

Síntesis *green* y caracterización biológica de AgNPs empleando extracto de alcaparras

GISELA N. ARANDA FERREYRA

Instituto de Ciencias Químicas | Facultad de Agronomía y Agroindustrias | Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE)

GASTÓN F. VILLALBA

Instituto de Ciencias Químicas | Facultad de Agronomía y Agroindustrias | Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

PAULINA L. PAÉZ

UNITEFA-CONICET | Departamento de Farmacia | Facultad de Ciencias Químicas | Universidad Nacional de Córdoba (UNC)

IVANA M. AIASSA MARTÍNEZ

CIQA | Facultad Regional Córdoba | Universidad Tecnológica Nacional (UTN)

MARTÍN N. PICCIONI

CIQA | Facultad Regional Córdoba | Universidad Tecnológica Nacional (UTN)

PABLO A. GUERRERO

CIQA | Facultad Regional Córdoba | Universidad Tecnológica Nacional (UTN)

MÓNICA A. NAZARENO

Instituto de Ciencias Químicas | Facultad de Agronomía y Agroindustrias | Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

PABLO R. DALMASSO

CIQA | Facultad Regional Córdoba | Universidad Tecnológica Nacional (UTN) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

RESUMEN

*La búsqueda de procesos sintéticos «verde» que se valgan de la biotecnología como una opción viable para la síntesis de nanopartículas metálicas y el interés por extractos vegetales acuosos como «fábrica de materiales nanoestructurados» han recibido enorme atención durante la última década. Ello es en respuesta a las innumerables y particulares propiedades fisicoquímicas de estos nanomateriales y sus consecuentes aplicaciones en diferentes sectores económicos, como la catálisis, la electrónica, la tecnología analítica, la ingeniería de alimentos, médica y farmacéutica. En el presente trabajo se describe la novedosa biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a partir de la reducción de iones Ag^+ con el extracto acuoso de hojas frescas de alcaparra (*Capparis spinosa* L). El proceso de síntesis se llevó a cabo adicionando 2 mL del extracto a 25 mL de solución de $AgNO_3$ 10 mM y llegando luego a microondas por 2 minutos. La formación de las AgNPs fue visualizada por el cambio de color de la solución de $AgNO_3$, de incolora a marrón amarillento luego del*

agregado del extracto acuoso y confirmada vía espectroscopia UV-vis por la presencia de un pico de absorción de SPR a ~ 425 nm. Las características morfológicas de las AgNPs biosintetizadas fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión y su estabilidad electrostática por análisis de potencial Zeta. Si bien las AgNPs biosintetizadas no fijaron actividad antioxidante, ellas mostraron actividad biológica como potencial agente antibacteriano no convencional debido a su destacada actividad bactericida de amplio espectro, siendo la dosis a emplear del orden del picomolar. Además, este trabajo permitió dar valor agregado a residuos agroindustriales como fuente de compuestos bioactivos con propiedades reductoras y estabilizantes, los cuales propiciaron la síntesis sencilla y verde de nanomateriales de naturaleza metálica.

PALABRAS CLAVE

Nanopartículas metálicas; síntesis verde; actividad biológica; valorización de residuos agrícolas.

1. Introducción

El empleo de herramientas biotecnológicas en el campo de la nanotecnología ha experimentado un gran desarrollo en el último tiempo, destacándose la aplicación para el desarrollo de protocolos experimentales de síntesis de nanopartículas (NPs) de amplia gama de composiciones químicas y tamaños (Roldan Cuanya, 2010). Esto responde al gran interés por el uso de NPs metálicas, las cuales debido al tamaño extremadamente pequeño y una alta relación área/volumen, se han convertido en materiales con propiedades excepcionales y diferenciales al *bulk* (material macroscópico), entre las que se pueden mencionar propiedades mecánicas, biológicas y ópticas, actividad catalítica, conductividad térmica y eléctrica (De Azeredo, 2013; Neouze, 2013). Así, los protocolos de síntesis de NPs mediante métodos biológicos utilizando microorganismos, enzimas y extractos acuosos de plantas han surgido como una alternativa *green* a los métodos químicos y físicos. Hasta el momento, microorganismos tales como bacterias (*Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*), hongos (*Penicillium fellutanum*, *Fusarium oxysporium*), actinomicetos (*Thermomonospora* sp.) y levaduras (*Yarrowia lipolytica*) han sido empleados para la generación de nanopartículas de plata (AgNPs) (Hulkoti y Taranath, 2014; Quinteros y col., 2016). En tanto, extractos acuosos de cedrón pasto, geranio, avena, jatrofa, entre otros, han permitido la producción de NPs metálicas con alta estabilidad debido a la presencia de agentes reductores (agentes antioxidantes) y estabilizantes como ácidos orgánicos, polifenoles y flavonoides, los cuales son los fitocompuestos mayoritarios de los extractos obtenidos (Singh y col., 2016; Gallucci y col., 2017).

Capparis spinosa L. es un arbusto cuyos botones florales, conocidos con el nombre de alcaparras, tienen una amplia aplicación en la gastronomía. Además del

uso culinario, *C. spinosa* presenta también numerosos efectos benéficos para la salud relacionados a su reconocida composición antioxidante, cuyos principales componentes bioactivos son los flavonoides entre los que se destaca como componente mayoritario la rutina o quercetina-3-rutinósido (González y col., 2010). Sin embargo, en la actualidad la factibilidad de aprovechar otras partes de la planta tales como hojas, consideradas residuos agrícolas generados en cantidades importantes durante la época de poda de este cultivo, como fuentes de antioxidantes para su valoración en nano(bio)tecnología. En tal sentido, la inmovilización *in situ* de compuestos bioactivos sobre nanomateriales metálicos se presenta como una contribución nanobiotecnológica innovativa para el desarrollo de sistemas compatibles con propiedades biológicas mejoradas para su utilización en farmacología, medicina o cosmetología (Kharat y col., 2016).

2. Objetivos

2.1 Sintetizar nanopartículas de plata mediante la utilización de extractos acuosos de hojas de alcaparra como medio de reducción y estabilización y caracterizarlas con técnicas espectroscópicas y microscópicas.

2.2 Determinar la capacidad antioxidante de las AgNPs biosintetizadas.

2.3 Estudiar la actividad antibacteriana *in vitro* de las AgNPs biosintetizadas sobre especies bacterianas representativas.

3. Materiales y métodos

3.1 Síntesis verde y caracterización de las AgNPs

Se llevó a cabo a partir de la mezcla de un volumen de solución de nitrato de plata (AgNO_3) de concentración 10 mM con 2 mL de extracto acuoso de hojas frescas de *C. spinosa*. Seguidamente, esta mezcla fue llevada a microondas por 2 minutos y después de transcurrido este tiempo, la síntesis prosiguió a temperatura ambiente con agitación constante durante 15 minutos. La caracterización de las AgNPs biosintetizadas se llevó a cabo combinando espectroscopía UV-vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y determinación de potencial Zeta.

3.2 Determinación de la actividad antioxidante de las AgNPs biosintetizadas

Se llevó a cabo empleando el ensayo de captura del radical DPPH•, el ensayo de decoloración del catión radical ABTS•+ y el ensayo poder reductor del catión férrico (FRAP), comparando la actividad de las AgNPs en relación al extracto con los cuales fueron sintetizadas.

3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana

Se realizaron ensayos sobre cepas bacterianas de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922) determinándose la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

4. Resultados y discusión

La novedosa biosíntesis de AgNPs a partir de la reducción de iones Ag^+ con extractos acuosos de hojas frescas de alcaparra es descrita por primera vez. Tal biorreducción fue visualizada por el cambio de color de la solución de AgNO_3 desde incolora (Figura 1A) a marrón amarillento luego del agregado del extracto (Figura 1B) y confirmada vía espectroscopía UV-vis por la presencia de una banda de absorción intensa alrededor de 425 nm, la cual es indicativa de la presencia de AgNPs (Figura 1C). El color de la suspensión coloidal se debe a la absorción del plasmón superficial que se genera por las oscilaciones inducidas por la incidencia de la luz de los electrones de la banda de conducción presentes en la superficie metálica (Coronado y col., 2011).

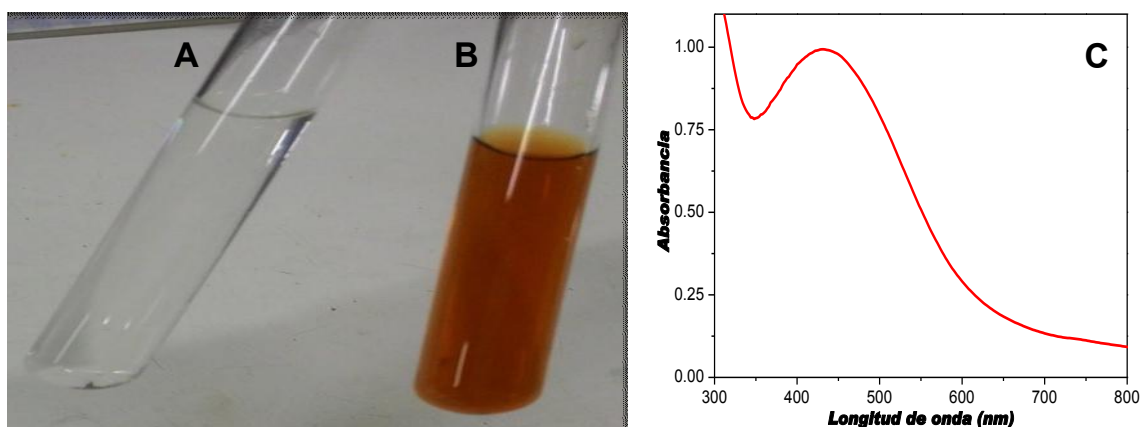


Figura 1: A) Solución de AgNO_3 . B) Suspensión coloidal de las AgNPs green. C) Espectro UV-vis de las AgNPs biosintetizadas

La morfología de las AgNPs obtenidas fue examinada por microscopía TEM, la cual confirmó que el proceso biosintético propuesto permite obtener nanopartículas de morfología predominantemente esférica y con una distribución uniforme. La Figura 2A y 2B muestran una micrografía TEM representativa de las AgNPs biosintetizadas empleando extracto acuoso de hojas frescas de *C. spinosa* y

su correspondiente histograma, respectivamente. A partir de esta figura se puede señalar que el 75% de las NPs obtenidas presentan un diámetro de entre 52 y 58 nm.

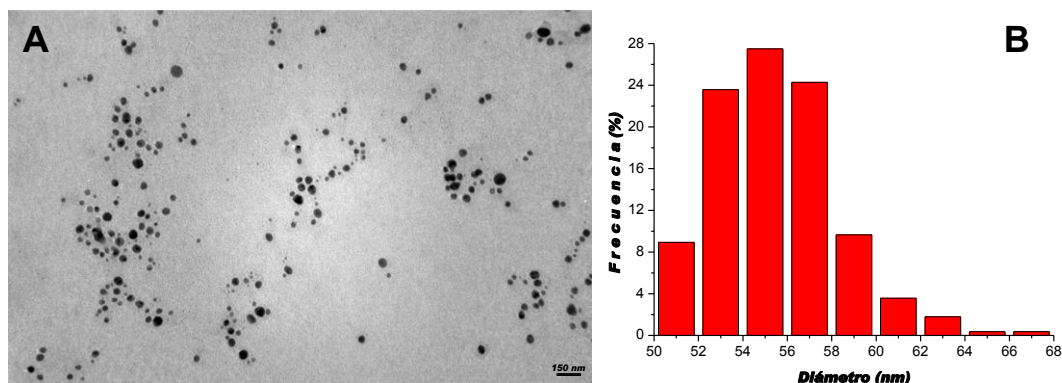


Figura 2: A) Representativa imagen TEM de las AgNPs biosintetizadas. B) Histograma de la distribución de tamaño de las AgNPs

El análisis del potencial Zeta de las AgNPs green es fundamental para conocer su carga superficial e inferir la estabilidad de las mismas. El valor obtenido de (-41 ± 18) mV permite indicar que fuerzas repulsivas entre las nanopartículas serán las responsables de la estabilidad electrostática de las AgNPs y de su dispersión en el medio evitando la formación de aglomerados.

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de las AgNPs biosintetizadas, el blanco de reacción y el extracto acuoso de hojas frescas, la cual es expresada en equivalentes de patrones de referencia.

MUESTRAS	AAR% (%/MG MUESTRA)	VCEAC (μ g DE AAS EQUIVALENTE/ MG MUESTRA)
AgNPs	$0,88 \pm 0,04$	$0,130 \pm 0,006$
Blanco de reacción*	$1,17 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,02$
Extracto acuoso de hojas frescas	28 ± 1	$8,2 \pm 0,4$

Tabla 1. Actividad antioxidante de las AgNPs biosintetizadas utilizando el método DPPH^{*}

* 25 mL de H₂O + 2 mL de extracto acuoso de hojas frescas.

AAR% = porcentaje de actividad antirradicalaria.

VCEAC = capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico.

AAs = ácido ascórbico.

MUESTRAS	AAR% (%/MG MUESTRA)	VCEAC (μ G DE AAS EQUIVALENTE/ MG MUESTRA)	TEAC (μ G DE TROLOX EQUIVALENTE/ MG MUESTRA)
AgNPs	1,01 \pm 0,04	0,110 \pm 0,005	0,0220 \pm 0,0009
Blanco de reacción*	1,28 \pm 0,06	0,40 \pm 0,02	0,200 \pm 0,009
Extracto acuoso de hojas frescas	29 \pm 1	5,9 \pm 0,3	0,55 \pm 0,02

Tabla 2: Actividad antioxidante de las AgNPs biosintetizadas utilizando el método ABTS⁺

* 25 mL de H₂O + 2 mL de extracto acuoso de hojas frescas.

AAR% = porcentaje de actividad antirradicalaria.

VCEAC = capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico.

AAs = ácido ascórbico.

TEAC = capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

MUESTRAS	FRAP		
	(μ G DE AG EQUIVALENTE /MG MUESTRA)	(μ G DE AAS EQUIVALENTE /MG MUESTRA)	(μ G DE FeSO_4 EQUIVALENTE /MG MUESTRA)
AgNPs	$0,33 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,04$	$16,7 \pm 0,7$
Blanco de reacción*	$0,55 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,05$	$16,9 \pm 0,7$
Extracto acuoso de hojas frescas	$12,6 \pm 0,6$	27 ± 1	$(45 \pm 2) \times 101$

Tabla 3: Capacidad de reducción total de las AgNPs biosintetizadas expresada en equivalentes de ácido gálico (AG), ácido ascórbico (AAs) y sulfato ferroso

* 25 mL de H_2O + 2 mL de extracto acuoso de hojas frescas.

A partir de los resultados expuestos en las tablas precedentes se puede decir que la actividad antioxidante (AAR %/mg muestra) de las AgNPs, medida a través de las técnicas de DPPH y ABTS, presenta valores menos al 1,2 %, siendo estos datos congruentes con los resultados obtenidos para la técnica FRAP. Ello permite indicar que los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de hojas frescas de *C. spinosa* están comprometidos en la biorreducción y estabilización de los iones Ag^+ y que los grupos funcionales responsables de la capacidad antioxidante del extracto acuoso quedan fuera de juego para tal función, justificando de esta manera que la actividad antioxidante de las AgNPs sea muy baja.

La actividad antibacteriana de las AgNPs biosintetizadas se evaluó empleando *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922, determinándose la CIM y la CBM de las mismas (Tabla 4).

CEPA BACTERIANA	AgNPs			CIPROFLOXACINA *
	CIM (pM)	CBM (pM)	CBM/CIM	CIM (μ M)
S. aureus ATCC 29213	0,4	0,4	1	1,6
E. coli ATCC 25922	0,4	0,4	1	0,4

Tabla 4: Actividad antimicrobiana de las AgNPs fitosintetizadas contra las bacterias ensayadas

* Datos reportados por Quinteros y col. (2016).

A partir de la Tabla 4 se puede observar que las AgNPs biosintetizadas fueron efectivas contra las especies bacterianas estudiadas, presentando CIM a niveles picomolares. En comparación con un antibiótico clínico convencional, como la ciprofloxacina, las AgNPs mostraron un efecto de inhibición a concentraciones seis órdenes de magnitud más bajas que las necesarias para dicho antibiótico, el cual presentó CIM del orden del micromolar (μ M) (Quinteros y col., 2016). Estos resultados muestran que las AgNPs fitosintetizadas, a partir de la reducción de iones plata por el extracto acuoso de hojas frescas de *C. spinosa*, pueden emplearse como potencial agente antimicrobiano y dan cuenta de la naturaleza de amplio espectro de su actividad antibacteriana. Considerando la relación CBM/CIM como una medida del poder bactericida de un agente antimicrobiano (agente bactericida: $CBM/CIM \leq 2$; agente bacteriostático: $CBM/CIM > 2$), los resultados obtenidos nos permiten destacar la actividad biocida de AgNPs *green* sobre las bacterias grampositiva y negativa ensayadas.

5. Conclusión

Las propiedades reductoras y estabilizantes del extracto acuoso de hojas frescas de alcaparra permitieron la biosíntesis AgNPs mediante una metodología sencilla y ecoamigable, siendo caracterizadas mediante técnicas de espectroscopía UV-vis y microscopía TEM. La valoración de la actividad antioxidante de las AgNPs arrojó resultados negativos, siendo confirmados por tres métodos diferentes (DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP). Estos resultados permiten inferir que si bien los compuestos bioactivos responsables de la actividad antirradicalaria en los extractos (antioxidantes) estarían involucrados en la biorreducción de Ag^+ a Ag^0 y en la

estabilización de las nanopartículas, no estuvieron presentes en una concentración y/o conformación estructural necesaria para conservar su AAR. Sin embargo, si bien las AgNPs biosintetizadas no fijaron actividad antioxidante, se debe destacar la importancia de haberlas obtenido a partir de las hojas de *C. spinosa*, las cuales son actualmente consideradas un desecho agroindustrial, lo que, además de darle valor agregado a estos residuos agroindustriales, dan como resultado una metodología de síntesis de AgNPs totalmente *green*, es decir amigable con el medioambiente. Además, las AgNPs aquí biosintetizadas mostraron efecto antibacteriano sobre cepas de referencia (*S. aureus* y *E. coli*). En ambos casos, se requirieron concentraciones extremadamente bajas de AgNPs para inhibir el crecimiento bacteriano, siendo la dosis a emplear del nanomaterial (del orden pM) 6 órdenes magnitud más baja que aquélla para antibióticos convencionales (del orden μ M).

Bibliografía

- CORONADO, E. A., ENCINA, E. R., & STEFANI, F. D. (2011). Optical properties of metallic nanoparticles: Manipulating light, heat and forces at the nanoscale. *Nanoscale*, 3(10), 4042-4059. DOI: <<https://doi.org/10.1039/c1nr10788g>>
- CUENYA, B. R. (2010). Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. *Thin Solid Films*, 518(12), 3127-3150. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.01.018>>
- DE AZEREDO, H. M. C. (2013). Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 56-69. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.006>>
- GALLUCCI, M. N., FRAIRE, J. C., FERREYRA MAILLARD, A. P. V., PÁEZ, P. L., AIASSA MARTÍNEZ, I. M., PANNUNZIO MINER, E. V., CORONADO, E. A., & DALMASSO, P. R. (2017). Silver nanoparticles from leafy green extract of Belgian endive (*Cichorium intybus* L. var. *sativus*): Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity. *Materials Letters*, 197, 98-101. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.03.141>>
- GONZÁLEZ, E. A., CAYUPÁN, Y. S. C., & NAZAREÑO, M. A. (2010). Efecto de distintos tratamientos de conservación en la actividadantirradicalaria de alcaparras (*Capparis spinosa*L.) cultivadas enSantiago del Estero, Argentina. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, 1(1), 47-57.
- HULKOTI, N. I., & TARANATH, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 121, 474-483. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027>>
- KHARAT, S. N., & MENDHULKAR, V. D. (2016). Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using Elephantopus scaber leaf extract. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 62, 719-724. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.024>>

- NEOUZE, M.-A. (2013). Nanoparticle assemblies: Main synthesis pathways and brief overview on some important applications. *Journal of Materials Science*, 48(21), 7321-7349. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s10853-013-7542-z>>
- QUINTEROS, M. A., AIASSA MARTÍNEZ, I. M., DALMASSO, P. R., & PÁEZ, P. L. (2016). Silver Nanoparticles: Biosynthesis Using an ATCC Reference Strain of *Pseudomonas aeruginosa* and Activity as Broad Spectrum Clinical Antibacterial Agents. *International Journal of Biomaterials*. DOI: <<https://doi.org/10.1155/2016/5971047>>
- SINGH, P., KIM, Y.-J., ZHANG, D., & YANG, D.-C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588-599. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>>

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONICET, ANPCyT, UNSE, UNC y UTN por el apoyo económico e institucional.