



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS (ICAP)
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

“Síntesis de nanopartículas de plata con *Thuja orientalis* para la elaboración de películas de gelatina con efecto antimicrobiano”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

XOCHITL ALEJANDRA PÉREZ MARROQUÍN

DIRECTOR:

DR. GABRIEL AGUIRRE ÁLVAREZ

CO-DIRECTORA:

ARELY LEÓN LÓPEZ

ASESORES:

DR. RAFAEL GERMÁN CAMPOS MONTIEL

DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

Tulancingo de Bravo Hidalgo, Agosto de 2020.





COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAp

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Síntesis de nanopartículas de plata con *Thuja orientalis* para la elaboración de películas de gelatina con efecto antimicrobiano", que desarrolla la estudiante Xochitl Alejandra Pérez Marroquín.

Asistentes:

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Mtra. Arely León López

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Xochitl Alejandra Pérez Marroquín, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 03 de agosto de 2020.

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Mtra. Arely León López

Dr. Rafael German Campos Montiel

Dr. Rubén Jiménez Alvarado



DEDICATORIA

A mi madre y hermano:

Para ustedes que siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo constante. Valoro cada gesto de esfuerzo que, con infinito amor realizaron para que pudiera continuar con mi superación.

Mi admiración, respeto y eterno agradecimiento.

“No importa cuán estrecho sea el portal, cuán cargada de castigos la sentencia, soy el amo de mi destino: soy el capitán de mi alma”

William Ernest Henley

AGRADECIMIENTOS

Al universo por conspirar a mi favor.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Gabriel Aguirre Álvarez por el conocimiento compartido, su tiempo y su invaluable paciencia para que este proyecto finalizara. Así mismo, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de este proyecto.

A las personas que coincidieron en mi camino: Gracias por su amistad, el aprecio, su sabiduría y los momentos compartidos. Vayan siempre en dirección de la verdad y sus anhelos, sean constantes y firmes en sus decisiones, porque cuando nada está escrito todo es posible.

ÍNDICE

Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MARCO TEÓRICO	2
2.1	Antecedentes de materiales antimicrobianos	2
2.2	Antimicrobianos naturales	3
2.2.1	Aceites esenciales (AE)	4
2.3	Antimicrobianos sintéticos	4
2.4	Películas	5
2.5	Materiales utilizados comúnmente para la elaboración de películas	6
2.5.1	Polisacáridos	6
2.5.2	Proteínas	7
2.5.3	Lípidos	7
2.5.4	Aplicaciones	8
2.6	Gelatina	8
2.7	Extracción de gelatina.....	9
2.7.1	Estructura de la gelatina	10
2.7.2	Formación de películas.....	11
2.8	Nanotecnología	12
2.8.1	Aplicaciones	13
2.8.2	Nanopartículas	14
2.9	La plata como material antimicrobiano	15
2.10	Mecanismo de la toxicidad de las nanopartículas de plata en bacterias.....	17

2.11	Materiales utilizados en la síntesis de nanopartículas	23
2.12	Inorgánicas	23
2.13	Orgánicas.....	24
2.14	Síntesis verde.....	24
2.14.1	<i>Thuja Orientalis</i>	26
3	JUSTIFICACIÓN.....	28
4	OBJETIVOS.....	29
4.1	Objetivo general.....	29
4.2	Objetivos específicos	29
5	HIPÓTESIS	30
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1	Recolección de la planta	31
6.1.1	Obtención del extracto.....	31
6.1.2	Síntesis de Nanopartículas de plata (AgNPs).....	31
6.1.3	Espectroscopía UV-Vis	31
6.1.4	Absorción Atómica.....	32
6.1.5	Espectroscopia FTIR	32
6.1.6	Tamaño de partícula y Potencial zeta.....	32
6.2	Caracterización de las películas.....	33
6.2.1	Elaboración de películas a base de gelatina con nanopartículas de plata (AgNPs).....	33
6.2.2	Acondicionamiento de las películas	34
6.2.3	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	34
6.2.4	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	35

6.2.5	Actividad antibacteriana.....	35
6.2.6	Color.....	36
6.2.7	Análisis Estadístico	36
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1	Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas	37
7.1.1	Espectroscopia UV-Vis	37
7.1.2	Espectroscopia de Absorción Atómica.....	39
7.1.3	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	41
7.1.4	Tamaño de partícula por Dispersión de Luz Dinamica (DLS).....	44
7.1.5	Potencial zeta por Dispersión de Luz Electroforética	46
7.2	Desempeño de las películas de gelatina adicionadas con AgNPs	48
7.2.1	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en películas.....	48
7.2.2	Espectroscopia por Transformada de Fourier (FT-IR).....	50
7.2.3	Actividad antimicrobiana en películas	52
7.2.4	Color de las películas.....	54
8	CONCLUSIONES.....	56
9	BIBLIOGRAFÍA	57
10	ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Formulaciones de las películas	33
Tabla 2 Temperatura de transición vítrea y Temperatura de fusión de las películas de gelatina.	49
Tabla 3. Determinación de color en las películas en la escala CieLab. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). ANOVA de una sola vía, comparación de medias por Tukey.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las aplicaciones de la Nanotecnología en la Ciencia de los Alimentos (Bajpai et al., 2018).	13
Figura 2. Mecanismo propuesto para la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata. 1: atracción electrostática, 2: producción de radicales libres, cambios de permeabilidad, alteración de la respiración, pérdida de contenido intracelular, 3: modulación de los perfiles de fosfotirosina de las proteínas, que participan en la progresión del ciclo celular en la síntesis de polisacáridos capsulares, 4: interacción con grupos tiol: inhibición de síntesis y función de proteínas, 5: interacción con moléculas que contienen fósforo (ADN) (Pereira de Abreu et al., 2012).	18
Figura 3. Representación esquemática de AgNPs, Ag^{+1} e interacciones celulares (Xiu et al., 2012).	19
Figura 4. Representación esquemática del mecanismo conocido de la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata y la plata iónica liberada. Los círculos grises indican NPs de plata y Ag^{+} implican la plata iónica liberada de las NPs (Reidy et al., 2013).	20
Figura 5. Representación del procedimiento de silanización, seguido de la inmovilización de AgNPs en la superficie de vidrio funcionalizada con amina. (A) Se generaron sitios adicionales de silanil (Si-OH) mediante tratamiento con ácido sulfocrómico y se estabilizaron a 120°C por 1.5 h bajo atmosfera de Argón. (B) Los sustratos se trataron con soluciones de 3-2-aminoetilaminopropil trimetoxisilano (2% AEAPTMS, 30 min). (C) La inmovilización	

estuvo mediada por incubación el sustrato de vidrio fue funcionalizado con amina en una solución de AgNPs (Agnihotri et al., 2013). 21

Figura 6. Planta de *Thuja orientalis* utilizada para la infusión, actúa como precursor para la síntesis de AgNPs. 26

Figura 7. Equipo DSC serie Q2000 instrumentos TA..... 34

Figura 8. Espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum UATR Two. 35

Figura 9. Diferencia de color en el extracto antes y después de la síntesis. a) Extracto de *Thuja orientalis* b) Termino de la síntesis 50 min, color ámbar. 38

Figura 10. Espectros de absorción UV-Visible de AgNPs, tomados en diferentes intervalos de tiempo con respecto a la síntesis. Muestra el plasmón de resonancia superficial a 424 nm. 38

Figura 11. Espectroscopia por Absorción Atómica muestra el aumento de la concentración de plata con respecto al tiempo de adición de AgNO_3 en la síntesis de NPs. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza ($p < 0.05$). ANOVA de una sola vía, comparación de medias por Tukey..... 40

Figura 12. Espectro del extracto de *Thuja orientalis* muestra los grupos funcionales característicos de la planta. 42

Figura 13. Espectros respecto al tiempo de síntesis, la diferencia que tiene cada tiempo representa la intensidad de picos conforme avanza la síntesis. 43

Figura 14. Tamaño de las NPs por DLS en función del tiempo de síntesis. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). ANOVA de una sola vía, comparación de medias por Tukey. 45

Figura 15. Potencial zeta de las AgNPs a 25 °C. Se muestra únicamente el gráfico del tratamiento de 50 min en virtud a la obtención del tamaño nanométrico registrado anteriormente en el apartado 7.1.4..... 47

Figura 16. Espectros de las diferentes formulaciones de las películas, muestra los grupos característicos de la gelatina. 51

Figura 17. Efecto antimicrobiano de las películas contra a) *Salmonella typhimurium* con nulo efecto antimicrobiano y b) *Staphylococcus aureus* exhibiendo halos de inhibición. ... 53

Figura 18. Se muestra la diferencia de color en las diferentes formulaciones de las películas, con respecto a la concentración de AgNPs..... 55

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

°B	Grados Bloom
°C	Grados Celsius
ΔH	Entalpía
a.C	Antes de Cristo
cm	Centímetro
g	Gramo
h	Hora
J	Joule
kg	Kilogramo
m	Metro
m²	Metro cuadrado
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
N	Newton
Pa	Pascal
NPs	Nanopartículas
rpm	Revoluciones por minuto
Ag	Plata

RESUMEN

Se realizó la síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando el extracto de *Thuja orientalis* como agente reductor y AgNO_3 como precursor. Se caracterizaron las nanopartículas mediante: espectroscopía UV-Vis, espectroscopia de absorción atómica, espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), tamaño de partícula por DLS y potencial zeta. La espectrometría UV-Vis reveló la formación de un plasmón de resonancia superficial (PRS) cerca de los 420 nm característico de la presencia de AgNPs. La absorción atómica reflejó un incremento en la concentración de plata conforme se desarrollaba la síntesis, obteniendo una concentración máxima de 15.698 mg/L. El espectro de FTIR mostró los grupos funcionales característicos de las fitomoléculas tales como R—O—H (3,335), O=C-OH (2314), C-C=C (1,450). El potencial zeta evidenció la estabilidad de las NPs mostrando un carga de -19.6 mV y se obtuvo un tamaño de partícula de 86.82 nm

Se elaboraron películas de gelatina con AgNPs, en concentraciones al 100%, 50%, 25%, 12.5% y 0 % de NPs. Se adicionó glicerol como plastificante al 2% para evaluar las propiedades térmicas, moleculares, solubles y antibacterianas de las películas. Las propiedades térmicas muestran eventos similares en todos los tratamientos se detectan dos eventos principales la liberación del agua libre, la degradación del glicerol y finalmente la degradación de la gelatina. En los espectros se detectaron los principales grupos funcionales de la gelatina: la amida I a 1636 cm^{-1} , amida II a 1545 cm^{-1} y la amida III a 1232 cm^{-1} no se visualizaron nuevos picos en ninguna formulación lo cual refiere a que no se formaron nuevos enlaces entre la gelatina y las AgNPs. La actividad antimicrobiana fue satisfactoria exhibiendo halos inhibición contra el patógeno *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUCCIÓN

El empaqueo de los alimentos se centra principalmente en la seguridad de los productos alimentarios, pero si el empaque no es fiable, la seguridad de los alimentos se convierte en un tema de preocupación. Los sistemas de empaqueo preservan la calidad del producto durante largos periodos, contribuyendo también a la reducción de los desechos. Los factores predominantes que determinan la calidad, la seguridad y la vida útil de los productos alimentarios son: la temperatura, la concentración de oxígeno, la concentración de dióxido de carbón, la humedad relativa y el contenido de humedad así como los atributos de los distintos productos (Pereira de Abreu, Cruz, & Paseiro Losada, 2012). Por lo tanto, es necesario vigilar en tiempo real diversos atributos de un producto alimentario que se sabe que influyen en la calidad del mismo, las propiedades organolépticas y la seguridad alimentaria en general. El empaqueo innovador sigue impulsando el crecimiento de la industria alimentaria y ha llevado al desarrollo de diversas técnicas de empaqueo novedoso y con aplicaciones interdisciplinarias avanzadas (Kalpana, Priyadarshini, Maria Leena, Moses, & Anandharamkrishnan, 2019).

Las investigaciones recientes se han centrado en el uso de la gelatina para desarrollar materiales de embalaje biodegradables, las películas hechas de gelatina tienen buenas propiedades mecánicas pero pobres propiedades de barrera contra el vapor de agua y son muy sensibles a la humedad (Loo & Sarbon, 2020). La incorporación de componentes diversos a las películas les brinda un valor agregado, se sabe que las nanopartículas de plata tienen una amplia gama de propiedades antimicrobianas y la mayoría de ellas no son perjudiciales para la salud humana (Sasidharan, Namitha, Johnson, Jose, & Mathew, 2020). Hay un creciente interés en el desarrollo de películas combinando diferentes componentes para brindar nuevas propiedades a las mismas. En ese sentido el uso de componentes que no solo protejan al alimento sino también reduzcan la contaminación ambiental, la gelatina y las AgNPs tienen un papel prometedor como alternativa a los nuevos empaques, brindando características particulares a las películas.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de materiales antimicrobianos

Una de las principales funciones del envasado se refiere al aislamiento de los alimentos de su entorno, para protegerlos de microorganismos, polvo y humedad. Éstos últimos degradan rápidamente los alimentos por lo tanto cuando se contamina, puede afectar la salud del consumidor. En estas situaciones un embalaje eficaz debe evitar la transferencia de los contaminantes presentes en el medio ambiente hacia los alimentos, en algunos casos el embalaje debe tener características adicionales a los materiales comúnmente empleados no deben ser tóxicos y no permeables a los microorganismos (Rodríguez-Hernández, 2017).

En este contexto, los envases de polímeros actuales tienen muchos requisitos incluyen la barrera al oxígeno, humedad, rigidez, resistencia a ataque de componentes alimentarios y flexibilidad. Sin embargo, una de las principales razones de la descomposición de los alimentos es la contaminación por microorganismos. La estrategia que se ha empleado para incluir el agente antimicrobiano, consiste en la incorporación de pequeños sobres que contienen el compuesto antimicrobiano dentro del empaque. Si bien esta estrategia ha sido ampliamente empleada en medicamentos, pesticidas, textiles o artículos para el hogar, solo unos pocos productos se han comercializado para envasado de alimentos. El número de estudios ha crecido considerablemente por lo tanto, los antimicrobianos naturales, así como los antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos como GRAS (Generally recognized as safe) por la Food and Drug Administration (FDA), se han incorporado a los plásticos termoestables y termoplásticos (Sung et al., 2013).

La incorporación de antimicrobianos en el envase tiene diferentes ventajas, dado que previene el crecimiento de microorganismos en la superficie de los alimentos donde se produce la mayor parte de la contaminación y se genera deterioro. Además, el control sobre la liberación de antimicrobianos se puede lograr fácilmente, por un lado, los antimicrobianos pueden ser inactivos por los componentes existentes en el alimento. Por otro lado, los procesos de migración a la matriz de alimentos a granel diluirán la concentración antimicrobiana y reducirán significativamente la actividad (Rodríguez-Hernández, 2017).

Los antimicrobianos pueden derivarse de fuentes animales, vegetales o microbianas y exhiben un amplio rango de actividad antimicrobiana contra microorganismos del deterioro, se caracterizan por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. Los antimicrobianos se utilizan en alimentos por dos razones principales: para controlar procesos de deterioro natural, es decir, la conservación de alimentos e impedir la proliferación de microorganismos. Los antimicrobianos disponibles comercialmente comúnmente usados incluyen ácidos orgánicos, polisacáridos, aceites esenciales derivados de plantas, antimicrobianos derivados de fuentes microbiológicas, por ejemplo, nisina y materiales inorgánicos, aunque en general no son naturales, se incluyen, por ejemplo, iones metálicos como plata, oro, cobre u óxido de titanio. Estos antimicrobianos se han utilizado con éxito para desarrollar envases activos con antimicrobianos que involucra la incorporación de sustancias antimicrobianas en el material de embalaje desde el cual se puede liberar en el ambiente alimentario, lo que inhibe el crecimiento microbiano, reduce la oxidación de lípidos y extiende la vida útil de productos alimenticios (Sullivan et al., 2018).

2.2 Antimicrobianos naturales

Los desafíos de la seguridad alimentaria mundial, como el aumento de la población mundial (se estima que para 2050 se alcanzará 9 mil millones de habitantes), aumentando la migración rural a urbana, el cambio climático y los residuos de alimentos envasados por descomposición y contaminación microbiana siguen poniendo una mayor presión sobre la producción mundial de alimentos. Los alimentos comestibles producidos para humanos se pierden o desperdician anualmente a lo largo de la cadena de suministro, dada la naturaleza intensiva en recursos del cultivo, producir, procesar y envasar productos alimenticios ésta pérdida representa un importante costo para la industria alimentaria (Tiwari, 2018).

El embalaje tiene un papel importante en la cadena de suministro de alimentos y es una parte integral tanto de los procesos alimentarios como de toda la cadena de suministro de alimentos con el objetivo principal de proteger de los alimentos de la contaminación. Nuevas tecnologías como los envases activos antimicrobianos (AAP) que contienen antimicrobianos naturales (NAM) que pueden prolongar la vida útil de los productos alimenticios y reducir el desperdicio de los alimentos se está explorando como métodos potenciales para disminuir

estos problemas críticos. Las categorías de NAM que actualmente están trabajando incluyen extractos de aceites, polisacáridos antimicrobianos, ácidos orgánicos y bacteriocinas (Tiwari, 2018).

2.2.1 Aceites esenciales (AE)

Tienen una composición compleja de metabolitos secundarios alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular en los cuales terpenos (como p-cimeno, limoneno o pineno), terpenoides (timol, carvacrol o mentol) y fenilpropenos (eugenol) son compuestos más predominantes. La composición de aceites esenciales se ve afectada por varios parámetros extrínsecos que incluyen el momento de la cosecha, el clima en el que se cultivaron la fuente geográfica y el género de las plantas (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012). Debido a las características termolábiles, fotosensibles y volátiles de los aceites, los compuestos son susceptibles de auto oxidación, isomerización y reordenamiento térmico, por lo tanto deben almacenarse a bajas temperaturas, protegidas de fuentes de luz y oxígeno (Turek & Stintzing, 2013). Uno de los principales inconvenientes en la aplicación de los AE como antimicrobianos en aplicaciones de envasado y productos alimenticios es su carácter hidrofóbico, separación de fases de agua y un fuerte impacto en el sabor a mayores concentraciones (Tiwari, 2018).

2.3 Antimicrobianos sintéticos

Hoy en día la industria alimentaria utiliza en todo el mundo una gran cantidad de antimicrobianos. Estos difieren según el país ya que su uso está restringido según por las leyes alimentarias de cada nación. La velocidad de deterioro microbiológico no solo depende de los microorganismos presentes, sino también de la composición química del producto y del tipo de carga microbiana inicial, los antimicrobianos son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por lo tanto mantienen las características organolépticas del alimento. La mayoría de agentes antimicrobianos usados en alimentos solo inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, más no lo eliminan, por lo que el producto tiene una vida de anaquel

restringida y es necesario el uso de otros factores de conservación que aumenten la vida de anaquel del producto (Rodríguez Saucedo, 2011).

2.4 Películas

Todos los alimentos son una parte esencial de la dieta humana, cualidades de los alimentos en términos físicos (aparición, color, textura, pérdida de peso), los químicos (azúcar, pH, compuestos volátiles y oxidación de lípidos), microbiológicos (recuento total de bacterias, levaduras y mohos) y los atributos sensoriales (sabor, olor) se deterioran con el tiempo, sin embargo, dependiendo del tipo de alimentos tendrá distinto proceso de deterioro, por ejemplo, el deterioro microbiológico y químico son factores importantes en la calidad de la mayoría de los productos frescos como la carne de pollo, pescado, res por consecuencia da lugar a la producción de mal sabor, mal olor y decoloración. El deterioro de frutas se debe principalmente a la pérdida de agua apariciones anormales como la textura suave y proceso de senescencia son atributos que los hacen inaceptables para los consumidores. Recientemente ha crecido la demanda de alimentos de alta calidad conservados sin aditivos, por lo que el uso de películas y recubrimientos comestibles es una alternativa que se puede aplicar para mantener la calidad y prolongar la vida útil de los alimentos (Tongdeesontorn & Rawdkuen, 2019). Los polímeros biodegradables se han convertido en matrices de interés en los últimos años debido a las preocupaciones ambientales como el calentamiento global. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar materiales poliméricos basados en fuentes renovables, especialmente para su uso en envasado a corto plazo y aplicaciones desechables (Oliveira Filho et al., 2019).

El desarrollo de una formulación de recubrimiento eficaz debe basarse en dos enfoques clásicos: (i) un enfoque de ciencia de materiales y (ii) la aplicación de material de recubrimiento sobre la superficie de la fruta. El enfoque materialista incluye dos sucesos adicionales: (i) conversión de biopolímero a gel y (ii) formación de gel a película delgada. Estos eventos están relacionados, lo que hace que sea particularmente importante comprender el comportamiento del material de recubrimiento antes de la aplicación a la superficie de la fruta. La formulación desarrollada debe evaluarse en términos de sus propiedades independientes que incluyen el espesor de la película, la solubilidad, el contenido de

humedad, la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades de barrera de oxígeno, la transparencia, el color, la resistencia a la tracción, elongación y módulo de Young y características antimicrobianas (Thakur et al., 2019).

2.5 Materiales utilizados comúnmente para la elaboración de películas

Los recubrimientos comestibles se derivan principalmente de materiales alimenticios que generalmente se reconocen como seguros (GRAS) e incluyen celulosa, proteínas, almidones y otros polisacáridos (Thakur et al., 2019). Algunos ingredientes funcionales utilizados en el diseño de películas y recubrimientos comestibles son: fármacos, vitaminas, antimicrobianos, saborizantes, colorantes y conservadores, estos son importantes para mejorar la funcionalidad de las películas comestibles, alimentos procesados, así como para cosméticos y productos farmacéuticos. Estos ingredientes difieren en cuanto a su forma molecular, física, su polaridad y su masa molar. El uso de la nanotecnología ha permitido la incorporación de estos compuestos en películas sin perder funcionalidad (Georgina Solano-Doblado, Alamilla-Beltrán, & Jimenez Martinez, 2018). Para la formación de la matriz estructural de una película o recubrimiento se utilizan componentes de naturaleza polimérica y pueden agregarse otros componentes que mejoran sus características o atributos. Existe una diversidad de compuestos que pueden ser utilizados, algunos ejemplos son:

2.5.1 Polisacáridos

Almidones y sus derivados: Los gránulos de almidón contiene dos tipos de moléculas poliméricas: 1) Amilosa: formada por unidades de cadena lineal de 1,4- α -D-glucopiranososa y 2) Amilopectina, que es una molécula ramificada formada por unidades de α -1,6 glucósido. La primera presenta excelentes propiedades para formar películas fuertes, isotrópicas, inodoras, insípidas y sin color. Cuando se adiciona algún tipo de plastificante se pueden obtener películas con buenas propiedades mecánicas, sin embargo la retrogradación afecta significativamente el desarrollo mecánico, ya que las hélices de la amilosa y amilopectina se entrecruzan endureciendo la película (Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2005).

Pectinas: Estos polímeros, son producidos ampliamente por las plantas y están compuestos por el ácido 1-4- α -D-galactopiranosilurónico, naturalmente esterificados con metanol. De acuerdo con el grado de esterificación, las pectinas se dividen en: de alto (GE>50%) o bajo metoxilo (GE<50%), valores que determinan la solubilidad o propiedades de solidificación (Prasad & Kochhar, 2014).

Quitano: Es un polisacárido, que se obtiene por desacetilación de la quitina obtenida a partir de los desechos de los crustáceos, en el exoesqueleto de los insectos y en la pared celular de los hongos, está compuesto por dos subunidades, la D-glucosamina y la N-acetil-D-glucosamina, unidas por un enlace glucosídico β -(1,4). Posee propiedades antimicrobianas y antimicóticas (Georgina Solano-Doblado et al., 2018).

2.5.2 Proteínas

Estos compuestos presentan la habilidad de formar películas y recubrimientos cuyas características dependen de la masa molar, conformación, propiedades eléctricas, flexibilidad, estabilidad térmica. Los recubrimientos o películas obtenidos con proteínas, son transparentes y flexibles cuando están elaborados a base de agua, presentan buenas propiedades mecánicas y de barrera, comparadas con las que están hechas a base de polisacáridos o lípidos. Las proteínas de la leche, así como las provenientes de maíz, trigo, o soja son utilizadas por su calidad nutricional, excelentes propiedades sensoriales y funcionales (Georgina Solano-Doblado et al., 2018).

2.5.3 Lípidos

Para superar la pobre resistencia mecánica de los compuestos lipídicos, estos pueden ser empleados en asociación con materiales hidrofílicos mediante la formación de una emulsión. La eficacia de una película comestible frente a la humedad no puede ser simplemente mejorada mediante la adición de materiales hidrofóbicos a la formulación, a menos que se logre una capa lipídica homogénea y continua dentro o sobre la matriz hidrocoloide. Las películas basadas en lípidos son menos eficientes en el control de la transferencia de agua que las películas a base de proteína, ya que no se logra una distribución homogénea de los

componentes. Sin embargo, exhiben buena resistencia mecánica y requieren un sencillo proceso durante la manufactura y la aplicación (Quintero, Falguera, & Muñoz, 2010).

2.5.4 Aplicaciones

Durante la producción, el procesamiento, la distribución y el almacenamiento, los alimentos se deterioran a causa de procesos químicos o microbiológicos. Una alternativa es el uso de envases comestibles que pueden proporcionar beneficios para los alimentos, tales como la conservación, mantenimiento de la calidad y seguridad de los alimentos. Las películas y recubrimientos comestibles reducen la permeabilidad al oxígeno, previenen la oxidación de lípidos colorantes y los sabores de los productos alimenticios. Las propiedades de barrera de las películas al oxígeno también son valiosas para retrasar la respiración de productos frescos como frutas y verduras. Las características de los recubrimientos o películas pueden mejorarse mediante la incorporación de compuestos activos (Sahraee, Milani, Regenstein, & Kafil, 2019).

2.6 Gelatina

La gelatina es una proteína de alto peso molecular que se puede obtener después de la hidrólisis del colágeno en condiciones controladas (A. M. Ali, H. Kishimura, & S. Benjakul, 2018). Es un material relativamente barato, muy fácil de obtener ya que el colágeno se puede encontrar en la piel o huesos que se generan en grandes cantidades como subproductos durante el sacrificio y procesamiento de animales, por lo que estos materiales sirven como material de partida para la extracción de gelatina. La principal materia prima para la extracción de gelatina se deriva de la piel porcina (80%), seguida de la piel bovina (15%) y huesos porcinos, hueso de sepia y pescado (5%) (Tongdeesoontorn & Rawdkuen, 2019).

El nombre de gelatina se deriva de la palabra latina “gelata” que describe su propiedad más característica, es decir, la formación de gel en el agua. La gelatina es una proteína que se deriva del colágeno, el cual es el componente principal de todos los tejidos conectivos fibrosos que se encuentran en cartílagos, tendones, fibras musculares, piel y oseína de los animales. El origen del colágeno y el procedimiento de extracción determinan las propiedades de la gelatina final. Actualmente la gelatina se produce principalmente a partir

de fuentes bovinas, porcinas y ovinas, pero también se puede extraer de peces y aves de corral (Rasid, Nazmi, Isa, & Sarbon, 2009).

Las características de la gelatina están influenciadas por factores intrínsecos y extrínsecos, estos incluyen el punto isoeléctrico, las composiciones de aminoácidos y la distribución del peso molecular, dichos factores determinan las propiedades funcionales y las aplicaciones de la gelatina (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2018).

2.7 Extracción de gelatina

La producción de gelatina se puede dividir en tres pasos principales: tratamientos previos, extracción con agua a alta temperatura y clarificación/secado ya sea por aire caliente, por aspersión o por congelación. En el primero se eliminan toda la materia que no es colágeno, que incluye proteínas, grasas y minerales, teniendo como objetivo aumentar la eficiencia de extracción y la pureza de la gelatina, dichos componentes se eliminan con una solución alcalina como hidróxido de sodio, mientras que las grasas y los minerales se eliminan con un disolvente no polar y EDTA/HCl, respectivamente. Con respecto al paso número dos se llevan a cabo extracciones por procesos ácidos o alcalinos, esto dependen de la complejidad de la materia prima. El reactivo utilizado para el tratamiento ácido es generalmente ácido orgánico, específicamente ácido acético, la gelatina obtenida por el proceso ácido se llama gelatina tipo A. Mientras que los álcalis utilizados son hidróxido de sodio o hidróxido de calcio, la gelatina fabricada a partir de la materia prima tratados con alcalinos se denomina gelatina tipo B. La extracción de gelatina se realiza a partir de material pretratado, en el que se utiliza agua caliente para destruir los enlaces de hidrógeno que estabilizan la triple hélice del colágeno madre. Durante la transición del colágeno a la gelatina, los enlaces no covalentes se rompen junto con algunos enlaces intramoleculares covalentes y algunos enlaces peptídicos se dividen, para aumentar la eficacia de la extracción, especialmente de huesos de animales o escamas de peces, se debe implementar una desmineralización, adicionalmente se pueden emplear ultrasonido o campos eléctricos pulsados para aumentar el rendimiento, dichas técnicas pueden romper o aflojar la matriz del material compacto, como consecuencia se puede liberar más gelatina. Se requiere de filtración y clarificación para producir la gelatina con claridad deseada, la solución de gelatina se trata con tierra de

diatomeas o carbón activado, la solución de gelatina se somete a secado. En general, el método y la condición de secado utilizados tienen el impacto en las características y propiedades de la gelatina resultante. El secado por pulverización es un medio prometedor para reducir los olores indeseables (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2018).

2.7.1 Estructura de la gelatina

Dado que la gelatina se deriva del colágeno, es pertinente describir la estructura de estas macromoléculas antes de hablar de la gelatina. El monómero de colágeno (tropocolágeno) es una varilla helicoidal triple formada por tres cadenas paralelas, la molécula de colágeno tiene una longitud de aproximadamente 300 nm, un diámetro de 1.5 nm y un peso molecular de alrededor de 300,000 Da. En la fabricación de gelatina, la molécula de colágeno se despliega en una mezcla de cadenas, la composición de aminoácidos de estas cadenas es bastante única y las tres cadenas involucradas en una molécula de colágeno pueden tener composiciones de aminoácidos ligeramente diferentes, la secuencia general de aminoácidos es: Gly X Y, donde X a menudo es prolina e Y a menudo es hidroxiprolina. Esto significa que la glicina representa aproximadamente un tercio de todos los residuos en el colágeno y la gelatina (Haug & Draget, 2009).

La gelatina posee una estructura helicoidal formada por 20 aminoácidos que le confiere propiedades funcionales y de formación de películas, esta estructura tiene tres cadenas de polipéptidos enrolladas entre sí, formando una hélice unidas a través de enlaces hidrógeno. Sus características físicas dependen de su origen, pero independientemente de su origen, todas tienen muy buena resistencia a la tracción y barrera a los gases, aromas y migración de gases. Por el contrario poseen escasa barrera al vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica (Acosta, 2014).

Las composiciones de aminoácidos de la gelatina varían con las especies animales, el pretratamiento y los procesos de extracción. La cantidad de ácido aspártico y ácido glutámico en la gelatina de tipo B es mayor que la de la gelatina de tipo A. De forma general, la gelatina muestra la composición de aminoácidos similar al colágeno, contiene 33% de glicina, 12%

prolina, 11% alanina y 10% de hidroxiprolina como los principales aminoácidos, pero tiene un bajo contenido de histidina, metionina y tirosina (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2018).

La desnaturalización térmica o degradación física y química del colágeno implica la ruptura de la estructura de triple hélice para dar gelatina, un biocompatible y no inmunogénico producto, apto para aplicaciones médicas, a una temperatura de alrededor de 40°C, la gelatina forma soluciones líquidas y forma geles termorreversibles físicos en refrigeración. Durante la gelificación las cadenas se someten a un trastorno conformacional en el cual existe un orden en la transición y el colágeno tiende a recuperar la estructura de triple hélice (Haug & Draget, 2009).

2.7.2 Formación de películas

La gelatina es una proteína que se ha utilizado para hacer el recubrimiento y películas comestibles, las películas de gelatina generalmente presentan buenas propiedades mecánicas, barrera al oxígeno pero aún tiene una alta capacidad de absorción de agua lo cual la hace propensa a hincharse, se puede disolver parcialmente o se desintegra al contacto con la superficie húmeda (Nilsuwan, Benjakul, & Prodpran, 2015). Para abordar el problema se han hecho modificaciones como la incorporación de diferentes sustancias: compuestos fenólicos, agentes entrecruzantes de proteínas, plastificantes hidrofóbicos o surfactante estos últimos, con la finalidad de mejorar la propiedad de resistencia al agua mediante el aumento de las características hidrofóbicas de las moléculas de gelatina (Ramos, Valdés, Beltrán, & Garriós, 2016).

La gelatina tiene una excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, no es tóxica y tiene una gran capacidad de modificación a nivel de los aminoácidos, debido a sus propiedades superiores, la gelatina se ha empleado ampliamente como biomaterial para la ingeniería de tejidos duros y blandos, la administración de fármacos y pegamentos biológicos. Se puede formar un hidrogel de gelatina mediante reticulación física en agua por encima de una cierta concentración (aproximadamente del 2% p/v) por debajo de 30°C a 35°C. Durante este proceso las moléculas de gelatina se agregan y experimentan un cambio conformacional de una de una “bobina aleatoria” a una triple hélice, al mismo tiempo, los enlaces hidrógeno

están presentes intermolecularmente en tres grandes fracciones de cadenas de gelatina. Sin embargo, las asociaciones no covalentes se rompen fácilmente a temperaturas más altas de 35°C destruyendo la red física. Los hidrogeles de gelatina tienen una estabilidad de forma baja, una resistencia pobre y una elasticidad baja, lo que limita significativamente sus aplicaciones biomédicas a temperaturas fisiológicas de 37°C. Para aumentar su estabilidad y propiedades mecánicas, el gel de gelatina puede ser entrecruzado covalentemente por pequeños componentes químicos como carbodiimidas, formaldehído y glutaraldehído, que pueden acoplar los grupos carboxilo con grupos amino, formando enlaces de amida estables. La gelatina reticulada puede formar una red intrincada de alto peso molecular que es capaz de hincharse, debido a que ésta proteína es producto desnaturalizado del colágeno, la gelatina contiene muchos iones metálicos divalentes como calcio, cobre, hierro y zinc que pueden formar enlaces iónicos con los grupos de ácido carboxílico en los polipéptidos de gelatina, lo que influye en la organización de la red de gelatina (Xing et al., 2014).

2.8 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia, ingeniería y tecnología que se lleva a cabo a escala nanométrica (alrededor de 1 a 100 nm) que permite la manipulación de materiales para satisfacer las necesidades existentes. La nanociencia y la nanotecnología implican la capacidad de ver y controlar átomos y moléculas individuales (R. Olawoyin, 2018).

Desde el periodo de las antiguas civilizaciones, la nanociencia y la nanotecnología han marcado un hito en el campo de la ciencia y la tecnología. La nanociencia se puede describir como: “La nanociencia es el fenómeno y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de los de mayor escala” mientras que la nanotecnología constituye “El diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño a escala nanométrica” (Prajitha, Athira, & Mohanan, 2019).

La Nanotecnología ha encontrado aplicaciones en muchas áreas diferentes, desde la agricultura o el procesamiento de alimentos hasta la seguridad, el envasado, la nutrición y los productos nutraceuticos (Rodríguez-Hernández, 2017).

2.8.1 Aplicaciones

Las aplicaciones de estos nanomateriales están en diversos sectores (Figura 1) incluidos la agricultura, la medicina, los cosméticos, la alimentación y la salud pública debido a su capacidad única para incrementar la solubilidad, biodisponibilidad y protección de bioactivos. Debido a la excelente naturaleza fisicoquímica y al potencial antimicrobiano de los nanomateriales, son ampliamente utilizados contra diversos microbios patógenos y en la asistencia sanitaria, protección de cultivos, tratamiento de agua, seguridad alimentaria y conservación de alimentos. Además, los materiales nanoestructurados se están aplicando en la industria alimentaria como nanosensor, nuevo material de embalaje y componente alimenticio encapsulado (Bajpai et al., 2018).

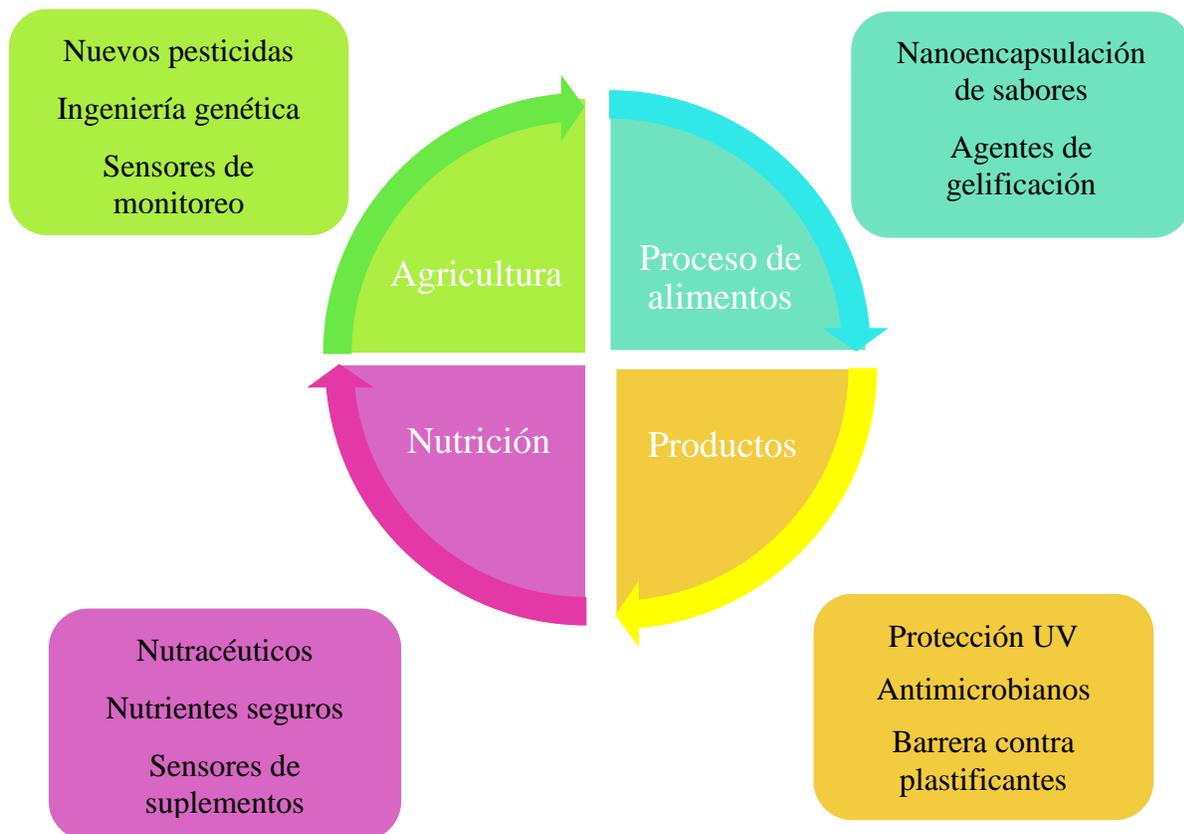


Figura 1. Esquema de las aplicaciones de la Nanotecnología en la Ciencia de los Alimentos (Bajpai et al., 2018).

2.8.2 Nanopartículas

La investigación de las nanopartículas (NPs) es una rama emergente de la ciencia. El ajuste del tamaño y la forma de las NPs alteran sus propiedades y ofrecen enormes oportunidades para descubrimientos sorprendentes. Las nanopartículas han alcanzado volúmenes de la producción anual de varios megatonnes métricos, la mayor parte de la producción mundial a escala industrial puede asignarse a TiO_2 , CaCO_3 , AlO_x , FeO_x , ZnO , CNTs, SiO_2 y Ag (Barhoum, Rahier, Benelmekki, & Assche, 2018).

Las NPs son partículas sólidas de tamaño nanométrico diseñadas a escala atómico o molecular para formar propiedades físicas novedosas o superiores que no son alcanzables por los sólidos convencionales a granel. Estas partículas nanométricas actúan como una unidad completa en relación con las propiedades de otros materiales que tienen un rango o valor crítico por debajo del cual sus propiedades cambian drásticamente. Las partículas de diámetro inferior a 100 nm muestran propiedades que son diferentes a las de los sólidos convencionales (G. Sharma et al., 2019).

Las nanopartículas mono metálicas (NPM), como su nombre lo indica, consisten en un solo metal. El átomo de metal constituido determina las propiedades de estas nanopartículas mono metálicas, dichas partículas son de diferentes tipos dependiendo del tipo de átomo metálico presente, tales como las nanopartículas magnéticas, magnéticas y de transición. Pueden separarse por diferentes vías, su estructura puede ser estabilizada utilizando varios grupos funcionales. En las últimas décadas han marcado el mayor interés en el campo de las nanopartículas metálicas debido a sus propiedades físicas y químicas mejoradas, por esta razón se utilizan para una serie de aplicaciones, como en la electrónica, óptica, catálisis también se han utilizado como agentes antimicrobianos contra una serie de microorganismos (G. Sharma et al., 2019).

Las nanopartículas metálicas como el cobre, la plata o el óxido de zinc son nanomateriales utilizados para la preparación de materiales multifuncionales debido a su alta especificidad y propiedades funcionales. Las nanopartículas de oro se han aplicado en terapia clínica y diagnósticos, las de plata se han utilizado en la curación de heridas debido a su actividad antimicrobiana, las de selenio tienen excelentes propiedades biológicas, baja toxicidad, han presentado un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas y médicas, ya que pueden

usarse para la terapia del cáncer y tienen un rango de posibilidades en la dieta humana (Jamróz et al., 2018).

Las nanopartículas se pueden sintetizar usando dos técnicas: Top –down y bottom-up. En el primero los materiales a granel se dividen en nanopartículas, sin embargo, en el segundo las nanopartículas se combinan para formar el material a granel (G. Sharma et al., 2019).

Top-down: La industria más exitosa que utiliza este enfoque es la electrónica, involucran una gama de tecnologías como deposición química de vapor (CDV), deposición física de vapor (PVD), litografía con haz de electrones o litografía de rayos x y grabado químico en plasma, para generar estructuras funcionales a micro y nano escala (Subramani, Elhissi, Subbiah, & Ahmed, 2019).

Bottom-up: Consiste en hacer nanoestructuras y dispositivos organizándolos en forma de átomo a átomo. La microscopia de exploración de túneles se ha utilizado para construir características atómicas de tamaño nanométrico, como las letras escritas por IBM con átomos de xenón en níquel (Subramani et al., 2019).

Las nanopartículas tienen un gran campo de aplicaciones que incluyen productos farmacéuticos, cosméticos, materiales avanzados de electrónica, magnética, optoelectrónica, detección de energía. Su impacto es significativo en el área biomédica y radio terapia: sistemas controlados de administración de fármacos, sensibilizadores de vacunas, los marcadores nanométricos permitirán la detección de cáncer en la fase inicial cuando solo existan escasas células cancerosas, marcaje de ADN e imágenes biológicas (Čubová & Čuba, 2019).

2.9 La plata como material antimicrobiano

El uso de nanopartículas inorgánicas como agentes antimicrobianos ha sido ampliamente explorado debido principalmente a su excelente estabilidad a altas presiones o temperaturas requeridas para la fabricación de empaques alimentarios (Rodríguez-Hernández, 2017).

Las nanopartículas de plata (AgNP's) son sin duda alguna las nanopartículas inorgánicas más empleadas para el envasado antimicrobiano, las ventajas de su uso incluyen su baja

volatilidad, alta temperatura y han demostrado un gran potencial como antimicrobianos y antimicóticos contra numerosas cepas de microorganismos. Además las AgNP's son muy efectivos para penetrar biopelículas y se ha demostrado que son menos susceptibles de inducir resistencia en comparación con otros antimicrobianos, por ejemplo la plata es bastante eficaz contra ciertas cepas de bacterias resistentes que incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Enterococcus* resistente a la vancomicina. Es de importancia mencionar que la plata es un aditivo muy versátil que se ha introducido en diferentes plásticos y textiles tanto para aplicaciones alimentarias como también en la industria de dispositivos médicos (Duncan, 2011).

Los nanocompuestos de AgNP/polímero son materiales muy atractivos para su uso en envasado de alimentos para preservar su vida útil, se basan en la liberación controlada de AgNPs de esta manera el envasado de los alimentos puede ser diseñado para permanecer activo contra microorganismos durante largos periodos de tiempo. Se han descrito numerosos nanocompuestos de AgNP/Polímero que muestran actividad antimicrobiana utilizando gran variedad de polímeros: polimetilmetacrilato, alginato, elastómero de silicona poliuretanos, polivinilpirrolidona, poliacrilamida, poliamida, alcohol polivinílico, polipropileno, celulosa, óxido de polietileno y quitosano (Rodríguez-Hernández, 2017).

Las nanopartículas de plata han atraído atención en el sector de empaques alimentarios debido a su efectivo poder antimicrobiano contra patógenos que afectan a los alimentos. La incorporación de AgNPs en el sistema de empackado de alimentos podría inhibir de manera efectiva el crecimiento de microorganismos patógenos. Se han utilizado diversos métodos físicos y químicos para la producción de nanopartículas de plata, de manera general los métodos químicos se han utilizado ampliamente para la preparación de partículas metálicas a nano escala, sin embargo, se han informado de algunos efectos toxicológicos, después el uso de productos químicos que son peligrosos y actúan durante la síntesis como agentes reductores. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos alternativos para sintetizar AgNPs utilizando métodos biológicos ecológicos, biocompatibles y seguros provenientes de sistemas biológicos como bacterias, hongos, levaduras, extractos de plantas y ciertos componentes biológicos que también han sido catalogados como seguros para la producción de NPs a nivel extracelular e intracelular (Arfat, Ahmed, Hiremath, Auras, & Joseph, 2017).

2.10 Mecanismo de la toxicidad de las nanopartículas de plata en bacterias

Se han descrito diferentes mecanismos de acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata Durán y colaboradores (2010) destacaron la acción de los iones de plata y se compararon con las nanopartículas de plata, los datos sugieren que los iones de plata reaccionan con los grupos tiol de proteínas, produciendo inactivación bacteriana. Esta conjetura menciona que $\mu\text{mol L}^{-1}$ de iones de plata perjudican la replicación del ADN debido al desacoplamiento del transporte de electrones desde la fosforilación oxidativa, que inhibe las enzimas de la cadena respiratoria o interfiere con la permeabilidad de la membrana.

Marambio-Jones & Hoek, (2010) realizaron una discusión sobre el posible mecanismo de actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata, presentando tres posibles mecanismo de toxicidad:

- a) Captación de iones de plata seguidos por la interrupción de la producción de ATP y replicación del ADN
- b) Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por nanopartículas de plata y iones de plata
- c) Daño directo a la membrana celular por las nanopartículas de plata

Por otro lado Rai y colaboradores (2012), realizaron un importante análisis retrospectivo del papel de los iones de plata, la producción de ROS y las modificaciones morfológicas después de la acción de las nanopartículas de plata sobre las células bacterianas, así como los factores que influyen en el efecto antibacteriano como se muestra en la figura 2.

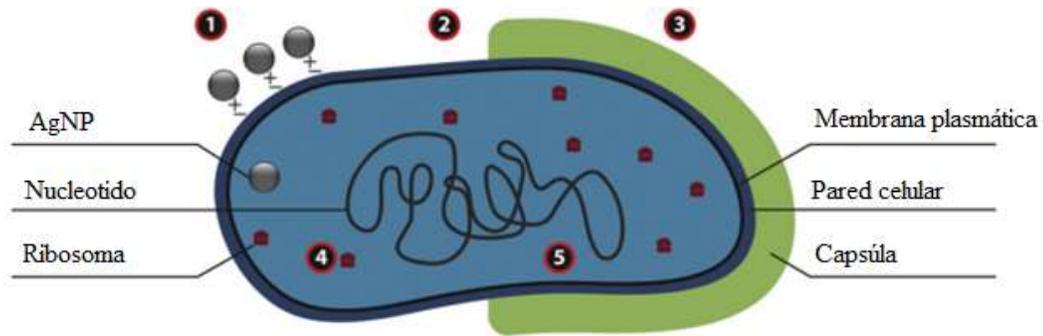


Figura 2. Mecanismo propuesto para la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata. 1: atracción electrostática, 2: producción de radicales libres, cambios de permeabilidad, alteración de la respiración, pérdida de contenido intracelular, 3: modulación de los perfiles de fosfotirosina de las proteínas, que participan en la progresión del ciclo celular en la síntesis de polisacáridos capsulares, 4: interacción con grupos tiol: inhibición de síntesis y función de proteínas, 5: interacción con moléculas que contienen fósforo (ADN) (Pereira de Abreu et al., 2012).

El mecanismo de toxicidad de las nanopartículas de plata en bacterias también fue discutido ampliamente previamente (Li et al., 2008) mediante posibles mecanismos antibacterianos de las nanopartículas de plata. Este mecanismo se puede describir en tres pasos:

- 1.- Las nanopartículas probablemente se adhieren a la superficie de las bacterias y, en consecuencia, alteran las propiedades de la membrana
- 2.- Las nanopartículas de plata dentro de la célula bacteriana pueden provocar daños en el ADN.
- 3.- La disolución de las nanopartículas de plata libera iones de plata antimicrobianos, que pueden interactuar con las proteínas que contienen tiol en la pared celular y afectar sus funciones. Esto es considerado como un importante mecanismo de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.

Una revisión realizada por Xiu y colaboradores (2012) declara que las nanopartículas de plata no ejercen significativamente directa toxicidad específica de partículas en las bacterias, pero puede servir como un portador para administrar más eficazmente iones de plata al citoplasma

y la membrana de las bacterias como se muestra en la figura 3. Esta función de las nanopartículas de plata podría deberse a una menor sensibilidad a la unión y una biodisponibilidad reducida con el ligando biológico, se presentaron muchas indicaciones de esta afirmación anterior, sin embargo, los autores no consideraron específicamente diferentes cepas bacterianas o caracterizaron exhaustivamente las nanopartículas de plata PEGiladas anaeróbicamente. No es posible generalizar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata basándose en los resultados de una sola cepa de *Escherichia coli* diferentes bacterias exhiben sensibilidad distinta en la función de la estructura de la pared celular.

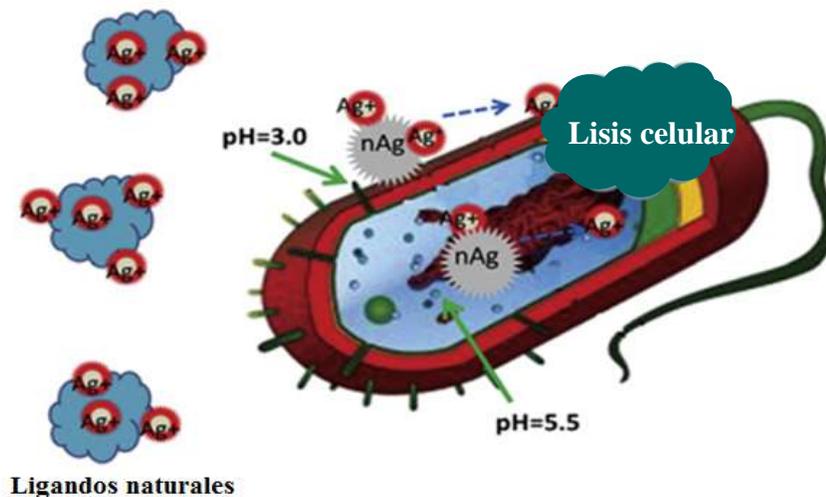


Figura 3. Representación esquemática de AgNPs, Ag⁺ e interacciones celulares (Xiu et al., 2012).

Las AgNPs pueden servir como un vehículo para entregar Ag⁺ de manera más efectiva. Ser menos susceptibles a la unión y reducir la biodisponibilidad por ligandos naturales comunes al citoplasma y membrana de la bacteria, cuya fuerza motriz de protones disminuirá el pH local (tan bajo como 3) y mejorará la liberación de Ag⁺.

Otro posible mecanismo involucra el gradiente de protones electroquímicos a través de procesos respiratorios en bacterias, que es la fuerza impulsora de la síntesis de ATP (Cao, Liu, Meng, & Chu, 2011). Las nanopartículas de plata pueden interrumpir la fuente de energía para todas las reacciones que dependen de la energía, lo que conduce a la muerte celular porque la síntesis de ATP permite la adhesión y proliferación de las células. La forma de las nanopartículas es un factor importante para determinar la actividad antibacteriana, Reidy y colaboradores (2013) resumieron las acciones antibacterianas de las nanopartículas de plata conocidas hasta el momento, como se muestra en la figura 4.

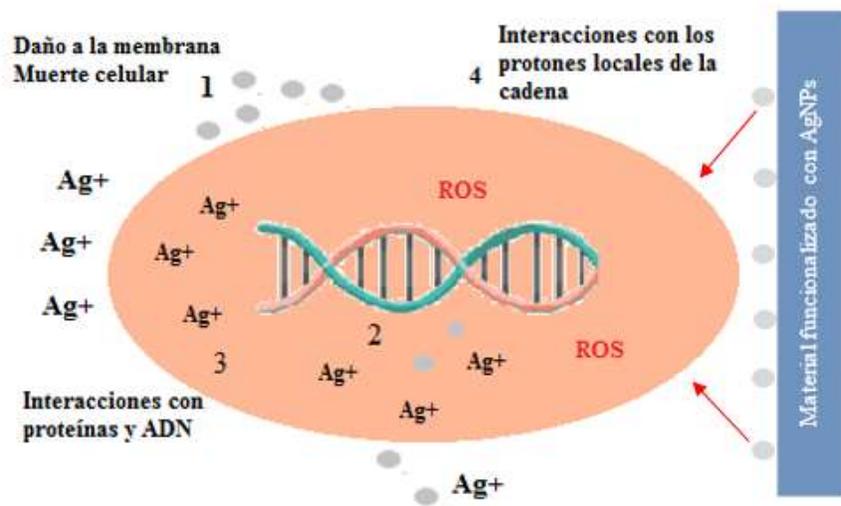


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo conocido de la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata y la plata iónica liberada. Los círculos grises indican NPs de plata y Ag⁺ implican la plata iónica liberada de las NPs (Reidy et al., 2013).

Para comprender si la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata depende principalmente de la interacción nanopartícula-célula (en la cual el tamaño de nanopartícula es un parámetro importante) o de las interacciones de los iones de plata, las nanopartículas de plata se inmovilizaron en una superficie funcionalizada con aminosilica, como se observa en la figura 5. Se encontró que la superficie bacteriana era extremadamente estable en medio acuoso y no se observó una lixiviación significativa de las nanopartículas de plata. Los resultados arrojaron que las nanopartículas de plata inmovilizadas sobre el sustrato de vidrio

mostraron una mejor desinfección, mucho más que la de los sustratos que liberaban plata en su forma iónica, aunque la cantidad de plata en solución era mucho mayor que la de las nanopartículas de plata coloidal en suspensiones o en una placa de plata. El efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata coloidal fue significativamente menor en comparación con las nanopartículas de plata inmovilizadas, aunque ambas contenían un número similar de nanopartículas de tamaño y morfología. Por lo tanto se encontró que las nanopartículas de plata son más efectivas contra *Escherichia coli* en comparación con el ion de plata (Agnihotri, Mukherji, & Mukherji, 2013).

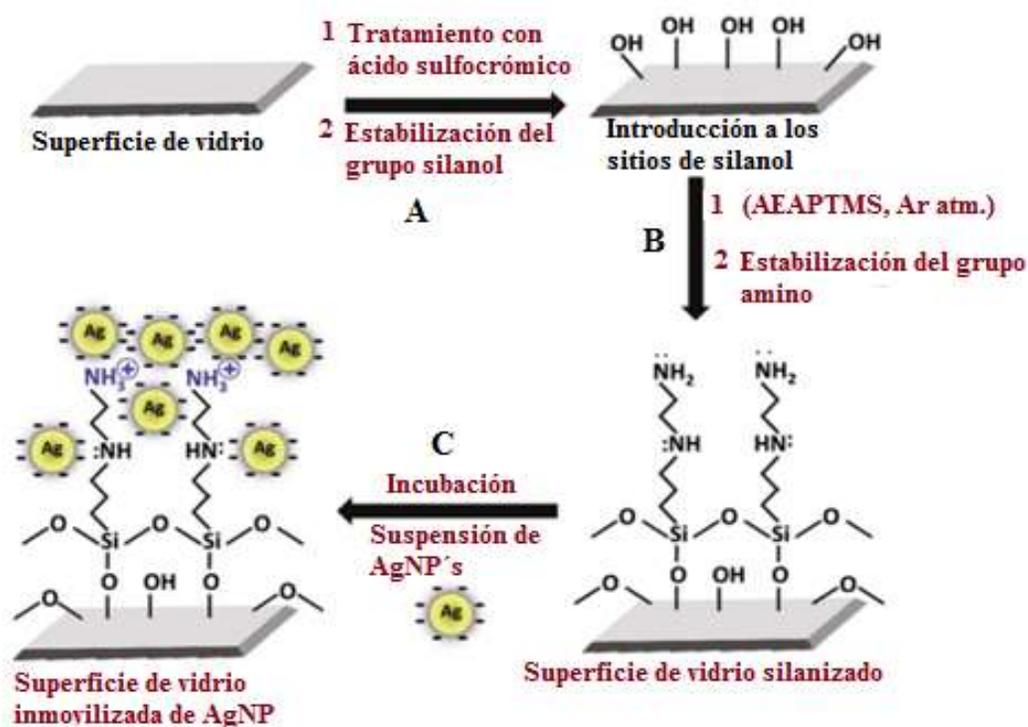


Figura 5. Representación del procedimiento de silanización, seguido de la inmovilización de AgNPs en la superficie de vidrio funcionalizada con amina. (A) Se generaron sitios adicionales de silanil (Si-OH) mediante tratamiento con ácido sulfocrómico y se estabilizaron a 120°C por 1.5 h bajo atmosfera de Argón. (B) Los sustratos se trataron con soluciones de 3-2aminoetilaminopropil trimetoxisilano (2% AEAPTMS, 30 min). (C) La inmovilización estuvo mediada por incubación el sustrato de vidrio fue funcionalizado con amina en una solución de AgNPs (Agnihotri et al., 2013).

Desde el exterior, la primera estructura encontrada por las nanopartículas de plata es la membrana externa, que está compuesta por proteínas y lípidos. La plata puede interactuar con las proteínas para formar complejos como donantes de electrones que contienen átomos de oxígeno, fósforo, nitrógeno o azufre, la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata puede ser bloqueada por agentes que contiene tiol. Se sabe que varias proteínas de la membrana bacteriana contienen azufre, por consecuencia la interacción química entre la plata y estas proteínas podría conducir a la inactivación de las enzimas y proteínas unidas a la membrana. Las bacterias responden al tratamiento con nanopartículas de plata de una manera similar a otras tensiones de membrana, expresan una serie de proteínas de la envoltura y constituyentes periplásmicos, que son responsables es proteger contra la entrada de sustancias extrañas o permitir la difusión pasiva de pequeñas moléculas a través de la membrana. Cuando la membrana no es completamente funcional, las proteínas que están en ella y los constituyentes periplásmicos se acumulan en el citoplasma y las nanopartículas de plata que atacan la membrana también pueden interferir con la cadena respiratoria y dificultar la producción de energía (Holt & Bard, 2005).

Los efectos de las nanopartículas de plata en la membrana podrían ser resultado de interacciones directas o indirectas, las nanopartículas de plata se adhieren a la membrana de la célula una vez que se han acumulado en la membrana causan anomalías estructurales denominados “huecos” fragmentando de esta manera la membrana caracterizada por la formación de picaduras en la superficie celular. La desestabilización de la membrana se observa en hongos, bacterias gram positivas y gram negativas en el tratamiento con concentraciones sub mili molares de plata, dependiendo de la extensión del daño de la membrana, las nanopartículas pueden incluso alcanzar el citoplasma e interactuar con proteína y enzimas que contienen azufre y elementos que contienen fósforo, como el ADN. Una vez en el citoplasma, las especies de plata pueden inducir la formación de ROS (Generación de especies reactivas de oxígeno), el daño a la membrana causado por las nanopartículas de plata es uno de sus efectos tóxicos más pronunciados y es al menos parcialmente responsable de la acción antimicrobiana (Chwalibog et al., 2010) (Radniecki, Stankus, Neigh, Nason, & Semprini, 2011).

2.11 Materiales utilizados en la síntesis de nanopartículas

Los nanomateriales se fabrican por diferentes métodos físicos y químicos pero debido a los altos requerimientos de energía, el complejo diseño instrumental, el elevado costo y el bajo rendimiento son algunos de los problemas curiales con el enfoque físico. La metodología de síntesis química es más económica y proporcionar un rendimiento con una técnica experimental sencilla, pero implica el uso de reactivos tóxicos y volátiles que son muy peligrosos y dañinos para el medio ambiente (Singh et al., 2020).

2.12 Inorgánicas

Para poder reducir el tamaño de las partículas en la molienda mecánica se aplicaba alta energía mecánica al material en polvo a granel con ayuda de unas bolas giratorias a alta velocidad. Las bolas pesadas de alta energía generan un movimiento libre sobre la superficie de una cámara que contiene el material en polvo a granel (Chung, Kim, Kim, Ji, & Seo, 2016). En el método de ablación por láser se utiliza la irradiación para reducir el tamaño de las partículas a nivel nano. El material objetivo sólido se coloca bajo una capa fina metálica, posteriormente se expone a irradiación láser pulsada, de esta manera se conduce a la fragmentación del material sólido en forma de nanopartículas (Dolgaev, Simakin, Voronov, Shafeev, & Bozon-Verduraz, 2002). El método de pulverización de iones incluye la vaporización de un sólido a través de la pulverización con un haz de iones de gas inerte a presiones muy bajas, voltaje elevado (Vanecht et al., 2012). Deposición física de vapor utiliza lantano, estroncio y cobalto; emplea la ablación por láser en el objetivo sólido, lo que causa formación de plasma (Park, Chung, Kim, & Kim, 2017).

La síntesis de nanopartículas a través del método sol-gel implica la mezcla de coloides metálicos (óxidos) preformados, mezcla directa de mata y óxido metálico o nanopartículas dentro de un sílice pre hidrolizado y un complejo del metal con la silicona y reducción del metal antes de la hidrolisis (Cushing, Kolesnichenko, & O'Connor, 2004). En el método de reducción química, se utiliza sal iónica la cual se reduce en un medio apropiado en presencia de surfactante utilizando diferentes agentes reductores, como el borohidruro de sodio, glucosa, etilenglicol, etanol, citrato de sodio, hidrato de hidracina.

Método solvotérmico se utilizan productos químicos orgánicos como el metanol, etanol y poliol como disolventes para la pirolisis por pulverización se emplean precursores como el acetato, nitrato y cloruro (Komarneni, 2003).

La síntesis de nanopartículas metálicas ha aumentado enormemente en diferentes campos como la ciencia de los materiales, la física, la química y la biomedicina. Aunque se han desarrollado con éxito diversos métodos para síntesis se necesitan más técnicas precisas para superar las limitaciones de los métodos existentes, de esta manera generar una alternativa en la que se reduzca la exposición a solventes y la contaminación al medio ambiente. (Jamkhande, Ghule, Bamer, & Kalaskar, 2019).

2.13 Orgánicas

EL término “nanotecnología verde” es capaz de transformar una serie de aplicaciones y procesos generales en rutas más respetuosas con el medio ambiente utilizando nanomateriales incorporando métodos de ahorro de recursos, energía y sustitución de sustancias tóxicas. Existen varios sistemas y métodos para la síntesis verde de nanopartículas, se pueden realizar a partir de enzimas, vitaminas, métodos biológicos, plantas y fitoquímicos (Ciambelli, La Guardia, & Vitale, 2019). Extracto de *Opuntia ficus-indica* para AuNPs (Alvarez-Bayona, Cortez-Valadez, Martínez-Suárez, Cruz-Rivera, & Flores-Acosta, 2019), *Aloe vera* e *Hibiscus subdariffa* (Bandeira, Giovanela, Roesch-Ely, Devine, & da Silva Crespo, 2020), extracto de *Eucalyptus spp* (Chauhan, Kataria, & Garg, 2020) para la síntesis de NPs de óxido de zinc, extracto de chile jalapeño para síntesis de AgNPs (Luna-Sánchez, Jiménez-Pérez, et al., 2019), extracto de *Bixa Orellana* para NPs TiO₂ (Maurya, Singh, Senapati, Srivastava, & Bahadur, 2019).

2.14 Síntesis verde

El campo de la nanociencia y la nanotecnología está creciendo de manera elevada por sus aplicaciones en diversos campos. En los métodos antiguos, las nanopartículas son sintetizadas y estabilizadas por los agentes estabilizantes para evitar la agregación. Hoy en día la síntesis verde se utiliza para sintetizar nanopartículas en las que las biomoléculas

pueden actuar a la vez como agentes reductores y estabilizantes, comúnmente se utilizan extractos, microorganismos y enzimas para sintetizar nanopartículas en química verde (Muthuvinothini & Stella, 2019). Para superar las dificultades generadas por los métodos convencionales es importante encontrar un método alternativo ecológico, sencillo y económico para síntesis de NPs. Los microorganismos y las plantas son recursos biológicos reproducibles no tóxicos, seguros para el ser humano y el medio ambiente, así mismo pueden ser la alternativa más apropiada para la síntesis a los métodos físicos o químicos. Recientemente se ha informado de la existencia de hongos, bacterias y plantas como agentes reductores en la biosíntesis de nanopartículas (Gomathi et al., 2020).

La nanotecnología verde se refiere al uso de la nanotecnología para mejorar la sostenibilidad ambiental de los procesos con el fin de minimizar los costos y los riesgos ambientales potenciales de las externalidades negativas producidas por la creación de subproductos ambientalmente dañinos o nanoestructuras sintéticas. También se refiere al uso de los productos de la nanotecnología para mejorar la sostenibilidad, la nanotecnología verde representa un nuevo esfuerzo por parte de los investigadores para ampliar la capacidad de la naturaleza para eliminar o disminuir los riesgos ambientales causados por el uso de nanomateriales y para alentar el reemplazo de productos existentes con nuevos nanoprodutos que son más respetuosos con el medio ambiente a lo largo de su vida útil (Nasrollahzadeh, Sajjadi, Sajadi, & Issaabadi, 2019).

La síntesis de NP con extractos de plantas se lleva a cabo de forma generalizada y se conocen como métodos ecológicos, por lo regular se utiliza agua como disolvente ecológico. Los compuestos orgánicos (alcaloides, flavonoide, taninos, esteroides, glucósidos y bencenoides) que se encuentran en los extractos de plantas de origen natural se utilizan en estos métodos ecológicos. Los extractos de plantas poseen propiedades biológicas intrínsecas: antihiper glucémicas, antioxidantes, antimutagénicas, antimicóticas, antiinflamatorias, antivirales y antibacterianas) que pueden manifestarse en las actividades biológicas de la solución coloidal final que contiene nanopartículas (Orlowski et al., 2018).

Aunque el uso de extractos de plantas en la síntesis de NP ofrece la posibilidad de preparar nuevos bio conjugados, el problema que surge en este punto es la variación de forma y el tamaño de las NPs sintetizadas. Los reactivos que si utilizan habitualmente en la síntesis

verde son de origen natural, lo que significa que el extracto es una mezcla de muchos compuestos activos en diferentes etapas de la síntesis lo que da lugar a coloides poli dispersos, con una gran diversidad de formas. La purificación de los extractos de plantas es posible, pero complicada, costosa y a veces extremadamente difícil debido a la falta de homólogos sintéticos. La comparación de los resultados científicos obtenidos para los coloides poli dispersos es un verdadero desafío (Ranoszek-Soliwoda et al., 2019).

2.14.1 Thuja Orientalis

Es un género de árbol conífero de hoja perenne en la familia de cipreses Cupressaceae y se distribuye ampliamente en China, Japón y Corea (Zhang, Park, & Park, 2013). Sus hojas son brotes planos, similares a un abanico aplanado, contienen aceites esenciales utilizados para tratar hongos, infecciones, es útil como insecticida y un agente antihelmíntico. El aceite α -tujona derivado de las hojas es tóxico, el cual puede causar la muerte. Así mismo es utilizada como planta medicinal para tratar enfermedades de la piel, sangre, tracto gastrointestinal, riñón, cerebro y tumores (Srivastava, Kumar, Singh, & Singh, 2012).



Figura 6. Planta de *Thuja orientalis* utilizada para la infusión, actúa como precursor para la síntesis de AgNPs.

2.14.1.1 Composición

Las hojas de *Thuja orientalis* contienen rodoxantina, amentoflavona, hinokiflavona, quercetina, miricetina, caroteno, xantofilas y ácido ascórbico. Mientras que el aceite de planta contiene α -pineno, α -cedrol, limoneno como principales componentes (Srivastava et al., 2012).

2.14.1.2 Propiedades

Thuja se utiliza internamente en el tratamiento de la tos, hemorragias, menstruación excesiva, bronquitis, asma, infecciones cutáneas, paperas, disentería bacteriana, dolores artríticos y la insensatez prematura. Las hojas son antipiréticas, astringentes, diuréticas, emolientes, expectóreas. La semilla es lenitivo y sedante, se utiliza en el tratamiento de palpitaciones, insomnio, trastornos nerviosos o estreñimiento en adultos mayores. La corteza se utiliza en el tratamiento de quemaduras, los tallos se utilizan en el tratamiento de la tos, el resfriado, el reumatismo y enfermedades cutáneas parasitarias (Srivastava et al., 2012).

2.14.1.3 Aplicaciones

Las plantas y sus aceites son potencialmente útiles como fuente antimicrobiana, contiene altas cantidades de tres sustancias (alfa, beta y gamma thujaplicin) que en baja concentración serviría como quelante para *Salmonella typhimurium*. Se ha comprobado que los aceites esenciales de *Thuja* exhiben un cierto grado de actividad antifúngica contra seis cepas de hongos patógenos para el ser humano, así mismo se ha evaluado la actividad larvicida donde el aceite de *Thuja* fue más alto en comparación con el aceite de tallo, fruto y semillas. De igual manera se ha registrado una inhibición de la 5 α -reductasa los inhibidores se usan como principio activo del tratamiento terapéutico de enfermedades causadas por la actividad excesiva de dicha enzima la cual, promueve la calvicie masculina, hirsutismo, acné y cáncer de próstata (Srivastava et al., 2012).

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente ha crecido el interés en el desarrollo de formulaciones de películas para su aplicación en alimentos utilizando polímeros biodegradables naturales, debido a que los plásticos sintéticos causan problemas ambientales y sociales. En este sentido la gelatina debido a su bajo costo de producción, biodegradabilidad y excelentes propiedades de formar películas la han convertido en una opción potencial como polímero natural para elaborar películas. Lamentablemente, su naturaleza higroscópica limita sus aplicaciones en alimentos con alto contenido de humedad (Liu, 2017). Los efectos de la introducción de otros componentes en las películas de gelatina han sido estudiados para superar las restricciones en la aplicación o bien para mejorar propiedades de esta proteína.

La Nanotecnología tiene relevancia en diferentes áreas de la agroalimentación, incluida la agricultura, acuicultura, producción, procesamiento, envasado, seguridad y nutrición. Aunque en la literatura científica existe incertidumbre sobre los aspectos de seguridad alimentaria por el uso de nanomateriales debido a los posibles riesgos de la salud, los resultados identifican oportunidades en las técnicas de agricultura, envases innovadores e ingredientes funcionales. Esto se traduce en alimentos más seguros, reducción de residuos y aumento en la vida útil de los productos. Por lo tanto, un marco regulador sólido se considera, un medio importante para que los consumidores confíen en la nanotecnología y en el aumento de su aceptación, es vital proporcionar información clara y equilibrada para proporcionar mayor control ya que se puede hacer una elección informada sobre los productos que están consumiendo (Handford et al., 2015).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata a partir de la infusión de *Thuja orientalis* para ser incorporadas en películas a base de gelatina y evaluar su capacidad antimicrobiana.

4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar el protocolo de síntesis de nanopartículas de plata
- Caracterizar la infusión de *Thuja orientalis* en sus propiedades moleculares por medio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier FT-IR
- Caracterizar las nanopartículas de plata en sus propiedades moleculares con UV-Visible
- Detectar la presencia y concentración de plata por medio de absorción atómica
- Identificar los grupos funcionales durante y al finalizar la síntesis de nanopartículas por FT-IR
- Determinar el tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS) y el potencial zeta de las NPs por dispersión de luz electroforética (DLE)
- Desarrollar el protocolo de elaboración de películas a partir de gelatina con nanopartículas de plata
- Evaluar propiedades antimicrobianas de las películas por la técnica de difusión en placa
- Analizar las propiedades térmicas como temperatura de fusión y entalpía a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC)
- Estudiar la composición molecular de las diferentes formulaciones de películas a través de FT-IR
- Determinar el color de las películas por la escala de CieLab

5 HIPÓTESIS

La síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) es posible mediante el uso de la *Thuja orientalis* para obtener un efecto antimicrobiano al adicionarlas en películas de gelatina.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección de la planta

Se recolectaron hojas frescas del campus de la Universidad Tecnológica de Tulancingo (Tulancingo de Bravo, México). Los principales parámetros a considerar para la recolección son: hojas jóvenes, color verde, sin evidencia de plagas o enfermedades. Las hojas se lavaron con agua de grifo y después con agua destilada para eliminar la suciedad.

6.1.1 Obtención del extracto

Se pesaron 1.5 g de hojas sin tallo y se colocaron en un matraz con 100 mL de agua desionizada y se llevó a una temperatura de 80-85°C por 10 minutos, la boca del matraz se tapó con papel parafilm para evitar pérdida por evaporación, una vez transcurrido el tiempo la infusión se dejó enfriar por 10 minutos. La infusión se filtró con ayuda de un papel filtro y se almacenó en recipientes evitando la exposición a la luz.

6.1.2 Síntesis de Nanopartículas de plata (AgNPs)

La síntesis de NPs se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Hernández y colaboradores (Hernández & Arenas, 2016) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de AgNO₃ a 20 ppm (20 µL) en 10 mL de agua desionizada. La síntesis se realizó con 100 mL del extracto de *Thuja orientalis* a una temperatura de 80°C con agitación constante agregando 2 mL de la solución previamente preparada de AgNO₃ cada diez minutos gota a gota, completando la síntesis dentro de los 60 minutos. Una vez terminada la síntesis, la muestra se colocó en un frasco ámbar y en refrigeración para su posterior análisis.

6.1.3 Espectroscopía UV-Vis

El análisis espectroscópico UV-Visible se efectuó por la metodología de Abdullah y colaboradores (2020) con algunas modificaciones, en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin

Elmer Lambda 45 y se evaluó a una longitud de onda de 200 a 700 nm para cada muestra. La energía absorbida por las moléculas se verá reflejada a través de plasmones de resonancia superficial.

6.1.4 Absorción Atómica

Se detectó el elemento plata por el método de llama por absorción, con algunas modificaciones (Ghasemi & Ramezani, 2019), con una lámpara de cátodo hueco Ag Perkin Elmer, Lumina. Tipo de llama: Aire/Acetileno, espectrómetro Perkin Elmer Atomic A Analyst 200, MA USA. Se prepararon estándares de Ag en una suspensión de HNO₃ al 2% a concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ppm para realizar la curva de calibración en el espectrómetro. Posteriormente se realizó la lectura de las muestras, la cuantificación del analito se representa en mg/L de plata.

6.1.5 Espectroscopia FTIR

Se llevó a cabo por la técnica descrita por Hernández y colaboradores (Hernández & Arenas, 2016). Los espectros se obtuvieron del equipo Frontier FTIR Perkin Elmer, MA USA equipado con reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Se trabajó en un intervalo de medición de 400 a 4000 cm⁻¹ y temperatura ambiente.

6.1.6 Tamaño de partícula y Potencial zeta

El radio hidrodinámico y potencial zeta se determinaron por la técnica de Zambrano-Zaragoza y colaboradores (2014) con algunas modificaciones. Las pruebas se realizaron por triplicado utilizando un Zetasizer Nano Malvern S90 WR United Kingdom. El dispersante utilizado fue agua a 25°C. El equipo se calibró antes de iniciar la prueba

6.2 Caracterización de las películas

Para la elaboración de películas se utilizó gelatina Wilson PS malla 30 con 275°B, solución coloidal de nanopartículas de plata (AgNPs) previamente sintetizadas, glicerol y agua destilada.

6.2.1 Elaboración de películas a base de gelatina con nanopartículas de plata (AgNPs)

Se prepararon soluciones filmogénicas a partir de gelatina, AgNPs, glicerol y agua destilada siguiendo las formulaciones de la tabla 1. Es importante señalar que se diluyó primero el glicerol con 20 mL de agua destilada, posteriormente se transfirió a un dispersor de la marca POLYTRON® System (modelo PT2100) se adicionó el resto de agua destilada o de solución coloidal de AgNPs según corresponda la formulación, la solución filmogénica fue calentada a 60°C y se adicionó la gelatina lentamente homogenizando la solución a 125 rpm durante 10 minutos.

Se tomaron 60 mL de cada solución filmogénica y se vertieron en cajas petri de 23 cm de diámetro, las cuales se colocaron en un horno de secado de control digital (Felisa) a una temperatura de 25°C por 72 horas aproximadamente, las películas formadas fueron retiradas del horno se almacenaron a temperatura ambiente en un espacio sin exposición a la luz para evitar la alteración de las NPs.

Tabla 1 Formulaciones de las películas

Clave	Agua destilada (mL)	AgNP (mL)	Gelatina (g)	Glicerol (mL)
G180	0	180	4	2
G90	90	90	4	2
G45	135	45	4	2
G22	157.5	22.5	4	2
G0	180	0	4	2

6.2.2 Acondicionamiento de las películas

Previo a los análisis de las películas, éstas se acondicionaron por 7 días en un desecador conteniendo P_2O_5 transcurrido este tiempo se transfirieron a un contenedor que contenía una solución saturada de K_2CO_3 para mantener una humedad relativa (H.R) de 44% por 7 días.

6.2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La estabilidad térmica de las películas fue analizada por medio de un equipo DSC serie Q2000 instrumentos TA equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado RCS90 y el software de análisis universal TA2000. El equipo fue calibrado previamente usando Indio como metal estándar, las mediciones se efectuaron al mismo tiempo que las muestras se purgaban constantemente con nitrógeno de alta pureza a un flujo de 50 mL/min. Las muestras previamente acondicionadas (G180, G90, G45, G22 y G) fueron pesadas (1 ± 0.3 mg) dentro de charolas de aluminio (Instrumentos TA) selladas herméticamente y escaneadas en un intervalo de 20°C a 200°C con una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Como referencia una charola de aluminio vacía y sellada herméticamente fue utilizada. Tanto el valor de T_m como el de ΔH , fueron determinados por el software en base a los cambios endotérmicos registrados en el termograma.



Figura 7. Equipo DSC serie Q2000 instrumentos TA.

6.2.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

Los espectros de absorción por la técnica de FT-IR a partir de las muestras: G180, G90, G45, G22 y G fueron obtenidos por el equipo Frontier FT-MIR (Perkin Elmer) equipado con reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Se trabajó en un intervalo de medición de 400 a 4,000 cm^{-1} y a temperatura ambiente. Se realizaron 3,260 lecturas de las señales automáticas recolectadas a una resolución de 1cm^{-1} y digitalizadas con el software spectrum 10.



Figura 8. Espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum UATR Two.

6.2.5 Actividad antibacteriana

Para la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en placa, se empleó la cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativa (*Salmonella typhimurium*) como agentes patógenos de prueba. Estos microorganismos se inocularon en caldo nutritivo, para luego incubarlos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Los inóculos obtenidos se ajustaron con respecto al equivalente de McFarland que es de 1.5×10^8 ufc/ml, se tomó 0.1 mL de medio con esta concentración de bacteria con el fin de dispersar por estría masiva en cajas Petri de plástico 90 x 15 mm con agar Müeller-Hinton. A continuación, las diferentes formulaciones películas se cortaron en discos de 6 mm con

una perforadora. Posteriormente los discos fueron colocados en las cajas ya rotuladas para finalmente llevarlas a incubación a $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Es importante destacar que todos los discos de las muestras fueron sometidos a luz UV durante 20 minutos para su esterilización. El efecto inhibidor se determinó midiendo las zonas de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos.

6.2.6 Color

Se determinó color en las películas en la escala CieLab por medio de un colorímetro marca KONICA MINOLTA, modelo CR-400/410.

6.2.7 Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con análisis de varianza (ANOVA). Comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$), con una confiabilidad del 95%. El proceso de los datos se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics v20.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas

En esta sección se presentan y discuten los resultados obtenidos en la síntesis de AgNPs con *Thuja orientalis*. Los tratamientos se identifican de acuerdo al desarrollo de la síntesis de las NPs con las siguientes claves: 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min y 50 min. En cada tiempo se tomaron alícuotas de 10 mL para dar seguimiento a la formación y caracterización de las NPs.

7.1.1 Espectroscopia UV-Vis

En la figura 9 se observa un cambio de color en la infusión durante la síntesis de nanopartículas en función de la adición de AgNO_3 de una solución clara ligeramente verde a un color ámbar, color característico de la formación de AgNPs. Para corroborar dicha formación se realizó espectrofotometría UV-Vis de 300 a 700 nm. En la figura 10 se muestran los espectros de absorción UV-Vis de síntesis durante 50 minutos. Los espectros muestran bandas en forma de campana a medida que la reacción progresaba, se observó una absorción mayor en el tiempo de 50 minutos. Este fue el mejor tratamiento debido a que exhibió la mayor absorción a 424 nm aproximadamente. Este valor fue mayor que el encontrado por Liang y colaboradores (2019) donde detectaron un plasmón de resonancia superficial (PRS) alrededor de los 397 nm. Esta diferencia podría atribuirse al empleo de otra metodología en este caso la reducción química, donde la glucosa actuó como agente reductor y la polivinilpirrolidona (PVP) como agente dispersor. Por la misma vía de síntesis Kaur y colaboradores (2018) obtuvieron un PRS en torno a los 400 nm el cual se podría asociar a la formación de AgNPs en presencia de diferentes agentes como el trisodio-citrato y la polivinilpirrolidona además, las NPs fueron funcionalizadas con diferentes concentraciones de antibiótico (vancomicina). Rahman y colaboradores (2019) utilizaron la síntesis verde, misma que se utilizó en la presente investigación, pero usando la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* como reductor y AgNO_3 como precursor, obteniendo un PRS a 425 nm como se puede notar este resultado es muy similar al encontrado en este trabajo. Las bandas de absorción en forma de campana y a una longitud de onda máxima alrededor de 400 nm podrían ser indicativas de la forma esférica de las NPs y también se podría asociar a la reducción de Ag^{+1} a Ag^0 (Pedroza-Toscano et al., 2017).



Figura 9. Diferencia de color en el extracto antes y después de la síntesis. a) Extracto de *Thuja orientalis* b) Terminó de la síntesis 50 min, color ámbar.

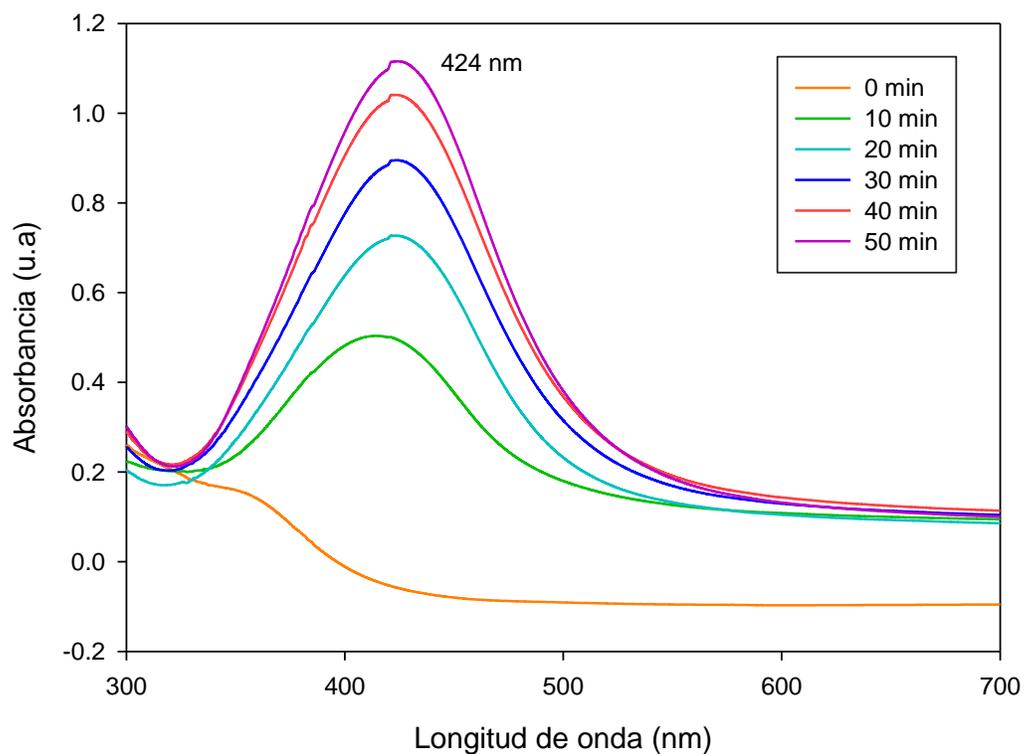


Figura 10. Espectros de absorción UV-Visible de AgNPs, tomados en diferentes intervalos de tiempo con respecto a la síntesis. Muestra el plasmón de resonancia superficial a 424 nm.

7.1.2 Espectroscopia de Absorción Atómica

En la figura 11 se muestra la concentración de plata con respecto al tiempo de síntesis. Se registraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos estudiados. En el tiempo 0 min, se registró la más baja concentración de plata con un valor de 3.883 ± 0.0037 mg/L. Por el contrario, la concentración más alta se obtuvo en el tratamiento de 50 min reportando 15.698 ± 0.312 mg/L. Esta última concentración resultó mayor que los encontrados por Gruszka y colaboradores (2018) donde determinaron la concentración de plata en NPs con diferente tamaño, correspondiendo una concentración de $14.5 \mu\text{g/L}$ con un tamaño de NPs de 60 nm. Esta diferencia se puede atribuir a la influencia de los agentes estabilizadores que utilizaron en su investigación. Los resultados de la presente investigación son similares a los reportados por Sharma y colaboradores (2014) quienes sintetizaron AgNPs por vía verde empleando el extracto de *Myristica fragrans* (nutmeg). En su estudio, inicialmente se preparó una solución estándar de 5.5 p.p.m. de AgNO_3 posteriormente se añadió el extracto y se evaluó la concentración de iones Ag^{+1} en la solución de reacción, la cual fue monitoreada a intervalos regulares. El tratamiento de 0 min registró una concentración de 5.5 p.p.m. de Ag^{+1} , no obstante, en el tratamiento de 12 min se reportó una concentración de 0.06 p.p.m. de Ag^{+1} indicando la conversión de Ag^{+1} a Ag^0 . Esta conversión se puede atribuir a las entalpías de formación, es decir, la ruptura de los enlaces químicos de los elementos del AgNO_3 y la formación de nuevos enlaces para crear el ion de plata Ag^0 (Kirmanidou et al., 2019).

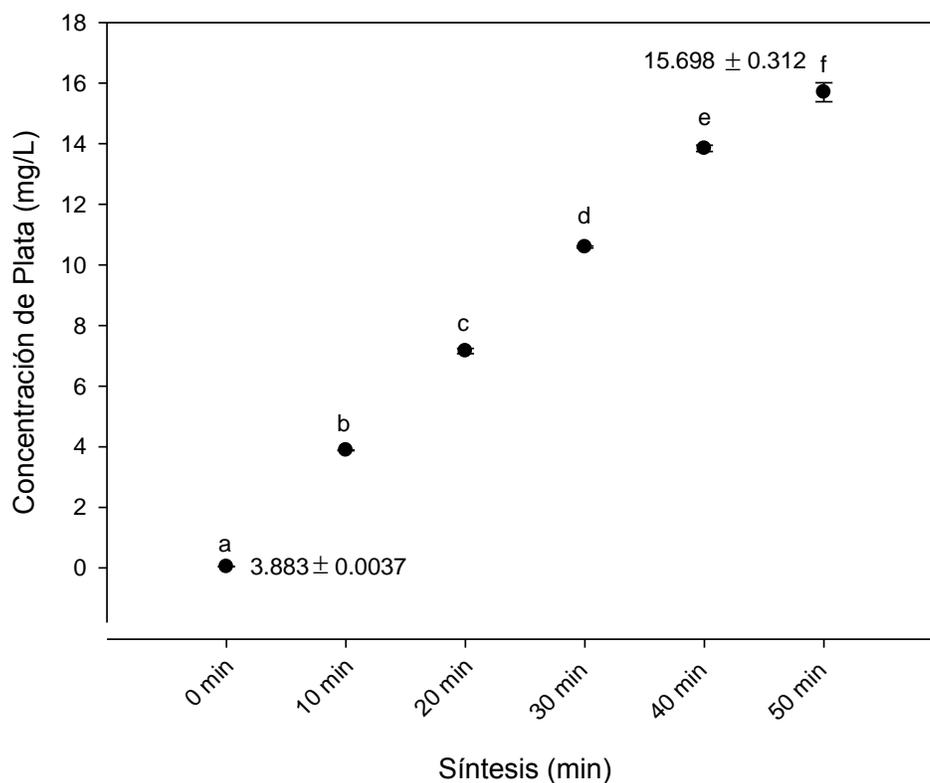


Figura 11. Espectroscopia por Absorción Atómica muestra el aumento de la concentración de plata con respecto al tiempo de adición de AgNO_3 en la síntesis de NPs. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza ($p < 0.05$). ANOVA de una sola vía, comparación de medias por Tukey.

7.1.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de FTIR se han utilizado para identificar los grupos funcionales de los componentes presentes en el extracto de *Thuja orinetalis*, los cuales se muestran en figura 12. Se observa una banda ancha a 3335 cm^{-1} Luna-Sánchez y colaboradores (2019) refieren que bandas comprendidas entre $3709\text{--}2803\text{ cm}^{-1}$ podrían estar relacionadas con el estiramiento simétrico de R—O—H, López-Millán y colaboradores (2019) reportaron una banda similar a esta investigación en 2932 cm^{-1} la cual podría asignarse a las vibraciones de estiramiento de C-H, una banda a 2854 cm^{-1} podría asociarse al estiramiento del OH (Devi, Das, & Deka, 2017). En 2314 cm^{-1} se detectó una banda que podría atribuirse al enlace O=C-OH (Hernández & Arenas, 2016). Rehab-Ali y colaboradores (2019) reportan bandas similares en 1730 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} que podrían asociarse a los enlaces C=O y C—C=C, respectivamente. Bandas entre 1459 cm^{-1} y 1641 cm^{-1} han sido reportadas por (Dada et al., 2019) las cuales probablemente se relacionan al enlace C=C, 1078 cm^{-1} y 1023 cm^{-1} podrían asignarse al enlace C-OH y al modo flexión C-O-C respectivamente (López-Millán et al., 2019). En la figura 13 se muestran los espectros con respecto al tiempo de síntesis de NPs, bandas comprendidas entre 3709 a 2803 cm^{-1} y se relacionan con el estiramiento simétrico de R—O—H, bandas en la misma región podrían asociarse con aminas primarias o secundarias (Luna-Sánchez, Pérez, et al., 2019). En comparación con el espectro de la infusión, se encontraron bandas con menor intensidad en 2305 cm^{-1} que podrían ser atribuidas al enlace O=C (Hernández & Arenas, 2016). La banda comprendida a 2066 cm^{-1} se podría otorgar a la banda —CH— (Dada et al., 2019), 1633 cm^{-1} podría ser correspondiente al estiramiento de la amida C=O (Malini et al., 2020), 1395 cm^{-1} se detecta la posible presencia de la amina aromática —C-N— (V. Sharma et al., 2019) y una banda a 1058 cm^{-1} podría designarse al estiramiento del —C—OH (Devi, Das, & Deka, 2019).

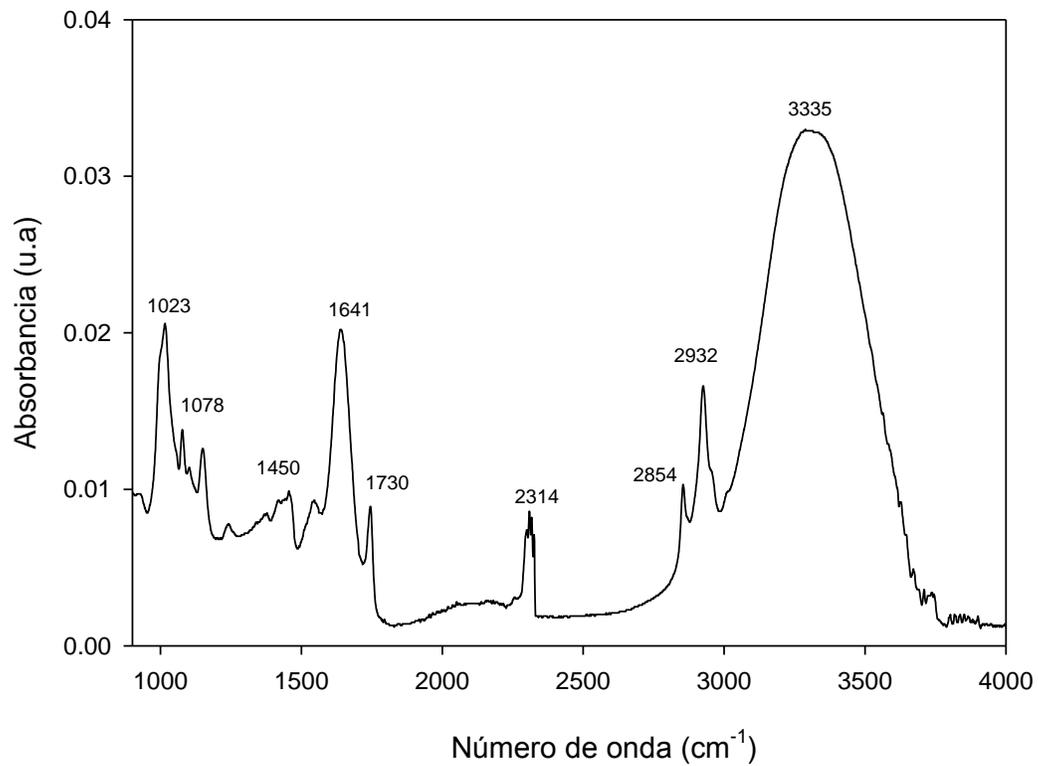


Figura 12. Espectro del extracto de *Thuja orientalis* muestra los grupos funcionales característicos de la planta.

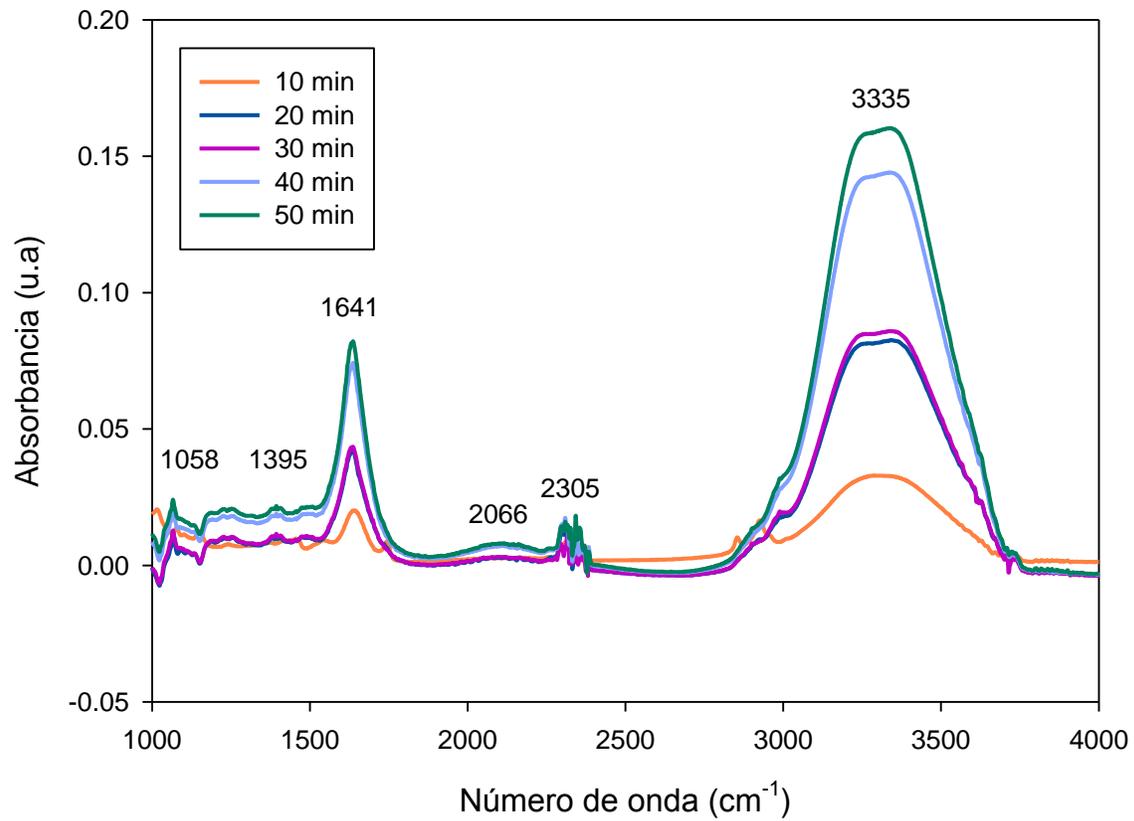


Figura 13. Espectros respecto al tiempo de síntesis, la diferencia que tiene cada tiempo representa la intensidad de picos conforme avanza la síntesis.

7.1.4 Tamaño de partícula por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica se emplea para cuantificar la distribución del tamaño de partículas en suspensión o en emulsiones coloidales a través del movimiento browniano (Babick, 2020). Como se muestra en la figura 14, se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). En el tratamiento 0 min, se registró un tamaño de partículas de 259.81 nm, al finalizar la síntesis el tratamiento de 50 min obtuvo nanopartículas de 86.82 nm mostrando una reducción notable del tamaño. La línea punteada hace referencia al rango “nano” considerando que los materiales que comprenden un tamaño de 1 a 100 nm son denominados nanométricos (Richard Olawoyin, 2018). Varadavenkatesan y colaboradores (2019) sintetizaron AgNPs por vía verde utilizando extracto de *Clitoria ternatea*, reportando un tamaño de 62.51 nm. Por la misma metodología Ravichandran y colaboradores (2019) sintetizaron AgNPs registrando un tamaño de 155.3 nm empleando el extracto de *Parkia speciosa*. Adebayo-Tayo y colaboradores (2019) reportaron un valor mayor con respecto al presente trabajo, NPs de 558.1 nm utilizando el alga verde-azul *Oscillatoria sp.* La variación del tamaño con respecto a la presente investigación podría atribuirse a diversos factores tales como, el agente reductor utilizado, el tiempo y temperatura de síntesis. Lo cual se refleja en el tamaño final de las NPs. Previos estudios, estabilizaron AgNPs con colágeno en combinación con polímeros naturales obteniendo tamaños que oscilan de 15.82 nm a 46.41 nm (Nogueira et al., 2019). El uso de estabilizadores pudo generar cambios en las características de las NPs evidenciando la disminución de tamaño. Los primeros 4 tratamientos fueron deficientes debido a que el tamaño que presentan no se considera nanométrico. Sin embargo, el tratamiento de 50 min fue eficiente en virtud de que durante el desarrollo de la síntesis se logró la reducción del tamaño de las NPs de tal manera que se puede considerar “nano”.

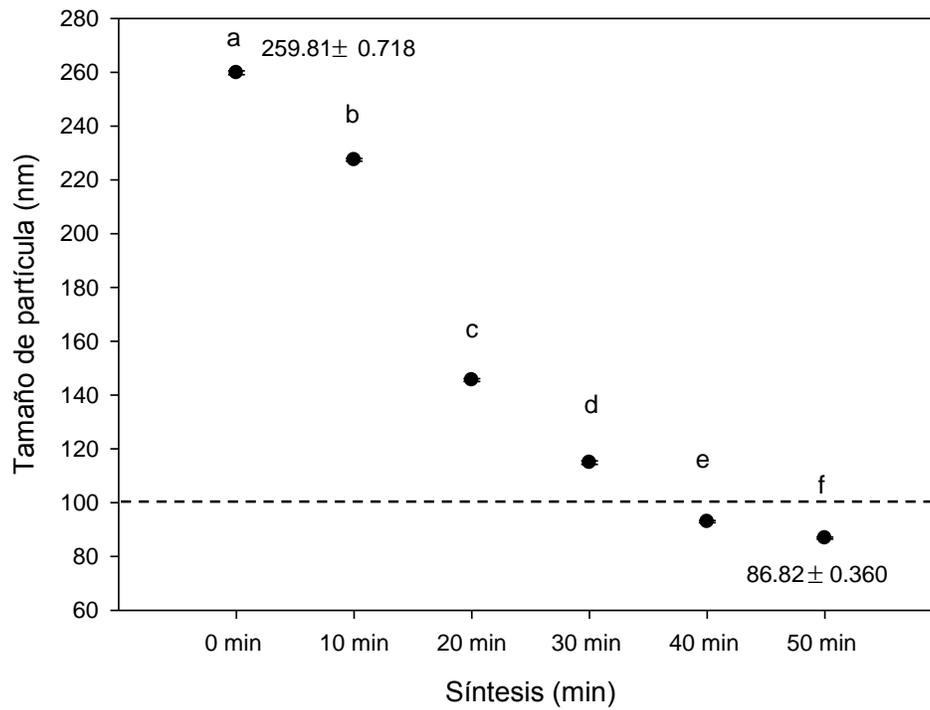


Figura 14. Tamaño de las NPs por DLS en función del tiempo de síntesis. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). ANOVA de una sola vía, comparación de medias por Tukey.

7.1.5 Potencial zeta por Dispersión de Luz Electroforética

El análisis de potencial zeta de las AgNPs sintetizadas se muestra en la figura 15. El valor de potencial zeta fue de -19.6 mV. Este valor fue menor que el encontrado por Varadavenkatesan y colaboradores (2019) quienes reportaron un valor de -24.5 mV al sintetizar AgNPs utilizando el extracto de *Thunbergia grandiflora*. En un estudio similar pero empleando el extracto de *Clitoria Ternatea*, Vardavekatesan y colaboradores (2019) obtuvieron un valor de -24.6 mV. Los resultados anteriormente mencionados y el de la presente investigación coinciden en que el potencial zeta presenta un valor negativo. Esto podría atribuirse a la formación de unas capas de biomoléculas presentes en los extractos utilizados que recubre a las NPs. Así mismo, las fuerzas de repulsión entre las partículas cargadas negativamente podrían evitar la coalescencia o aglomeración lo cual se refleja en un aumento de la estabilidad de las NPs (Ajitha et al., 2015; Vinayagam, Varadavenkatesan, & Selvaraj, 2018). En una investigación previa al sintetizar AgNPs pero estabilizadas con cisteína, se registró un valor de +44 mV a un pH de 4 y de -52 mV a un pH de 9. Así mismo, se detectó un incremento en el potencial zeta mejorando la estabilidad de las NPs (Oćwieja & Morga, 2019). La estabilidad de las NPs fue mejorando en relación al tiempo de síntesis siendo el mejor tratamiento 50 min, exhibiendo una distribución unimodal con respecto a los demás tratamientos generando de esta manera una carga representativa que se ve reflejada al retardar su coalescencia.

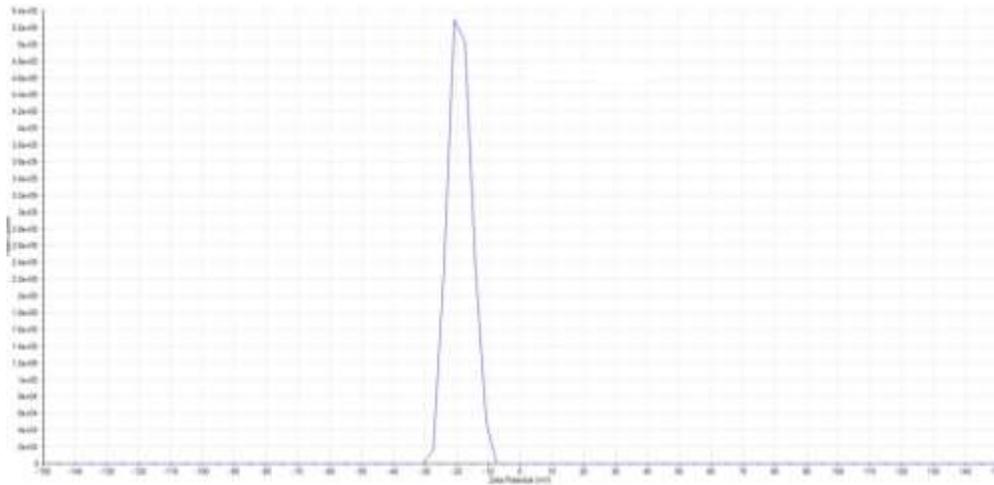


Figura 15. Potencial zeta de las AgNPs a 25 °C. Se muestra únicamente el gráfico del tratamiento de 50 min en virtud a la obtención del tamaño nanométrico registrado anteriormente en el apartado 7.1.4.

7.2 Desempeño de las películas de gelatina adicionadas con AgNPs

En esta sección se discuten los resultados provenientes de las películas de gelatina adicionadas con las nanopartículas de plata.

7.2.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en películas

La tabla 2 muestra las propiedades térmicas de las películas de gelatina adicionadas con AgNP. Todas las muestras de las películas exhibieron una temperatura de transición vítrea (T_g) y una temperatura de fusión (T_m). La T_g es el inicio del movimiento segmentario en un polímero que pasa de un material duro y vítreo a un material blando y gomoso, lo que está relacionado con la cristalización y la movilidad molecular (M. S. Rahman, 2006). El tratamiento G0 exhibió un valor de T_g de 73.91°C . Este valor es mayor que los reportados por Theerawitayaart y colaboradores (2019) y que corresponde a 56.4°C . La T_g disminuyó con el aumento del contenido de AgNPs alcanzando 63.83°C para el tratamiento G180, resultados similares obtuvo Boughriba y colaboradores (2020), quienes mencionan que la disminución puede atribuirse a un estado de desorden entre moléculas de la gelatina o su estructura en forma de red. Además, valores de T_g más bajos están relacionados con la disminución de los enlaces hidrógeno inicialmente existentes en la película G. La gelatina es una mezcla heterogénea de polipéptidos de una o varias hebras, cada uno con conformaciones helicoidales de prolina que pueden formar películas con estructuras similares al colágeno físicamente reticuladas. Por lo tanto también se puede sugerir que esta estructura desnaturalizada puede reducir las interacciones en altas concentraciones (Mendieta-Taboada, Sobral, Carvalho, & Habitante, 2008). A partir de los 100°C , se puede detectar el inicio de otro evento térmico donde se observa la T_m . Este comportamiento indica que no se produce separación de fases entre el plastificante y la gelatina y que todas las películas son parcialmente cristalinas (Vanin, Sobral, Menegalli, Carvalho, & Habitante, 2005). Así mismo, se puede considerar que a partir de los 100°C se puede detectar otro evento térmico, asociado a la pirolisis del glicerol utilizado como plastificante (Shankar, Wang, & Rhim, 2019).

Considerando que la entalpía es la energía necesaria para desorganizar una estructura molecular, los resultados obtenidos sugieren que conforme incrementaba la concentración de AgNPs, la entalpía iba en aumento, siendo el mejor tratamiento G180 debido a que presentó una mayor entalpía con un valor de 2.031 J/g. Previos estudios (Kanmani & Rhim, 2014b) reportaron que la adición de AgNPs a la película de gelatina aumentó la estabilidad térmica. Esto podría atribuirse a que la plata metálica es más estable al calor. Por lo tanto, se puede deducir que el tratamiento G180 resultó con una mejor organización estructural en comparación con los demás tratamientos.

Tabla 2 Temperatura de transición vítrea y Temperatura de fusión de las películas de gelatina.

Tratamientos	T _g (°C)	ΔH (J/g)	T _m	ΔH (J/g)
G0	73.91	6.631	102.98	1.786
G22	73.68	6.587	102.87	1.921
G45	72.32	3.798	102.93	1.835
G90	67.24	1.954	103.14	1.368
G180	66.83	0.7614	103.22	2.031

7.2.2 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FT-IR)

La figura 16 muestra los espectros de FT-IR de la película de gelatina y las películas adicionadas con AgNPs, todos los tratamientos mostraron un perfil espectral similar, en el que se observaron los principales picos que incluían las bandas de la amida A, B, I, II y III.

En investigaciones previas se ha reportado que las bandas que se producen en el rango de 1600-1700 cm^{-1} corresponden a la amida I, lo que significa que la vibración de estiramiento C=O está asociada a la flexión NH y estiramiento del enlace C-N Moula y Ali (2019) la banda de la amida I de la presente investigación se situó en el número de onda de 1636 cm^{-1} . La vibración de la amida II puede localizarse alrededor de 1500-1600 cm^{-1} , la banda detectada a 1545 cm^{-1} podría indicar la frecuencia de las vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo C=O a lo largo del péptido (Kanmani & Rhim, 2014a). La amida III se situó en 1232 cm^{-1} puede deberse a la combinación de estiramiento C-N y deformación N-H que implica la complejidad de interacciones intermoleculares, así mismo, la relación de los enlaces hidrógeno involucrados en el mantenimiento de la estructura nativa (A. M. M. Ali, H. Kishimura, & S. Benjakul, 2018). La banda de la amida A fue localizada a 3297 cm^{-1} está asociada con las vibraciones de tensión del grupo NH y la banda de la amida B en 2954 cm^{-1} se podría asignar al estiramiento asimétrico del grupo CH₂ (León-López, Fuentes-Jiménez, Hernández-Fuentes, Campos-Montiel, & Aguirre-Álvarez, 2019). La banda en 1072 cm^{-1} se podría atribuir a las vibraciones de estiramiento de C-O y es característico del glicerol (Jamróz et al., 2018). Todos los espectros IR de las películas presentaron una diferencia, fue la intensidad de los picos en relación a la concentración de NPs, a mayor contenido los picos exhibían mayor intensidad y viceversa, los picos presentaron menor intensidad a menor contenido de NPs. No se observaron nuevos picos, lo que sugiere que no apareció ninguna formación de enlace químico entre la gelatina y las nanopartículas. La incorporación de las NPs no cambia la estructura de la gelatina, sin embargo la relación entre la gelatina y AgNPs podría atribuirse a las interacciones con enlaces hidrógeno o van der Waals (Shankar et al., 2019) esto se podría asociar con la intensidad de los picos de las diferentes formulaciones.

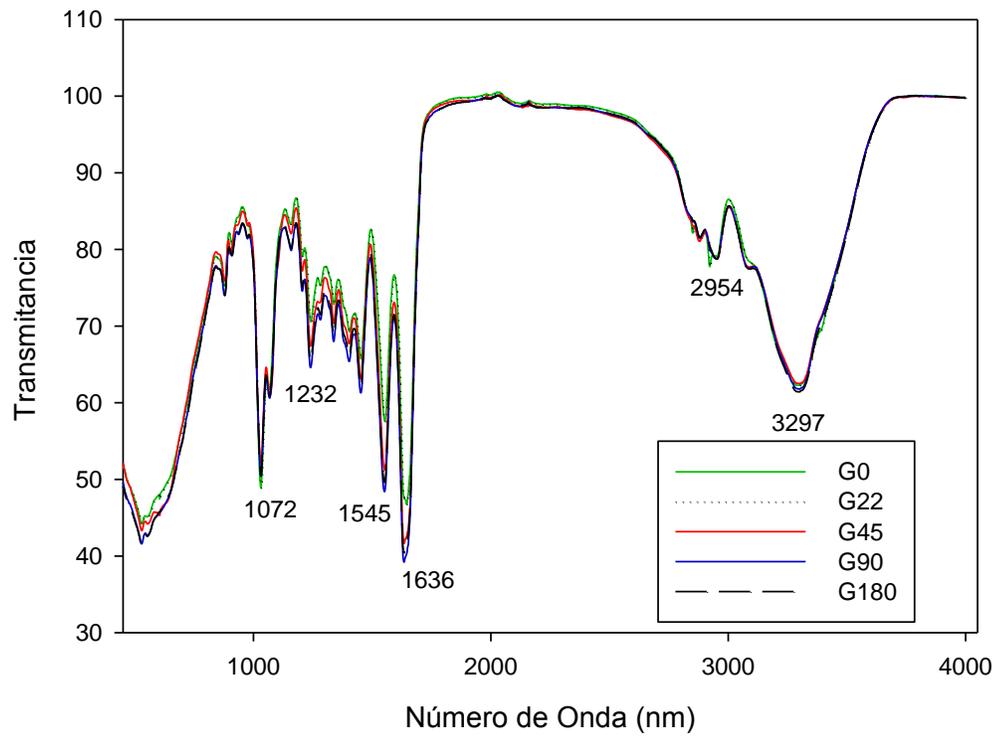


Figura 16. Espectros de las diferentes formulaciones de las películas, muestra los grupos característicos de la gelatina.

7.2.3 Actividad antimicrobiana en películas

Las propiedades antimicrobianas de las diferentes formulaciones de las películas con AgNPs fueron evaluados contra Gram negativo (*Salmonella typhimurium*) y Gram positivo (*Staphylococcus aureus*) para mostrar los halos de inhibición y su efecto antimicrobiano. Como se muestra en la figura 17a) ningún tratamiento de las películas presentó inhibición frente a *S. typhimurium*. De acuerdo con Jamróz y colaboradores (2019), las bacterias gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano 20-80 nm que consiste en cadenas de polisacáridos reticuladas por péptidos y que forman una matriz compleja. Esta estructura es muy difícil de penetrar para las NPs. Por el contrario, las bacterias gram negativas tienen una capa de péptidoglicanos de ~7-8 nm lo que facilita la entrada de las NPs. Sin embargo, en esta investigación se obtuvieron NPs de 86.82 nm lo cual dificulta la entrada o penetración de éstas hacia el interior de la bacteria. Con relación a los efectos de las NPs sobre los patógenos, entre más pequeño sea el tamaño de las AgNPs, pueden adherirse fácilmente a la superficie de la célula y con ello difundirse rápidamente a través de la membrana de los microorganismos provocando su muerte (Hajji et al., 2017). Por otro lado, la evaluación de las películas frente a *S. aureus* si presentaron halos de inhibición tal y como se muestra en la figura 17b). El tratamiento G0 no presentó inhibición, con respecto a las formulaciones restantes, a menor concentración de NPs mayor halo de inhibición fue observado. Los tratamientos con mayor concentración de AgNPs ejercieron menor efecto de inhibición, esto puede ser atribuido a que las AgNPs tienden a aglomerarse en la ausencia de algún agente tensoactivo (Hajji et al., 2017). Los mecanismos de inhibición de las NPs contra los microorganismos podrían estar asociados con la liberación de iones de plata que podrían penetrar a través de huecos o perforaciones a la membrana bacteriana. Así mismo, interactuar con grupos disulfuro o sulfhidrilo que posiblemente se adhieren a la pared celular cargada negativamente, lo que daría lugar a la interrupción de los procesos metabólicos o a la ruptura de la pared celular bacteriana causando la muerte celular (Arfat et al., 2017). Con base en estos resultados, se puede considerar que el mejor tratamiento fue el G22 debido a la efectividad de las NPs ya que exhibió una menor concentración de AgNPs pero con una mayor actividad antimicrobiana. Estos resultados sugieren que a mayor concentración de NPs, estas se pueden ver afectadas debido a la aglomeración de las mismas generando un

incremento de tamaño. Así mismo, dificultando la perforación de la pared celular de los microorganismos y por ende reduciendo la actividad antimicrobiana.

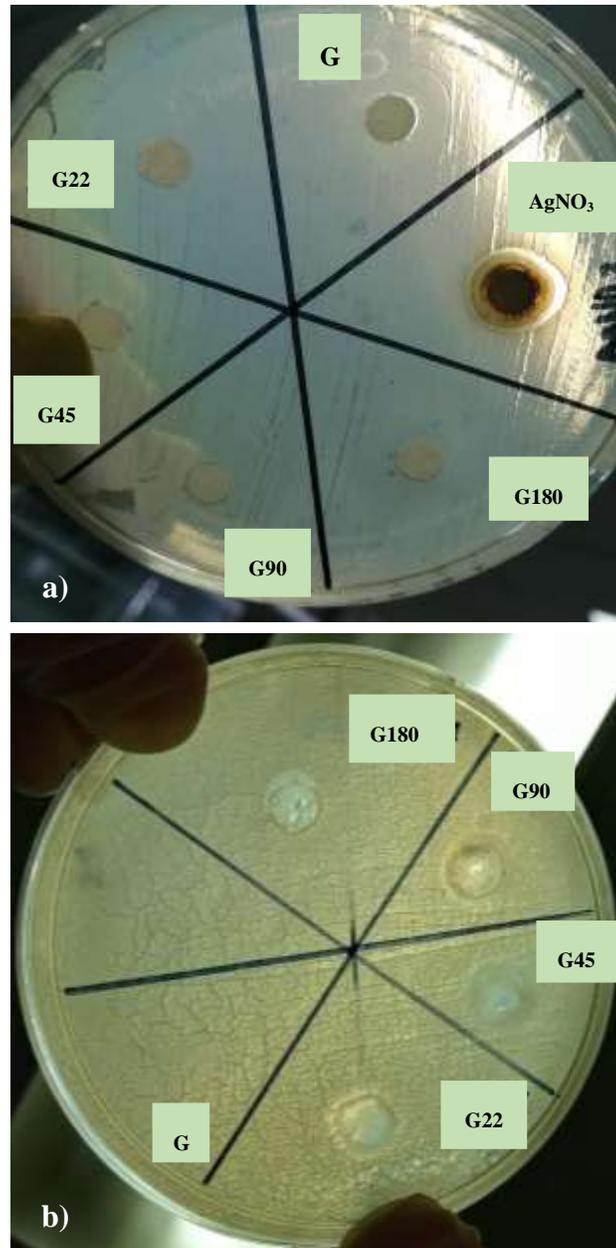


Figura 17. Efecto antimicrobiano de las películas contra a) *Salmonella typhimurium* con nulo efecto antimicrobiano y b) *Staphylococcus aureus* exhibiendo halos de inhibición.

7.2.4 Color de las películas

La diferencia total de color de las películas se muestra en la Tabla 3. Conforme disminuyó la concentración de NPs, las coordenadas a^* y b^* decrecieron de igual manera, no obstante, el parámetro L^* aumentó significativamente ($P \leq 0.05$). Pathare y colaboradores (2013) refieren que el parámetro a^* toma valores positivos para colores rojizos y valores negativos para los verdosos, mientras que b^* toma valores positivos para colores amarillentos y negativos para los azules. L^* es un valor aproximado de luminosidad, que es la adecuada según a la que cada color puede considerarse equivalente a un miembro de la escala de grises, entre el blanco y el negro. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación donde la coordenada a^* aumentó el valor de -0.206 a 1.223 mostrando tendencia hacia los colores rojizos, conforme la concentración de NPs aumentaba. Con respecto a la coordenada b^* los valores aumentaron de 1.883 a 17.1 exhibiendo una preferencia a los colores amarillos. Resultados previos por Jamróz y colaboradores (2019) coinciden en que el aumento de la concentración de las AgNPs en las películas de gelatina producen un aumento de color total, aumento de luminosidad y disminución de las coordenadas a^* y b^* .

En la figura 18 se muestran los cambios de color donde el tratamiento G0 visualmente fue transparente o translucido. Conforme se aumentaba la concentración de AgNPs, las películas presentaron un color amarillo, siendo el tratamiento G180 el que presentó un color más intenso cercano al color ámbar.

Tabla 3. Determinación de color en las películas en la escala CieLab. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). ANOVA de una sola vía, comparación de medias por Tukey.

Tratamientos	L*	a*	b*
G180	85.38 ± 0.199^a	1.223 ± 0.015^a	17.1 ± 0.051^a
G90	88.276 ± 0.153^b	0.14 ± 0^b	9.68 ± 0.01^b
G45	90.49 ± 0^c	-0.666 ± 0.011^c	5.066 ± 0.005^c
G22	90.683 ± 0.073^c	-0.613 ± 0.005^d	4.27 ± 0^d
G0	91.87 ± 0.182^d	-0.206 ± 0.011^e	1.883 ± 0.005^e

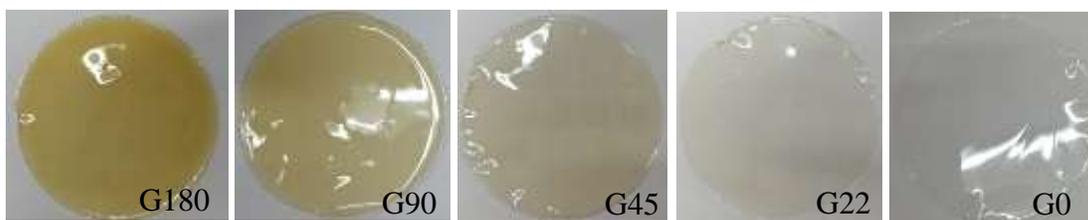


Figura 18. Se muestra la diferencia de color en las diferentes formulaciones de las películas, con respecto a la concentración de AgNPs

8 CONCLUSIONES

La infusión de *Thuja orientalis* mostró ser un agente reductor eficaz en la síntesis de AgNPs en un tiempo de 50 minutos, evidenciando la formación de materiales nanométricos y representando una alternativa amigable con el medio ambiente. Las películas adicionadas con NPs tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* lo cual sugiere que pueden servir como un posible sustituto de los materiales de empaquetado comercial, pero con características adicionales. Al ser un material biodegradable, reducen la contaminación ambiental. Así mismo, retardan el crecimiento de microorganismos aumentando la vida útil de los alimentos y pueden ser adaptadas a las necesidades o características en la industria alimentaria y biomédica.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, J. A. A., Salah Eddine, L., Abderrhmane, B., Alonso-González, M., Guerrero, A., & Romero, A. (2020). Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by pheonix dactylifera leaf extract and evaluation of their antioxidant activity. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100280. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100280>
- Acosta, S. (2014). *Propiedades de films de almidón de yuca y gelatina. Incorporación de aceites* (Doctorado), Universidad Politecnica de Valencia, Valencia, España.
- Adebayo-Tayo, B., Salaam, A., & Ajibade, A. (2019). Green synthesis of silver nanoparticle using *Oscillatoria* sp. extract, its antibacterial, antibiofilm potential and cytotoxicity activity. *Heliyon*, 5(10), e02502. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02502>
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2013). *Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver* (Vol. 5).
- Ajitha, B., Ashok Kumar Reddy, Y., Shameer, S., Rajesh, K. M., Suneetha, Y., & Sreedhara Reddy, P. (2015). Lantana camara leaf extract mediated silver nanoparticles: Antibacterial, green catalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 84-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.020>
- Ali, A. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). *Physicochemical and molecular properties of gelatin from skin of golden carp (Probarbus Jullieni) as influenced by acid pretreatment and prior-ultrasonication* (Vol. 82).
- Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (Probarbus Jullieni) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*, 66, 237-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.003>
- Alvarez-Bayona, R. A., Cortez-Valadez, M., Martínez-Suárez, F., Cruz-Rivera, J. J., & Flores-Acosta, M. (2019). Green synthesis approximation of Au/Li nanoparticles with *Opuntia ficus-indica* extract. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 108, 169-173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.physe.2018.12.008>
- Arfat, Y. A., Ahmed, J., Hiremath, N., Auras, R., & Joseph, A. (2017). Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 62, 191-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.009>

- Babick, F. (2020). Chapter 3.2.1 - Dynamic light scattering (DLS). In V.-D. Hodoroaba, W. E. S. Unger & A. G. Shard (Eds.), *Characterization of Nanoparticles* (pp. 137-172): Elsevier.
- Bajpai, V. K., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D. K., Chandra, P., Hwang, S. K., & Han, Y. K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety and security. *Food and Drug Analysis* 26(4), 1201-1214. doi: 10.1016/j.jfda.2018.06.011
- Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D. M., & da Silva Crespo, J. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>
- Barhoum, A., Rahier, H., Benelmekki, M., & Assche, G. V. (2018). Chapter 20 - Recent trends in nanostructured particles: synthesis, functionalization, and applications. In A. Barhoum & A. S. Hamdy Makhlof (Eds.), *Fundamentals of Nanoparticles* (pp. 605-639): Elsevier.
- Benjakul, S., & Kittiphattanabawon, P. (2018). Gelatin. In P. Valrelis, L. Melton & F. Shahidi (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (Vol. 1, pp. 715). Amsterdam, Netherlands: EL SERVIER.
- Boughriba, S., Souissi, N., Jridi, M., Li, S., & Nasri, M. (2020). Thermal, mechanical and microstructural characterization and antioxidant potential of *Rhinobatos cemiculus* gelatin films supplemented by titanium dioxide doped silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 103, 105695. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105695>
- Cao, H., Liu, X., Meng, F., & Chu, P., K. (2011). Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects *Biomaterials* 32(3), 693-705. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.066
- Ciambelli, P., La Guardia, G., & Vitale, L. (2019). Chapter 7 - Nanotechnology for green materials and processes. In A. Basile, G. Centi, M. D. Falco & G. Iaquaniello (Eds.), *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 179, pp. 97-116): Elsevier.
- Čubová, K., & Čuba, V. (2019). Synthesis of inorganic nanoparticles by ionizing radiation – a review. *Radiation Physics and Chemistry*, 158, 153-164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.02.022>
- Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., & O'Connor, C. J. (2004). Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chemical Reviews*, 104(9), 3893-3946. doi: 10.1021/cr030027b
- Chauhan, A. K., Kataria, N., & Garg, V. K. (2020). Green fabrication of ZnO nanoparticles using *Eucalyptus* spp. leaves extract and their application in wastewater remediation. *Chemosphere*, 247, 125803. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125803>

- Chung, E. J., Kim, E. G., Kim, S. J., Ji, K.-H., & Seo, J. H. (2016). Wilson's disease with cognitive impairment and without extrapyramidal signs: improvement of neuropsychological performance and reduction of MRI abnormalities with trientine treatment. *Neurocase*, 22(1), 40-44. doi: 10.1080/13554794.2015.1032977
- Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., . . . Sokolowska, A. (2010). Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International journal of nanomedicine*, 5, 1085-1094. doi: 10.2147/IJN.S13532
- Dada, A. O., Adekola, F. A., Dada, F. E., Adelani-Akande, A. T., Bello, M. O., Okonkwo, C. R., . . . Adetunji, C. O. (2019). Silver nanoparticle synthesis by *Acalypha wilkesiana* extract: phytochemical screening, characterization, influence of operational parameters, and preliminary antibacterial testing. *Heliyon*, 5(10), e02517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02517>
- Devi, A., Das, V. K., & Deka, D. (2017). Ginger extract as a nature based robust additive and its influence on the oxidation stability of biodiesel synthesized from non-edible oil. *Fuel*, 187, 306-314. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.09.063>
- Devi, A., Das, V. K., & Deka, D. (2019). A green approach for enhancing oxidation stability including long storage periods of biodiesel via *Thuja oreantalis* L. as an antioxidant additive. *Fuel*, 253, 1264-1273. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.05.127>
- Dolgaev, S. I., Simakin, A. V., Voronov, V. V., Shafeev, G. A., & Bozon-Verduraz, F. (2002). Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. *Applied Surface Science*, 186(1), 546-551. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00634-1)
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>
- Durán, N., Marcato, P. D., Conti, R. D., Alves, O. L., Costa, F. T. M., & Brocchi, M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 949-959.
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 631-639. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.024>
- Georgina Solano-Doblado, L., Alamilla-Beltrán, L., & Jimenez Martinez, C. (2018). *Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados* (Vol. 21).
- Ghasemi, E., & Ramezani, M. (2019). Extraction and Determination of Heavy Metals Using Silver Coated Magnetic Nanoparticles and Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Applied Chemical Research*, 13(2), 36-50.

- Gomathi, M., Prakasam, A., Rajkumar, P. V., Rajeshkumar, S., Chandrasekaran, R., & Anbarasan, P. M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Gymnema sylvestre* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. *South African Journal of Chemical Engineering*, 32, 1-4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2019.11.005>
- Gruszka, J., Zambrzycka-Szelewa, E., Kulpa, J. S., & Godlewska-Żyłkiewicz, B. (2018). Discrimination between ionic silver and silver nanoparticles in consumer products using graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33(12), 2133-2142. doi: 10.1039/C8JA00310F
- Hajji, S., Salem, R. B. S.-B., Hamdi, M., Jellouli, K., Ayadi, W., Nasri, M., & Boufi, S. (2017). Nanocomposite films based on chitosan–poly(vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 112-121. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.06.018>
- Handford, C. E., Dean, M., Spence, M., Henchion, M., Elliott, C. T., & Campbell, K. (2015). Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. *Food Control*, 57, 24-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.033>
- Haug, I. J., & Draget, K. I. (2009). Gelatin. In P. G.O & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids* (Vol. 6, pp. 142-163). Washington, DC, USA: Woodhead Publishing Limited.
- Hernández, L., & Arenas, D. (2016). Green Synthesis, Characterization and Stabilization of Nanoparticles Silver with *Thuja Orientalis* Extract. *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology*, 05(06). doi: 10.4172/2324-8777.1000198
- Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005). Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺ *Biochemistry*, 44(39), 13214-13223. doi: 10.1021/bi0508542
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Microbiology*, 3(12), 1-24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- Jamróz, E., Kopel, P., Juszczak, L., Kawecka, A., Bytesnikova, Z., Milosavljević, V., . . . Adam, V. (2018). Development and characterisation of furcellaran-gelatin films containing SeNPs and AgNPs that have antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 83, 9-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.028>

- Jamróz, E., Kopel, P., Juszczak, L., Kawecka, A., Bytesnikova, Z., Milosavljevic, V., & Makarewicz, M. (2019). Development of furcellaran-gelatin films with Se-AgNPs as an active packaging system for extension of mini kiwi shelf life. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100339. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100339>
- Kalpana, S., Priyadarshini, S. R., Maria Leena, M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2019). Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 145-157. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.008>
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014a). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, 35, 644-652. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.011>
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014b). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148, 162-169. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.047>
- Kaur, A., Goyal, D., & Kumar, R. (2018). Surfactant mediated interaction of vancomycin with silver nanoparticles. *Applied Surface Science*, 449, 23-30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.12.066>
- Kirmanidou, Y., Sidira, M., Bakopoulou, A., Tsouknidas, A., Prymak, O., Papi, R., . . . Michalakis, K. (2019). Assessment of cytotoxicity and antibacterial effects of silver nanoparticle-doped titanium alloy surfaces. *Dental Materials*, 35(9), e220-e233. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.06.003>
- Komarneni, S. (2003). Nanophase materials by hydrothermal, microwave-hydrothermal and microwave-solvothermal methods. *Current Science*, 85(12), 1730-1734.
- León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A., Campos-Montiel, R., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3931. doi: [10.3390/ijms20163931](https://doi.org/10.3390/ijms20163931)
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., & Alvarez, P. J. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 42(18), 4591-4602. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015>
- Liang, J., Wang, J., Li, S., Xu, L., Wang, R., Chen, R., & Sun, Y. (2019). The size-controllable preparation of chitosan/silver nanoparticle composite microspheres and its antimicrobial performance. *Carbohydrate Polymers*, 220, 22-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.048>
- Liu, F. (2017). Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, v. 65, pp. 1-9-2017 v.2065. doi: [10.1016/j.foodhyd.2016.10.004](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.004)

- Loo, C. P. Y., & Sarbon, N. M. (2020). Chicken skin gelatin films with tapioca starch. *Food Bioscience*, 35, 100589. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100589>
- López-Millán, A., Del Toro-Sánchez, C. L., Ramos-Enríquez, J. R., Carrillo-Torres, R. C., Zavala-Rivera, P., Esquivel, R., . . . Lucero-Acuña, A. (2019). Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Parkinsonia florida leaf extract and antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Materials Research Express*, 6(9), 095025. doi: 10.1088/2053-1591/ab2d8e
- Luna-Sánchez, J. L., Jiménez-Pérez, J. L., Carbajal-Valdez, R., Lopez-Gamboa, G., Pérez-González, M., & Correa-Pacheco, Z. N. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using Jalapeño Chili extract and thermal lens study of acrylic resin nanocomposites. *Thermochimica Acta*, 678, 178314. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178314>
- Luna-Sánchez, J. L., Pérez, J. L., Carbajal-Valdez, R., Gamboa, G., Pérez-González, M., & Correa Pacheco, Z. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using Jalapeño Chili extract and thermal lens study of acrylic resin nanocomposites. *Thermochimica Acta*, 678, 178314. doi: 10.1016/j.tca.2019.178314
- Malini, S., Vignesh Kumar, S., Hariharan, R., Pon Bharathi, A., Renuka Devi, P., & Hemanathan, E. (2020). Antibacterial, photocatalytic and biosorption activity of chitosan nanocapsules embedded with Prosopis juliflora leaf extract synthesized silver nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*, 21, 828-832. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.587>
- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551. doi: 10.1007/s11051-010-9900-y
- Maurya, I. C., Singh, S., Senapati, S., Srivastava, P., & Bahadur, L. (2019). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using Bixa orellana seed extract and its application for solar cells. *Solar Energy*, 194, 952-958. doi: <https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.10.090>
- Mendieta-Taboada, O., Sobral, P. J. d. A., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. B. Q. (2008). Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1485-1492. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.10.001>
- Moula Ali, A. M. (2019). Effect of squalene rich fraction from shark liver on mechanical, barrier and thermal properties of fish (*Probarbus Jullieni*) skin gelatin film. *Food Hydrocolloids*, 96, pp. 123-133-2019 v.2096. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.05.019
- Muthuvinothini, A., & Stella, S. (2019). Green synthesis of metal oxide nanoparticles and their catalytic activity for the reduction of aldehydes. *Process Biochemistry*, 77, 48-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.001>

- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Chapter 5 - Green Nanotechnology. In M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi & M. Atarod (Eds.), *Interface Science and Technology* (Vol. 28, pp. 145-198): Elsevier.
- Nilsuwan, K., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2015). Emulsion stability and properties of fish gelatin-based films as affected by palm oil and surfactants. *Science of Food and Agriculture*, 96 (7), 2504-2513. doi: 10.1002/jsfa.7371
- Nogueira, S. S., de Araujo-Nobre, A. R., Mafud, A. C., Guimarães, M. A., Alves, M. M. M., Plácido, A., . . . Cardoso, V. S. (2019). Silver nanoparticle stabilized by hydrolyzed collagen and natural polymers: Synthesis, characterization and antibacterial-antifungal evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 808-814. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.214>
- Oćwieja, M., & Morga, M. (2019). Electrokinetic properties of cysteine-stabilized silver nanoparticles dispersed in suspensions and deposited on solid surfaces in the form of monolayers. *Electrochimica Acta*, 297, 1000-1010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.11.213>
- Olawoyin, R. (2018). Nanotechnology the future of fire safety. *Safety Science* 110, 214-221. doi: 10.1016/j.ssci.2018.08.016
- Olawoyin, R. (2018). Nanotechnology: The future of fire safety. *Safety Science*, 110, 214-221. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2018.08.016>
- Oliveira Filho, J. G. d., Rodrigues, J. M., Valadares, A. C. F., Almeida, A. B. d., Lima, T. M. d., Takeuchi, K. P., . . . Egea, M. B. (2019). Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 92, 267-275. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.052>
- Orlowski, P., Zmigrodzka, M., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Czupryn, M., Antos-Bielska, M., . . . Krzyzowska, M. (2018). Tannic acid-modified silver nanoparticles for wound healing: the importance of size. *International journal of nanomedicine*, 13, 991-1007. doi: 10.2147/IJN.S154797
- Park, J.-S., Chung, W.-H., Kim, H.-S., & Kim, Y.-B. (2017). Rapid fabrication of chemical-solution-deposited La_{0.6}Sr_{0.4}CoO_{3-δ} thin films via flashlight sintering. *Journal of Alloys and Compounds*, 696, 102-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.11.074>
- Pathare, P., Opara, U., & Al-Said, F. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-012-0867-9
- Pedroza-Toscano, M., Lopez-Cuenca, S., Rabelero, M., Moreno-Medrano, E., Mendizabal-Ruiz, A., & Salazar-Peña, R. (2017). Silver Nanoparticles Obtained by Semicontinuous Chemical Reduction Using Carboxymethyl Cellulose as a

- Stabilizing Agent and Its Antibacterial Capacity. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 1-7. doi: 10.1155/2017/1390180
- Pereira de Abreu, D. A., Cruz, J. M., & Paseiro Losada, P. (2012). Active and Intelligent Packaging for the Food Industry. *Food Reviews International*, 28(2), 146-187. doi: 10.1080/87559129.2011.595022
- Prajitha, N., Athira, S. S., & Mohanan, P. V. (2019). Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles. *Environmental Research*, 172, 98-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.003>
- Prasad, P., & Kochhar, A. (2014). *Active Packaging in Food Industry: A Review* (Vol. 8).
- Quintero, C., Falguera, V., & Muñoz, A. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productor hortofrutícolas *Revista Mexicana de Fitopatología* 1(5), 93-118.
- Radniecki, T. S., Stankus, D. P., Neigh, A., Nason, J. A., & Semprini, L. (2011). Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea* *Chemosphere* 85(1), 43-49. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.039
- Rahman, A., Kumar, S., Bafana, A., Dahoumane, S. A., & Jeffryes, C. (2019). Individual and Combined Effects of Extracellular Polymeric Substances and Whole Cell Components of *Chlamydomonas reinhardtii* on Silver Nanoparticle Synthesis and Stability. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(5), 956. doi: 10.3390/molecules24050956
- Rahman, M. S. (2006). State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 129-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.09.009>
- Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garriós, M. (2016). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications *Coatings* 6(4), 41. doi: 10.3390/coatings6040041
- Ranoszek-Soliwoda, K., Tomaszewska, E., Małek, K., Celichowski, G., Orłowski, P., Krzyzowska, M., & Grobelny, J. (2019). The synthesis of monodisperse silver nanoparticles with plant extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 19-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.037>
- Rasid, N. A. M., Nazmi, N. N. M., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2009). Rheological, functional and antioxidant properties of films forming solution and active gelatin films incorporated with *Centella asiatica* (L.) urban extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 115-124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.10.002>
- Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Shah, S. A. A., Tripathy, M., & Paliwal, N. (2019). Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and

- photocatalytic activity of *Parkia speciosa* leaves extract mediated silver nanoparticles. *Results in Physics*, 15, 102565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102565>
- Rehab-Ali, H., Khalil -Mostafa, M. H., Ismail-Eman, H., & Mohamed Heba, E. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Psidium guajava* leaf extract *Journal of Environmental Science*, 46(1), 1-19. doi: 10.2108/jes.2019.67964
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. A., & Lynch, I. (2013). Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 6(6), 2295-2350. doi: 10.3390/ma6062295
- Rodríguez-Hernández, J. (2017). 3 - Nanostructured antimicrobial materials in the food industry. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Food Preservation* (pp. 75-124): Academic Press.
- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Sahraee, S., Milani, J. M., Regenstein, J. M., & Kafil, H. S. (2019). Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review. *Food Bioscience*, 32, 100451. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100451>
- Sasidharan, D., Namitha, T. R., Johnson, S. P., Jose, V., & Mathew, P. (2020). Synthesis of silver and copper oxide nanoparticles using *Myristica fragrans* fruit extract: Antimicrobial and catalytic applications. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 16, 100255. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100255>
- Shankar, S., Wang, L.-F., & Rhim, J.-W. (2019). Effect of melanin nanoparticles on the mechanical, water vapor barrier, and antioxidant properties of gelatin-based films for food packaging application. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100363. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100363>
- Sharma, G., Kumar, A., Sharma, S., Naushad, M., Prakash Dwivedi, R., Alothman, Z. A., & Mola, G. T. (2019). Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. *Journal of King Saud University - Science*, 31(2), 257-269. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.06.012>
- Sharma, G., Sharma, A., Kurian, M., Bhavesh, R., Nam, J.-S., & Lee, S.-S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticle using *Myristica fragrans* (nutmeg) seed extract and its biological activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9, 325-332.
- Sharma, V., Kaushik, S., Pandit, P., Dhull, D., Yadav, J. P., & Kaushik, S. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103. doi: 10.1007/s00253-018-9488-1

- Singh, A., Gautam, P. K., Verma, A., Singh, V., Shivapriya, P. M., Shivalkar, S., . . . Samanta, S. K. (2020). Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. *Biotechnology Reports*, 25, e00427. doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00427>
- Srivastava, P., Kumar, P., Singh, D., & Singh, V. (2012). *Biological Properties of Thuja Orientalis Linn* (Vol. 2).
- Subramani, K., Elhissi, A., Subbiah, U., & Ahmed, W. (2019). Introduction to nanotechnology (pp. 3-18).
- Sullivan, D. J., Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M., Cummins, E., Kerry, J. P., & Morris, M. A. (2018). 11 - Natural Antimicrobial Materials for Use in Food Packaging. In A. Tiwari (Ed.), *Handbook of Antimicrobial Coatings* (pp. 181-233): Elsevier.
- Sung, S.-Y., Sin, L. T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., . . . Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 110-123. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.001>
- Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, C. J., Bowyer, M., Singh, S. P., & Vuong, Q. V. (2019). Starch-based films: Major factors affecting their properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1079-1089. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190>
- Theerawitayaart, W., Prodpran, T., Benjakul, S., & Sookchoo, P. (2019). Properties of films from fish gelatin prepared by molecular modification and direct addition of oxidized linoleic acid. *Food Hydrocolloids*, 88, 291-300. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.022>
- Tiwari, A. (2018). Natural Antimicrobial Materials for Use in Food Packaging In D. J. Sullivan, S. Azlin-Hasim, M. Cruz-Romero, E. Cummins, J. Kerry & M. A. Morris (Eds.), *Handbook of Antimicrobial Coatings* (Vol. 11, pp. 181-233).
- Tongdeesoontorn, W., & Rawdkuen, S. (2019). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications *Reference Module in Food Science*: Elsevier.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Food Science*, 12(1), 40-53.
- Vanecht, E., Binnemans, K., Patskovsky, S., Meunier, M., Seo, J. W., Stappers, L., & Franssaer, J. (2012). Stability of sputter-deposited gold nanoparticles in imidazolium ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(16), 5662-5671. doi: 10.1039/C2CP23677J
- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional

- properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 899-907. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.003>
- Varadavenkatesan, T., Selvaraj, R., & Vinayagam, R. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Thunbergia grandiflora* flower extract and its catalytic action in reduction of Congo red dye. *Materials Today: Proceedings*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.05.441>
- Varadavenkatesan, T., Vinayagam, R., & Selvaraj, R. (2019). Green synthesis and structural characterization of silver nanoparticles synthesized using the pod extract of *Clitoria ternatea* and its application towards dye degradation. *Materials Today: Proceedings*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.216>
- Vinayagam, R., Varadavenkatesan, T., & Selvaraj, R. (2018). Green synthesis, structural characterization, and catalytic activity of silver nanoparticles stabilized with *Bridelia retusa* leaf extract *Green Processing and Synthesis* (Vol. 7, pp. 30).
- Xing, Q., Yates, K., Vogt, C., Qian, Z., Frost, M. C., & Zhao, F. (2014). Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels. *Divalent Metal Ion Removal Scientific Reports*, 4(4706), 1-10. doi: 10.1038/srep04706
- Xiu, Z.-m., Zhang, Q.-b., Puppala, H. L., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. J. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Letters*, 12(8), 4271-4275. doi: 10.1021/nl301934w
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Gutiérrez-Cortez, E., Del Real, A., González-Reza, R. M., Galindo-Pérez, M. J., & Quintanar-Guerrero, D. (2014). Fresh-cut Red Delicious apples coating using tocopherol/mucilage nanoemulsion: Effect of coating on polyphenol oxidase and pectin methylesterase activities. *Food Research International*, 62, 974-983. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.011>
- Zhang, N.-n., Park, D. K., & Park, H.-J. (2013). Hair growth-promoting activity of hot water extract of *Thuja orientalis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 9. doi: 10.1186/1472-6882-13-9

10 ANEXOS

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



21 de febrero de 2020

Estimado(a) **GABRIEL AGUIRRE ALVAREZ**

Agradecemos sinceramente el interés por participar en el XLI Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ) y por este conducto nos complace informarle que su trabajo:

17. SÍNTESIS VERDE DE NANOPÁTICULAS DE PLATA CON EL EXTRACTO DE THUJA ORIENTALIS

Cuyos autores son:

Xochitl Alejandra Pérez Marroquín, Laura García Hernández, Gabriel Aguirre Cruz, Rafael G. Campos Montiel, Gabriel Aguirre Alvarez

Ha sido aceptado para su presentación en la sesión de **INGENIERÍA DE ALIMENTOS** en la modalidad **CARTEL**. Para ser acreedor de la constancia de participación de requiere que al menos uno de los **autores esté inscrito**, y que el **trabajo haya sido efectivamente presentado**. Para que el trabajo sea publicado en las memorias del congreso, es necesario cumplir con los criterios anteriores y haber enviado su trabajo en extenso.

A partir del 18 de marzo de 2020 consulte el programa completo en nuestra página web www.amidiq.com para conocer el día y hora precisa de su presentación. Recuerde que tiene hasta el viernes 20 de marzo de 2020 para sustituir el resumen de dos páginas por su trabajo en extenso en la plataforma OpenConf.

A nombre de la AMIDIQ le agradecemos su participación y esperamos tener la oportunidad de saludarlo personalmente en Ixtapa Zihuatanejo, Gro.

Atentamente
COMITÉ TÉCNICO AMIDIQ 2020



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE
TULANCINGO

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: **XÓCHITL ALEJANDRA PÉREZ MARROQUÍN**

Por su participación en el XI Seminario de Investigación del P.E. en Nanotecnología,
con el proyecto: La nanotecnología y los alimentos

Fecha de emisión:

Tulancingo, Hidalgo a 04 de Abril de 2019

Registro: SEM2019-01

Dr. Julio Márquez Rodríguez

Rector

