B.; Satpute, D. B.; Saravanadevi, S.; Sarangi, B. K.; Pandey, R. A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Flavonoids: Hesperidin, Naringin and Diosmin, and Their Antibacterial Effects and Cytotoxicity. <i>Int. Nano Lett.</i> 2016, 6 (3), 173–181. Tene, T.; Bellucci, S.; Pachacama, J. et al. A Facile and Green Approach for the Preparation of Silver Nanoparticles on Graphene Oxide with Favorable Antibacterial Activity. <i>Nanomaterials</i> 2024, 14 (17), 1455. Azizi, S.; Mohamad, R.; Shahri, M. M.; McPhee, D. J. Green Microwave-Assisted Combustion Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with <i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad: Characterization and Biomedical Applications. <i>Molecules</i> 2017, 22 (2), 301.
---	--

Universidad Juárez del Estado de Durango	Nasrollahzadeh, M.; Sajadi, S. M.; Rostami-Vartooni, A.; Hussin, S. M. Green Synthesis of CuO Nanoparticles Using Aqueous Extract of <i>Thymus vulgaris</i> L. Leaves and Their Catalytic Performance for N-Arylation of Indoles and Amines. <i>J. Colloid Interface Sci.</i> 2016, <i>466</i>, 113–119. Nasrollahzadeh, M.; Sajadi, S. M.; Maham, M. <i>Tamarix gallica</i> Leaf Extract Mediated Novel Route for Green Synthesis of CuO Nanoparticles and Their Application for N-Arylation of Nitrogen-Containing Heterocycles under Ligand-Free Conditions. <i>RSC Adv.</i> 2015, <i>5</i> (51), 40628–40635. Marslin, G.; Selvakesavan, R. K.; Franklin, G.; Sarmiento, B.; Dias, A. C. Antimicrobial Activity of Cream Incorporated with Silver Nanoparticles Biosynthesized from <i>Withania somnifera</i>. <i>Int. J. Nanomedicine</i> 2015, <i>10</i>, 5955–5963. Ahmad, N.; Sharma, S.; Alam, M. K.; Singh, V. N.; Shamsi, S. F.; Mehta, B. R.; Fatma, A. Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles Using Dried Medicinal Plant of Basil. <i>Colloids Surf., B</i> 2010, <i>81</i> (1), 81–86. Elumalai, K.; Velmurugan, S. Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activities of Zinc Oxide Nanoparticles from the Leaf Extract of <i>Azadirachta indica</i> (L.). <i>Appl. Surf. Sci.</i> 2015, <i>345</i>, 329–336. Diallo, A.; Ngom, B. D.; Park, E.; Maaza, M. Green Synthesis of ZnO Nanoparticles by <i>Aspalathus linearis</i>: Structural & Optical Properties. <i>J. Alloys Compd.</i> 2015, <i>646</i>, 428–435. Ball, V. Is the Interfacial Electrochemical Behavior of Quercetin the Same as That of Catechol Plus Resorcinol? <i>Surfaces</i> 2024, <i>7</i> (3), 653–665. Ziyatdinova, G.; Chernousova, N. Sensitive Voltammetric Sensor for Thymol and Carvacrol Based on the Electropolymerized Thymolphthalein. <i>Eng. Proc.</i> 2022, <i>31</i> (1), 60. Honda, T.; Takemura, K.; Matsumae, S. et al. Quantification of Caffeine in Coffee Cans Using Electrochemical Measurements, Machine Learning, and Boron-Doped Diamond Electrodes. <i>PLoS One</i> 2024, <i>19</i> (3), e0298331. Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. <i>J. Phys. Chem. A</i> 2004, <i>108</i> (22), 4916–4922. Dobes, J.; Zitka, O.; Sochor, J. et al. Electrochemical Tools for Determination of Phenolic Compounds in Plants: A Review. <i>Int. J. Electrochem. Sci.</i> 2013, <i>8</i> (4), 4520–4542.
---	---

Universidad Juárez del Estado de Durango	Bard, A. J.; Parsons, R.; Jordan, J. <i>Standard Potentials in Aqueous Solutions</i>; Marcel Dekker: New York, 1985. Okaiyeto, K.; Ojemaye, M. O.; Hoppe, H.; Mabinya, L. V.; Okoh, A. I. Phytofabrication of Silver/Silver Chloride Nanoparticles Using Aqueous Leaf Extract of <i>Oedera genistifolia</i>: Characterization and Antibacterial Potential. <i>Molecules</i> 2019, <i>24</i> (23), 4382. Hassan, K. T.; Ibraheem, I. J.; Hassan, O. M. et al. Facile Green Synthesis of Ag/AgCl Nanoparticles Derived from <i>Chara</i> Algae Extract and Evaluating Their Antibacterial Activity and Synergistic Effect with Antibiotics. <i>J. Environ. Chem. Eng.</i> 2021, <i>9</i> (4), 105359. Alshgari, R. A.; Ujjan, Z. A.; Shah, A. A. et al. ZnO Nanostructures Doped with Various Chloride Ion Concentrations for Efficient Photocatalytic Degradation of Methylene Blue in Alkaline and Acidic Media. <i>Molecules</i> 2022, <i>27</i> (24), 8726. Sanjini, N. S.; Winston, B.; Velmathi, S. Effect of Precursors on the Synthesis of CuO Nanoparticles under Microwave for Photocatalytic Activity towards Methylene Blue and Rhodamine B Dyes. <i>J. Nanosci. Nanotechnol.</i> 2017, <i>17</i> (1), 495–501. Banerjee, P.; Satapathy, M.; Mukhopahayay, A.; Das, P. Leaf Extract Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Widely Available Indian Plants: Synthesis, Characterization, Antimicrobial Property and Toxicity Analysis. <i>Bioresour. Bioprocess.</i> 2014, <i>1</i> (1), 3. Selvaraj, V.; Sagadevan, S.; Muthukrishnan, L.; Johan, M. R.; Podder, J. Eco-Friendly Approach in Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Optical, Surface Morphological and Antimicrobial Properties. <i>J. Nanostructure Chem.</i> 2019, <i>9</i> (2), 153–162. Khanal, L. N.; Sharma, K. R.; Paudyal, H.; Parajuli, K.; Dahal, B.; Ganga, G. C.; Pokharel, Y. R.; Kalauni, S. K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Root Extracts of <i>Rubus ellipticus</i> Sm. and Comparison of Antioxidant and Antibacterial Activity. <i>J. Nanomater.</i> 2022, <i>2022</i>, 1832587. Bala, N.; Saha, S.; Chakraborty, M.; Maiti, M.; Das, S.; Basu, R.; Nandy, P. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using <i>Hibiscus subdariffa</i> Leaf Extract: Effect of Temperature on Synthesis, Anti-Bacterial Activity and Anti-Diabetic Activity. <i>RSC Adv.</i> 2015, <i>5</i> (7), 4993–5003. Selim, Y. A.; Azb, M. A.; Ragab, I.; Abd El-Azim, M. H. M. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using
---	--

Universidade Juazeiro do Norte	Aqueous Extract of <i>Deverra tortuosa</i> and Their Cytotoxic Activities. <i>Sci. Rep.</i> 2020, <i>10</i> (1), 3445. López-González, R.; Gutiérrez, M. H.; García, R. L.; Gómez-Cornelio, S. A.; Lobato, C.; Gómez-Rivera, A.; Quintana-Owen, P.; Alvarez-Lemus, M. A. ZnO Nanomaterials with Enhanced Antimicrobial Activity Obtained by <i>Eichhornia crassipes</i> Aqueous Extract-mediated Synthesis. <i>J. Chem. Technol. Biotechnol.</i> 2024, <i>99</i> (6), 1438–1448. Sivaraj, R.; Rahman, P. K. S. M.; Rajiv, P.; Salam, H. A.; Venckatesh, R. Biogenic Copper Oxide Nanoparticles Synthesis Using <i>Tabernaemontana divaricata</i> Leaf Extract and Its Antibacterial Activity against Urinary Tract Pathogen. <i>Spectrochim. Acta, Part A</i> 2014, <i>133</i>, 178–181. Melkamu, W. W.; Feleke, E. G. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Leaf Extract of <i>Justicia schimperiana</i> and Their Antibacterial Activity. <i>Res. Sq.</i> 2022. Turakhia, B.; Divakara, M. B.; Santosh, M. S.; Shah, S. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles: A Promising Approach in the Development of Antibacterial Textiles. <i>J. Coat. Technol. Res.</i> 2020, <i>17</i> (2), 531–540. Riwayati, I.; Winardi, S.; Madhania, S.; Shimada, M.; Kusdianto. Green Synthesis of ZnO Nanoparticles Using <i>Cosmos caudatus</i>: Effects of Calcination Temperature and Precursor Type on Photocatalytic and Antimicrobial Activities. <i>Results Eng.</i> 2024, <i>24</i>, 103594. Baba, I. A.; Abdulkareem, A. S.; Oladejo, T. J. Biogenic ZnO Nanoparticles from <i>Ixora coccinea</i>: Effect of Calcination on Selected Heavy Metal Removal from Brackish Water. <i>Environ. Nanotechnol. Monit. Manage.</i> 2026, <i>25</i>, 101114. El-Beltagi, H. S.; Ragab, M.; Osman, A.; El-Masry, R. A.; Alwutayd, K. M.; Althagafi, H.; Alqahtani, L. S.; Alazragi, R. S.; Alhajri, A. S.; El-Saber, M. M. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles via Neem Extract and Their Anticancer and Antibacterial Activities. <i>PeerJ</i> 2024, <i>12</i>, e17588. Khan, J.; Naseem, I.; Bibi, S.; Ahmad, S.; Altaf, F.; Hafeez, M.; Almoneef, M. M.; Ahmad, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) Using <i>Debregeasia salicifolia</i> for Biological Applications. <i>Materials</i> 2023, <i>16</i> (1), 129. Siakavella, I. K.; Lamari, F.; Papoulis, D.; Orkoula, M.; Gkolfi, P.; Lykouras, M.; Avgoustakis, K.; Hatziantoniou, S. Effect of Plant Extracts on the Characteristics of Silver
---------------------------------------	--

Universidad Juárez del Estado de Durango	Nanoparticles for Topical Application. <i>Pharmaceutics</i> 2020, <i>12</i> (12), 1244. Abdollahzadeh, H.; Pazhang, Y.; Zamani, A.; Sharafi, Y. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Walnut Shell and Their Size Dependent Anticancer Effects on Breast and Colorectal Cancer Cell Lines. <i>Sci. Rep.</i> 2024, <i>14</i> (1), 20323. Geremew, A.; Palmer, L.; Johnson, A.; Reeves, S.; Brooks, N.; Carson, L. Multi-Functional Copper Oxide Nanoparticles Synthesized Using <i>Lagerstroemia indica</i> Leaf Extracts and Their Applications. <i>Heliyon</i> 2024, <i>10</i> (9), e30178. Saikumari, N.; Dev, S. M.; Dev, S. A. Effect of Calcination Temperature on the Properties and Applications of Bio Extract Mediated Titania Nano Particles. <i>Sci. Rep.</i> 2021, <i>11</i> (1), 1734. Fakhredin, M.; Shariatmadar Tehrani, F.; Aliannezhadi, M. pH and Temperature Influences on Eco-Friendly Synthesized Copper Oxide Nanoparticles Using Clove Extract for Brain Cancer Treatment. <i>Results Phys.</i> 2026, <i>80</i>, 108541. Prayitno, B.; Musyarofah; Tajalla, G. U. N.; Nafisah, A. R.; Norhidayah, S.; Kartika, S. A. The Effect of Calcination Temperature and Holding Time on Structural Properties of Calcia Powders Derived from Eggshell Waste. <i>Indones. Phys. Rev.</i> 2025, <i>8</i> (1), 281–299. Lee, S. H.; Jun, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2019, <i>20</i> (4), 865. Wan Mat Khalir, W. K. A.; Shameli, K.; Jazayeri, S. D.; Othman, N. A.; Che Jusoh, N. W.; Hassan, N. M. Biosynthesized Silver Nanoparticles by Aqueous Stem Extract of <i>Entada spiralis</i> and Screening of Their Biomedical Activity. <i>Front. Chem.</i> 2020, <i>8</i>, 620. Mudhafar, M.; Zainol, I.; A.J., A.; Abd, M. Y.; Alsailawi, H. A.; Ghazaly, N. M.; Hussein, R. M.; Zorah, M. The Effect of Fish Collagen on the Silver Nanoparticles Sizes and Shapes Using Modified Microwave-Assisted Green Synthesis Method and Their Antibacterial Activities. <i>Heliyon</i> 2024, <i>10</i> (12), e32837. González, A. L.; Noguez, C. Influence of Morphology on the Optical Properties of Metal Nanoparticles. <i>J. Comput. Theor. Nanosci.</i> 2006, <i>3</i> (5), 603–617. Álvarez Macías, C. Estudio de las propiedades optoelectrónicas y de la fotodegradación de películas delgadas de silicio polimorfo. Tesis de Licenciatura,
---	--

Universidad Juárez del Estado de Durango	Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, 2013. Bin Ali, M.; Iftikhar, T.; Majeed, H. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles for the Industrial Biofortification of (<i>Pleurotus pulmonarius</i>) Mushrooms. <i>Heliyon</i> 2024, <i>10</i> (19), e37927. Aroob, S.; Carabineiro, S. A. C.; Taj, M. B. et al. Green Synthesis and Photocatalytic Dye Degradation Activity of CuO Nanoparticles. <i>Catalysts</i> 2023, <i>13</i> (3), 502. Mageshwari, K.; Sathyamoorthy, R. Organic Free Synthesis of Flower-like Hierarchical CuO Microspheres by Reflux Condensation Approach. <i>Appl. Nanosci.</i> 2013, <i>3</i> (2), 161–166. Kolahalam, L. A.; Prasad, K. R. S.; Krishna, P. M.; Supraja, N.; Shanmugan, S. The Exploration of Bio-Inspired Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and in-Vitro Biological Investigations. <i>Heliyon</i> 2022, <i>8</i> (6), e09726. Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. <i>Photosynth. Res.</i> 2009, <i>101</i> (2–3), 157–170. Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins. <i>Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.</i> 2007, <i>1767</i> (9), 1073–1101. Griffiths, P. R. Fourier Transform Infrared Spectrometry. <i>Science</i> 1983, <i>222</i> (4621), 297–302. PAM-XIAMEN. ¿Cuál es la prueba de espectroscopía infrarroja de transformación de Fourier (FTIR)? https://www.powerwaywafer.com/es/ftir.html (consultado el 11 de agosto de 2025). Taha, M.; Hassan, M.; Essa, S.; Tartor, Y. Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Spectroscopy for Rapid and Accurate Identification of Yeasts Isolated from Human and Animals. <i>Int. J. Vet. Sci. Med.</i> 2013, <i>1</i> (1), 15–20. Titus, D.; Samuel, E. J. J.; Roopan, S. M. Nanoparticle Characterization Techniques. In <i>Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles</i>; Elsevier, 2018; pp 303–319. Cullity, B. D.; Stock, S. R. <i>Elements of X-Ray Diffraction</i>, 3rd ed.; Pearson Education Limited: Harlow, U.K., 2014. Giannini, C.; Ladisa, M.; Altamura, D.; Siliqi, D.; Sibillano, T.; De Caro, L. X-Ray Diffraction: A Powerful Technique for the Multiple-Length-Scale Structural Analysis of Nanomaterials. <i>Crystals</i> 2016, <i>6</i> (8), 87. Askeland, D. R.; Wright, W. J. <i>Ciencia e ingeniería de materiales</i>, 7ª ed.; Cengage Learning: Ciudad de México, 2017
---	--

Universidad Juárez del Estado de Durango	Kabekkodu, S. N.; Dosen, A.; Blanton, T. N. PDF-5+: A Comprehensive Powder Diffraction File for Materials Characterization. <i>Powder Diffr.</i> 2024, 39 (2), 73–78. Patterson, A. L. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. <i>Phys. Rev.</i> 1939, 56 (10), 978–982. Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. <i>Biophys. Rev.</i> 2016, 8 (4), 409–427. Berne, B. J.; Pecora, R. <i>Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics</i>; Dover Publications: Mineola, NY, 2000. Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. <i>J. Chem. Phys.</i> 1972, 57 (11), 4814–4820. Farkas, N.; Kramar, J. A. Dynamic Light Scattering Distributions by Any Means. <i>J. Nanopart. Res.</i> 2021, 23 (5), 120. Maguire, C. M.; Rösslein, M.; Wick, P.; Prina-Mello, A. Characterisation of Particles in Solution – A Perspective on Light Scattering and Comparative Technologies. <i>Sci. Technol. Adv. Mater.</i> 2018, 19 (1), 732–745. Malm, A. V.; Corbett, J. C. W. Improved Dynamic Light Scattering Using an Adaptive and Statistically Driven Time Resolved Treatment of Correlation Data. <i>Sci. Rep.</i> 2019, 9 (1), 13587. Xu, R. Progress in Nanoparticles Characterization: Sizing and Zeta Potential Measurement. <i>Particuology</i> 2008, 6 (2), 112–115. Malvern Instruments Ltd. <i>Zetasizer Nano User Manual</i>, MAN0485, Issue 1.1; Worcestershire, U.K., 2013. Delgado, A. V.; Gonzalez-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena. <i>J. Colloid Interface Sci.</i> 2007, 309 (2), 194–224. Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W. M.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C. Scanning Electron Microscope (SEM) Instrumentation. In <i>Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis</i>; Springer: New York, 2018; pp 65–91. Joshi, M.; Bhattacharyya, A.; Ali, S. W. Characterization Techniques for Nanotechnology Applications in Textiles. <i>Indian J. Fibre Text. Res.</i> 2008, 33 (3), 304–317. Havrdova, M.; Polakova, K.; Skopalik, J.; Vujtek, M.; Mokdad, A.; Homolkova, M.; Tucek, J.; Nebesarova, J.; Zboril, R. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) as an Approach for Nanoparticle Detection inside Cells. <i>Micron</i> 2014, 67, 149–154.
---	---

Universidad Juárez del Estado de Durango	Fernández Martínez, P. Partes del microscopio electrónico. https://www.microscopioelectronico.top/partes-del-microscopio-electronico/ (consultado el 9 de agosto de 2025). Inkson, B. J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In <i>Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods</i>; Hübschen, G., Irisarri, I. K., Ed.; Woodhead Publishing, 2016; pp 17–43. Brodusch, N.; Demers, H.; Gauvin, R. Electron Diffraction Techniques in the SEM. In <i>SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology</i>; Springer: Singapore, 2018; pp 85–105. Brito, J. L. Análisis superficial de muestras sólidas: Análisis químico cualitativo y cuantitativo mediante XPS. https://www.slideserve.com/erma/ (consultado el 9 de agosto de 2025). Korin, E.; Froumin, N.; Cohen, S. Surface Analysis of Nanocomplexes by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). <i>ACS Biomater. Sci. Eng.</i> 2017, 3 (6), 882–889 Baer, D. R.; Engelhard, M. H. XPS Analysis of Nanostructured Materials and Biological Surfaces. <i>J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.</i> 2010, 178–179, 415–432. Bhardwaj, N.; Puri, S.; Kumari, A.; Chauhan, A.; Kumar, A. Investigation on Antioxidant, Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Neuropsychiatry Potential of Phyto-Mediated ZnONPs Using <i>Colebrookea oppositifolia</i>. <i>J. Drug Deliv. Sci. Technol.</i> 2024, 97, 105748. Yusuf-Omoloye, N. A.; Adeyemi, F. M.; Sule, W. F.; Azeez, L.; Oyedara, O. O.; Wahab, A. A.; Ajigbewu, O. H.; Lateef, A. Green-Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of <i>Azanza garckeana</i> Seed Extract Silver Nanoparticles against Vancomycin-Resistant Enterococci. <i>Next Nanotechnol.</i> 2024, 6, 100035. Irfan, M.; Munir, H.; Ismail, H. <i>Moringa oleifera</i> Gum Based Silver and Zinc Oxide Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization and Their Antibacterial Potential against MRSA. <i>Biomater. Res.</i> 2021, 25 (1), 17. Khairy, T.; Amin, D. H.; Salama, H. M. et al. Antibacterial Activity of Green Synthesized Copper Oxide Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. <i>Sci. Rep.</i> 2024, 14 (1), 24147. Salam, M. A.; Al-Amin, M. Y.; Pawar, J. S.; Akhter, N.; Lucy, I. B. Conventional Methods and Future Trends in Antimicrobial Susceptibility Testing. <i>Saudi J. Biol. Sci.</i> 2023, 30 (3), 103582.
---	---

Universidad Juárez del Estado de Durango	Perez-Gavilan, A.; de Castro, J. V.; Arana, A. et al. Antibacterial Activity Testing Methods for Hydrophobic Patterned Surfaces. <i>Sci. Rep.</i> 2021, <i>11</i> (1), 6610. Ngamsurachab, P.; Praipipat, P. Antibacterial Activities against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> of Extracted <i>Piper betle</i> Leaf Materials by Disc Diffusion Assay and Batch Experiments. <i>RSC Adv.</i> 2022, <i>12</i> (41), 26435–26447. Bovo, F.; Lazzarotto, T.; Ambretti, S.; Gaibani, P. Comparison of Broth Microdilution, Disk Diffusion and Strip Test Methods for Cefiderocol Antimicrobial Susceptibility Testing on KPC-Producing <i>Klebsiella pneumoniae</i>. <i>Antibiotics</i> 2023, <i>12</i> (3), 614. Vergalli, J.; Réfrégiers, M.; Ruggerone, P.; Winterhalter, M.; Pagès, J. M. Advances in Methods and Concepts Provide New Insight into Antibiotic Fluxes across the Bacterial Membrane. <i>Commun. Biol.</i> 2024, <i>7</i> (1), 1335. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. <i>Nat. Protoc.</i> 2008, <i>3</i> (2), 163–175. Petiti, J.; Revel, L.; Divieto, C. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. <i>Biosensors</i> 2024, <i>14</i> (4), 156. Lacuna, A. R. G.; Dato, M. C.; Loterio, L. M. M.; Dayrit, G. B.; Villanueva, S. Y. A. M.; Lota, M. M. M. In-Vitro Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Contact Time of Povidone-Iodine against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Klebsiella aerogenes</i> Using Micro Suspension Test, Colorimetric Resazurin Microplate Assay, and Dey Engley Neutralizer Assay. <i>Acta Med. Philipp.</i> 2025, <i>59</i> (4), 113. Hoelzer, K.; Cummings, K. J.; Warnick, L. D.; Schukken, Y. H.; Siler, J. D.; Gröhn, Y. T.; Davis, M. A.; Besser, T. E.; Wiedmann, M. Agar Disk Diffusion and Automated Microbroth Dilution Produce Similar Antimicrobial Susceptibility Testing Results for <i>Salmonella</i> Serotypes Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i-, but Differ in Economic Cost. <i>Foodborne Pathog. Dis.</i> 2011, <i>8</i> (12), 1281–1288. Soria-Castro, M.; De la Rosa-García, S. C.; Quintana, P.; Gómez-Cornelio, S.; Sierra-Fernandez, A.; Gómez-Ortiz, N. Broad Spectrum Antimicrobial Activity of $\text{Ca}(\text{Zn}(\text{OH})_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and ZnO Nanoparticles Synthesized by the Sol–Gel Method. <i>J. Sol-Gel Sci. Technol.</i> 2019, <i>89</i> (1), 284–294.
---	---

Universidad Juárez del Estado de Durango	Wisniewski, S. J.; Brannan, G. D. Correlation (Coefficient, Partial, and Spearman Rank) and Regression Analysis. In <i>StatPearls</i>; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, 2024. Razanamahandry, L. C.; Bashir, A. K. H.; Kaviyarasu, K.; Mekuto, L.; Ntwampe, S. K. O.; Maaza, M. Modelling Nanoparticles Parameters for Antimicrobial Activity. <i>MRS Advances</i> 2023, 8, 281–287. Hajian, M. H.; Ghorbanpour, M.; Abtahi, F.; Hadian, J. Differential Effects of Biogenic and Chemically Synthesized Silver-Nanoparticles Application on Physiological Traits, Antioxidative Status and Californidine Content in California Poppy (<i>Eschscholzia californica</i> Cham). <i>Environ. Pollut.</i> 2022, 292, 118300. Ershov, V. A.; Ershov, B. G. Effect of Silver Nanoparticle Size on Antibacterial Activity. <i>Toxics</i> 2024, 12 (11), 801. https://doi.org/10.3390/TOXICS12110801/S1. Schober, P.; Schwarte, L. A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. <i>Anesth. Analg.</i> 2018, 126 (5), 1763–1768. Alós, J. I. Resistencia a los antibióticos: una crisis global. <i>Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.</i> 2015, 33 (10), 692–699. iSanidad. Estudio global: La resistencia antimicrobiana ya mata más que el sida, con 1,27 millones de muertes directas en 2019. https://isanidad.com/205961/ (consultado el 6 de agosto de 2025). OMS. Antimicrobial Resistance Expected to Cause 5.2 Million Deaths in the Western Pacific by 2030. https://www.who.int/westernpacific/news/item/13-06-2023-antimicrobial-resistance-expected-to-cause-5.2-million-deaths-in-the-western-pacific-by-2030 (consultado el 6 de agosto de 2025). Latif, M. S.; Abbas, S.; Kormin, F.; Mustafa, M. K. Green Synthesis of Plant-Mediated Metal Nanoparticles: The Role of Polyphenols. <i>Asian J. Pharm. Clin. Res.</i> 2019, 12 (7), 75–84. Alhalili, Z. Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles CuO NPs from <i>Eucalyptus globulus</i> Leaf Extract: Adsorption and Design of Experiments. <i>Arab. J. Chem.</i> 2022, 15 (5), 103739. Ahmed, S.; Saifullah; Ahmad, M.; Swami, B. L.; Ikram, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using <i>Azadirachta indica</i> Aqueous Leaf Extract. <i>J. Radiat. Res. Appl. Sci.</i> 2016, 9 (1), 1–7. Tănase, M. A.; Marinescu, M.; Oancea, P. et al. Antibacterial and Photocatalytic Properties of ZnO
---	--

	Nanoparticles Obtained from Chemical versus <i>Saponaria officinalis</i> Extract-Mediated Synthesis. <i>Molecules</i> 2021, 26 (7), 2072. Phiwdang, K.; Suphankij, S.; Mekprasart, W.; Pecharapa, W. Synthesis of CuO Nanoparticles by Precipitation Method Using Different Precursors. <i>Energy Procedia</i> 2013, 34, 740–745. Bouchabou, M.; Rives López, J. M.; Román Martínez, M. C.; Lillo-Ródenas, M. A. Evaluating H₂ Production by Ultraviolet-Induced Water Splitting over (Cu or Ni)–TiO₂ Nanoparticle Photocatalysts. <i>ACS Appl. Nano Mater.</i> 2025, 8 (9), 8646–8662. Muñoz-Bernal, Ó. A.; Torres-Aguirre, G. A.; Núñez-Gastélum, J. A. et al. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. <i>TIP Rev. Esp. Cienc. Quim.-Biol.</i> 2017, 20 (2), 23–28. Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of Flavonoids in <i>Portulaca oleracea</i> L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. <i>Food Anal. Methods</i> 2010, 3 (2), 90–97. Cury, G. C. Revisión experimental del intervalo de pH para la determinación de cloruros por el método de Mohr. Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2006. Raj, S.; Mali, S. C.; Trivedi, R. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using <i>Enicostemma axillare</i> (Lam.) Leaf Extract. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 2018, 503 (4), 2814–2819. Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S. A.; Boritz, C.; Mulfinger, L. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. <i>J. Chem. Educ.</i> 2007, 84 (2), 322–325. Baruah, S.; Dutta, J. Hydrothermal Growth of ZnO Nanostructures. <i>Sci. Technol. Adv. Mater.</i> 2009, 10 (1), 013001. Mali, S. C.; Raj, S.; Trivedi, R. Biosynthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using <i>Enicostemma axillare</i> (Lam.) Leaf Extract. <i>Biochem. Biophys. Rep.</i> 2019, 20, 100699. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). <i>Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline</i>, M26-A; Wayne, PA, 1999.
--	--

Universidad Juárez del Estado de Durango	Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 1966, 45 (4), 493–496. Mutukwa, D.; Taziwa, R.; Khotseng, L. E. A Review of the Green Synthesis of ZnO Nanoparticles Utilising Southern African Indigenous Medicinal Plants. <i>Nanomaterials</i> 2022, 12 (19), 3456. Swain, M.; Mishra, D.; Sahoo, G. A Review on Green Synthesis of ZnO Nanoparticles. <i>Discover Appl. Sci.</i> 2025, 7 (1), 997. Siddiqui, H.; Qureshi, M. S.; Haque, F. Z. pH-Dependent Single-Step Rapid Synthesis of CuO Nanoparticles and Their Optical Behavior. <i>Opt. Spectrosc.</i> 2017, 123 (6), 903–912. Nemčková, K.; Svitková, V.; Sochr, J.; Gemeiner, P.; Labuda, J. Gallic Acid-Coated Silver Nanoparticles as Perspective Drug Nanocarriers: Bioanalytical Study. <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 2022, 414 (18), 5493–5505. Alzharani, S.; Astudillo-Calderón, S.; Pintos, B.; Pérez-Urria, E.; Manzanera, J. A.; Martín, L.; Gomez-Garay, A. Role of Synthetic Plant Extracts on the Production of Silver-Derived Nanoparticles. <i>Plants</i> 2021, 10 (8), 1671. Rodríguez-Félix, F.; Graciano-Verdugo, A. Z.; Moreno-Vásquez, M. J. et al. Trends in Sustainable Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Agri-Food Waste Extracts and Their Applications in Health. <i>J. Nanomater.</i> 2022, 2022, 8874003. Wang, Z.; Yang, H. C.; He, F.; Peng, S.; Li, Y.; Shao, L.; Darling, S. B. Mussel-Inspired Surface Engineering for Water-Remediation Materials. <i>Matter</i> 2019, 1 (1), 115–155. Yang, J.; Cui, J.; Zhang, H.; Zhang, H.; Zhu, J. Kinetic and Thermodynamic Study of Ag⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ Ion Adsorption on LTA for High-Performance Antibacterial Coating. <i>Coatings</i> 2024, 14 (12), 1524. Mobarak, M. B.; Sikder, M. F.; Muntaha, K. S. et al. Plant Extract-Mediated Green-Synthesized CuO Nanoparticles for Environmental and Microbial Remediation: A Review Covering Basic Understandings to Mechanistic Study. <i>Nanoscale Adv.</i> 2025, 7 (9), 2418–2445. Ahmed, S.; Annu; Chaudhry, S. A.; Ikram, S. A Review on Biogenic Synthesis of ZnO Nanoparticles Using Plant Extracts and Microbes: A Prospect towards Green Chemistry. <i>J. Photochem. Photobiol., B</i> 2017, 166, 272–284. Jaison, J. P.; Balasubramanian, B.; Gangwar, J. et al. Green Synthesis of Bioinspired Nanoparticles Mediated from
---	---

Universidad Juárez del Estado de Durango	Plant Extracts of Asteraceae Family for Potential Biological Applications. <i>Antibiotics</i> 2023, <i>12</i> (3), 543. Roucoux, A.; Schulz, J.; Patin, H. Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts? <i>Chem. Rev.</i> 2002, <i>102</i> (10), 3757–3778. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J. M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2009, <i>57</i> (5), 1768–1774. Pacioni, N. L.; Pardoe, A.; McGilvray, K. L.; Chrétien, M. N.; Scaiano, J. C. Synthesis of Copper Nanoparticles Mediated by Photogenerated Free Radicals: Catalytic Role of Chloride Anions. <i>Photochem. Photobiol. Sci.</i> 2010, <i>9</i> (6), 766–774. Zhang, N.; Tang, J.; Ma, Y.; Liang, M.; Zeng, D.; Hefter, G. A Spectroscopic Study of Solvent Effects on the Formation of Cu(II)–Chloride Complexes in Aqueous Solution. <i>Phys. Chem. Chem. Phys.</i> 2021, <i>23</i> (11), 6807–6814. Zhao, X.; Zhang, J.; Wang, B.; Zada, A.; Humayun, M. Biochemical Synthesis of Ag/AgCl Nanoparticles for Visible-Light-Driven Photocatalytic Removal of Colored Dyes. <i>Materials</i> 2015, <i>8</i> (5), 2043–2053. Zhou, Y.; Chen, R.; He, T. et al. Biomedical Potential of Ultrafine Ag/AgCl Nanoparticles Coated on Graphene with Special Reference to Antimicrobial Performances and Burn Wound Healing. <i>ACS Appl. Mater. Interfaces</i> 2016, <i>8</i> (24), 15067–15075. Dudina, D. V.; Mukherjee, A. K. Reactive Spark Plasma Sintering: Successes and Challenges of Nanomaterial Synthesis. <i>J. Nanomater.</i> 2013, <i>2013</i>, 625218. Kayani, Z. N.; Saleemi, F.; Batool, I. Effect of Calcination Temperature on the Properties of ZnO Nanoparticles. <i>Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.</i> 2015, <i>119</i> (2), 713–720. Vasiljević, Z.; Dojčinović, M. P.; Vujančević, J. D. et al. Exploring the Impact of Calcination Parameters on the Crystal Structure, Morphology, and Optical Properties of Electrospun Fe₂TiO₅ Nanofibers. <i>RSC Adv.</i> 2021, <i>11</i> (51), 32358–32368. Chan, Y. B.; Selvanathan, V.; Tey, L. H. et al. Effect of Calcination Temperature on Structural, Morphological and Optical Properties of Copper Oxide Nanostructures Derived from <i>Garcinia mangostana</i> L. Leaf Extract. <i>Nanomaterials</i> 2022, <i>12</i> (20), 3589.
---	--

Universidad Juárez del Estado de Durango	Verma, R.; Chauhan, A.; Neha; Batoo, K. M.; Kumar, R.; Hadhi, M.; Raslan, E. H. Effect of Calcination Temperature on Structural and Morphological Properties of Bismuth Ferrite Nanoparticles. <i>Ceram. Int.</i> 2021, <i>47</i> (3), 3680–3691. Saikumari, N.; Dev, S. M.; Dev, S. A. Effect of Calcination Temperature on the Properties and Applications of Bio Extract Mediated Titania Nano Particles. <i>Sci. Rep.</i> 2021, <i>11</i> (1), 1642. Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? <i>J. Controlled Release</i> 2016, <i>235</i>, 337–351. Németh, Z.; Csóka, I.; Semnani Jazani, R.; Sipos, B.; Haspel, H.; Kozma, G.; Kónya, Z.; Dobó, D. G. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. <i>Pharmaceutics</i> 2022, <i>14</i> (9), 1798. Thammawithan, S.; Talodthaisong, C.; Srichaiyapol, O.; Patramanon, R.; Hutchison, J. A.; Kulchat, S. Andrographolide Stabilized-Silver Nanoparticles Overcome Ceftazidime-Resistant <i>Burkholderia pseudomallei</i>: Study of Antimicrobial Activity and Mode of Action. <i>Sci. Rep.</i> 2022, <i>12</i> (1), 10565. Khina, A. G.; Krutyakov, Y. A. Similarities and Differences in the Mechanism of Antibacterial Action of Silver Ions and Nanoparticles. <i>Appl. Biochem. Microbiol.</i> 2021, <i>57</i> (6), 683–693. Hamad, A.; Khashan, K. S.; Hadi, A. Silver Nanoparticles and Silver Ions as Potential Antibacterial Agents. <i>J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.</i> 2020, <i>30</i> (12), 4811–4828. Yin, I. X.; Zhang, J.; Zhao, I. S.; Mei, M. L.; Li, Q.; Chu, C. H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. <i>Int. J. Nanomedicine</i> 2020, <i>15</i>, 2555–2562. Le Ouay, B.; Stellacci, F. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: A Surface Science Insight. <i>Nano Today</i> 2015, <i>10</i> (3), 339–354. Xiu, Z. M.; Zhang, Q. B.; Puppala, H. L.; Colvin, V. L.; Alvarez, P. J. J. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. <i>Nano Lett.</i> 2012, <i>12</i> (8), 4271–4275. Govindasamy, G. A.; Mydin, R. B. S. M. N.; Sreekantan, S.; Harun, N. H. Effect of Calcination Temperature on Physicochemical and Antimicrobial Properties of Green Synthesised ZnO/C/Ca Nanocomposites Using <i>Calotropis gigantea</i> Leaves. <i>Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.</i> 2021, <i>12</i> (1), 015013.
---	---

Universidad Juárez del Estado de Durango	Vitasovic, T.; Caniglia, G.; Eghtesadi, N. et al. Antibacterial Action of Zn²⁺ Ions Driven by the In Vivo Formed ZnO Nanoparticles. <i>ACS Appl. Mater. Interfaces</i> 2024, <i>16</i> (24), 30847–30859. Raghupathi, K. R.; Koodali, R. T.; Manna, A. C. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. <i>Langmuir</i> 2011, <i>27</i> (7), 4020–4028. Vincent, M.; Duval, R. E.; Hartemann, P.; Engels-Deutsch, M. Contact Killing and Antimicrobial Properties of Copper. <i>J. Appl. Microbiol.</i> 2018, <i>124</i> (5), 1032–1046. Flores-Rábago, K. M.; Rivera-Mendoza, D.; Vilchis-Nestor, A. R. et al. Antibacterial Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles (CuONPs) Using <i>Ganoderma sessile</i>. <i>Antibiotics</i> 2023, <i>12</i> (8), 1251. Gudkov, S. V.; Burmistrov, D. E.; Fomina, P. A.; Validov, S. Z.; Kozlov, V. A. Antibacterial Properties of Copper Oxide Nanoparticles (Review). <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2024, <i>25</i> (21), 11563. Krychowiak-Maśnicka, M.; Wojciechowska, W. P.; Bogaj, K. et al. The Substantial Role of Cell and Nanoparticle Surface Properties in the Antibacterial Potential of Spherical Silver Nanoparticles. <i>Nanotechnol. Sci. Appl.</i> 2024, <i>17</i>, 227–241. Pourali, P.; Baserisalehi, M.; Afsharnezhad, S. et al. The Effect of Temperature on Antibacterial Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles. <i>Biometals</i> 2013, <i>26</i> (1), 189–196. Sadoq, B. E.; Britel, M. R.; Bouajaj, A. et al. A Review on Antibacterial Activity of Nanoparticles. <i>Biointerface Res. Appl. Chem.</i> 2023, <i>13</i> (5), 405. Zhang, H.; Mi, Z.; Wang, J.; Zhang, J. d-Histidine Combated Biofilm Formation and Enhanced the Effect of Amikacin against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Vitro. <i>Arch. Microbiol.</i> 2024, <i>206</i> (4), 118. Yi, L.; Cao, M.; Chen, X. et al. In Vitro Antimicrobial Synergistic Activity and the Mechanism of the Combination of Naringenin and Amikacin Against Antibiotic-Resistant <i>Escherichia coli</i>. <i>Microorganisms</i> 2024, <i>12</i> (9), 1871. Godoy-Gallardo, M.; Eckhard, U.; Delgado, L. M. et al. Antibacterial Approaches in Tissue Engineering Using Metal Ions and Nanoparticles: From Mechanisms to Applications. <i>Bioact. Mater.</i> 2021, <i>6</i> (12), 4470–4490. Chandra, H.; Kumari, P.; Bontempi, E.; Yadav, S. Medicinal Plants: Treasure Trove for Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Biomedical
---	---

	Applications. <i>Biocatal. Agric. Biotechnol.</i> 2020, 24, 101518. Amini, S. M. Preparation of Antimicrobial Metallic Nanoparticles with Bioactive Compounds. <i>Mater. Sci. Eng., C</i> 2019, 103, 109809. El-Seedi, H. R.; El-Shabasy, R. M.; Khalifa, S. A. M. et al. Metal Nanoparticles Fabricated by Green Chemistry Using Natural Extracts: Biosynthesis, Mechanisms, and Applications. <i>RSC Adv.</i> 2019, 9 (42), 24539–24559. (195) Iwuozor, K. O.; Emenike, E. C. Green Synthesis of Copper Nanoparticles and Investigation of Its Antimicrobial Properties. <i>Alanya J. Chem. Biol.</i> 2022, 6 (1), 93–105.
--	--

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.