

**Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Oro (AuNPs) por
Reducción Química con Extracto de Pasto Guinea
(*Panicum maximum*)**

Kelly Johanna Campo Becerra

Tesis de grado para optar por el título de Química

Director

Enrique Mejía Ospino

Doctor en Química

Co-directora

Yuly Andrea Prada Vargas

Magister en Química

Universidad Industrial de Santander

Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

*Una siempre está en el lugar que tiene que estar.
No es azar.*

AGRADECIMIENTOS

En este largo trasegar, en esta etapa de mi vida muchas son las gracias que debo.

Al profesor Enrique Mejía por dirigir mi primer ejercicio de investigadora.

A Yuly Prada por la confianza y la orientación.

A todo el grupo de investigación LEAM.

Al grupo de investigación GIBIM, especialmente al profesor Jhon Castillo.

A mis padres,

A mi madre por acompañar mis decisiones aun cuando no las ha compartido.

A mi papá por creer en mí incansablemente.

A mis hermanos mayores,

Carlos y Oscar, por ser apoyo y fuerza, soporte y cañón. A Cachi porque también ha estado ahí a nuestra extraña manera de comunicarnos, siempre conmigo.

A mi hermanita menor, Lina.

A mi madrina, la casi mamá, mi tía amparo y la abuela Laura, por los buenos consejos, los mimos y los cuidados.

A mi otra familia, la que fui haciendo en el camino,

A Cris, por su estar incondicional.

A Mabél por ser una gran amiga. A Monimon por las velitas que hemos prendido juntas. A la Roble por ser gran cómplice. A Alexa por soportar mi rara forma de ser.

A las chichas: Ivone por la compañía, la confidencia, el tiempo, y Juli por acogerme en su hogar a pesar que a veces me ha querido echar. Y a las dos por querer a mi Poncho como uno más de los suyos.

Gracias infinitas.

Tabla de Contenido

Introducción.....	13
1. Antecedentes.....	15
2. Marco teórico.....	18
2.1. Nanopartículas.....	18
2.2. Métodos de Obtención.....	19
2.3. Pasto Guinea (<i>Panicum maximum</i>)	21
2.4. Peroxidasa del Pasto Guinea (<i>Panicum maximum</i>)	22
2.5. Aplicaciones	23
2.6. Técnicas de Caracterización de la AuNPs.....	24
2.6.1. Espectroscopia UV-Visible.....	24
2.6.2. Dispersión de la Luz en Modo Dinámico (DLS)	24
2.6.3. Potencial Z.	25
2.6.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	25
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo General	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Metodología.....	27
4.1. Materiales y Métodos	27
4.2. Preparación del Extracto de Pasto Guinea EPG	28
4.3. Síntesis de AuNPs	29

4.3.1. Parámetros Evaluados en la Síntesis.....	29
4.4. Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas.....	30
4.4.1. Espectroscopia de Ultravioleta Visible.....	30
4.4.2. Dispersión de la luz en modo dinámico.....	30
4.4.3. Potencial Z.. ..	30
4.4.4. Microscopía de barrido electrónico.. ..	30
5. Resultados y discusión.....	32
5.1. Obtención y Purificación Parcial del EPG	32
5.2. Síntesis y determinación de parámetros de síntesis.....	35
5.3. Caracterización de AuNPs.....	43
6. Conclusiones.....	46
7. Recomendaciones.....	47
Referencias Bibliograficas.....	48

Lista de Figuras

Figura 1. Rutas de síntesis de nanopartículas metálicas	19
Figura 2. Ilustración y organización taxonómica de la especie <i>Megathrysus maximus</i>	21
Figura 3. Esquema general de la metodología que se implementó para la síntesis y caracterización de las AuNPs.....	27
Figura 4. Fotografía del pasto guinea utilizado para preparar el extracto vegetal precursor...32	
Figura 5. Primera parte del proceso extracción para la obtención del extracto crudo. A) Destrucción mecánica de la planta; B) Agitación constante buffer de extracción; C) Filtración del extracto.....	33
Figura 6. Segunda parte del proceso extracción para la separación en fracciones del extracto según su actividad peroxidásica. A) Eliminación de pigmentos; B) Equipo purificador de proteínas Bio-Rad Biologic; C) Fracciones recolectadas	34
Figura 7. Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) al 8%. Carril 1: extracto crudo.Carril 2: eliminación de pigmentos. Carril 3: separación por cromatografía. Carril 4: ultrafiltración. Carril 5: HRP. Carril 6: Marcado Thermo Scientific 26612.....	35
Figura 8. Apariencia de las estructuras formadas bajo el efecto de cada temperatura estudiada durante la formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl ₄ 35:1	40
Figura 10. Micrografía SEM de las AuNPs sintetizadas a partir del EPG bajo las condiciones de T 30°C; pH 3 y relación EPG/HAuCl ₄ de 35:1.	45

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista de reactivos de grado analítico utilizados a lo largo del proceso experimental de la presente investigación.	28
Tabla 2 Etapas del proceso de obtención del EPG: Tabla de purificación parcial. Fuente: La autora.....	35
Tabla 3. Masas del EPG y sus respectivas proporciones EPG/HAuCl ₄ evaluadas para la formación de las AuNPs.	37
Tabla 4 Tiempos de reacción para cada temperatura evaluada.....	41

Lista de Graficas

Grafica 1. Comparativa de la formación de la SPR característica de las AuNPs para cada proporción de los precursores EPG/HAuCl ₄ evaluada.....	37
Grafica 2. Estudio del tiempo de formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl ₄ 35:1.	38
Grafica 3. Estudio del efecto de la temperatura sobre la formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl ₄ 35:1.....	40
Grafica 4. Estudio del efecto del pH sobre la formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl ₄ 35:1.	42
Grafica 5. 11Espectro UV-vis de las AuNPs sintetizadas con relación de masa de los precursores 35:1, T=30°C y pH 3.0.	43
Grafica 6. Distribución de tamaños por DLS de las AuNP, con promedio de 35,05 nms.....	43
Grafica 7. Distribución de potencial Z de las AuNPs.....	44

RESUMEN

TÍTULO: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs) POR REDUCCIÓN QUÍMICA CON EXTRACTO DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*)¹

AUTOR: KELLY JOHANNA CAMPO BECERRA²

PALABRAS CLAVE: NANOPARTÍCULAS DE ORO, PASTO GUINEA, *Panicum maximum*, SÍNTESIS VERDE.

DESCRIPCIÓN:

La síntesis de nanoestructuras a partir de extractos vegetales se ha convertido en una alternativa novedosa al momento de obtener nanopartículas bioactivas y con baja toxicidad. Recientes estudios han reportado la síntesis verde de diferentes nanoestructuras metálicas debido a que han mostrado muchas ventajas frente a los métodos clásicos, tales como, mejor relación costo-beneficio, no toxicidad y que son más amigables con el ambiente.

El presente trabajo de grado condensa los resultados del proceso de síntesis de nanopartículas de oro, AuNPs, utilizando extracto de pasto Guinea, EPG, como agente reductor y estabilizador, así como de su posterior caracterización. La investigación se realizó en cuatro etapas, una primera fase trató la obtención y la purificación parcial del EPG. La segunda parte estuvo enfocada en la evaluación de parámetros óptimos de síntesis como la relación de masa de los precursores, efecto de la temperatura y efecto del pH. Por último, se realizó la síntesis de las AuNPs por reducción química, así como su caracterización mediante las técnicas espectroscópicas Uv-vis, Potencial Z, DLS y SEM.

¹ Trabajo de grado

² Facultad de ciencias, Escuela de Química. Codirectora: Yuly Andrea Prada, M.Sc. Director: Enrique Mejía Ospino, Ph.D

ABSTRACT

TITLE: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF GOLD NANOPARTICLES (AuNPs) BY CHEMICAL REDUCTION WITH GUINEA GRASS (*Panicum maximum*) EXTRACT

AUTHOR: KELLY JOHANNA CAMPO BECERRA

KEYWORDS: GOLD NANOPARTICLES, GUINEA GRASS, GREEN SYNTHESIS, PANICUM MAXIMUM.

DESCRIPTION:

The synthesis of nanostructures from plant extracts has become a novel alternative when obtaining bioactive nanoparticles with low toxicity. Recent studies have reported that the green synthesis of different metal nanostructures have shown many advantages over classical methods, such as better cost-benefit ratio, non-toxicity and that are more environmentally friendly.

The present work condenses the results of the process of synthesis of gold nanoparticles, AuNPs, using guinea grass extract, EPG, as a reducing and stabilizing agent. After that, it proceeds to the subsequent characterization. The investigation was carried out in four stages. First, the obtaining and partial purification of the EPG. Second, the evaluation of optimal synthesis parameters such as the mass ratio of the precursors, the effect of temperature, and the effect of pH. Finally, the synthesis of the AuNPs by chemical reduction, as well as their characterization, were carried out by Uv-vis, Z Potential, DLS and SEM spectroscopic techniques.

Introducción

La nanotecnología es una de las áreas más activas en la ciencia moderna debido a su incidencia en otras disciplinas como la bioquímica, fisicoquímica, electrónica, medicina y tecnología por lo cual se ha consolidado como un campo interdisciplinar. En este campo la síntesis de nanoestructuras, específicamente la producción de nanopartículas metálicas, NPs, ocupa un lugar muy importante ya que las propiedades novedosas exhibidas por estas estructuras presentan aplicabilidad en ámbitos como la innovación de materiales, la medicina y el desarrollo tecnológico. (Ramaswamy, Sivaraj, Suji C.M, & Vanathi, 2015).

La producción de NPs metálicas se vale de una amplia gama de métodos físicos, químicos y de bio-reducción, dentro de los cuales, los métodos de bio-reducción representan un área innovadora de investigación debido a que emplean sistemas como microorganismos y plantas o extractos de plantas. Frente a los métodos clásicos los métodos verdes o de bio-reducción han mostrado muchas ventajas: mejoran la relación costo-beneficio, no presentan toxicidad y son más amigables con el ambiente.

Actualmente existen varios reportes en la literatura sobre el empleo de extractos de plantas en la síntesis de nanopartículas metálicas, por ejemplo, se han obtenido nanopartículas de plata con diámetros desde 5 nm empleando extracto de eucalipto rojo (*Eucalyptus camaldulensis*) y hasta 57.9 nm usando cilantro (*Coriandrum sativum*). Para el caso de nanopartículas de oro (AuNPs) se han reportado coloides con un diámetro de 3 nm a partir de extracto de betel (*Piper betle*) hasta 73 nm con sumo de jambolán (*Syzygium cumini*). También se han podido sintetizar nanopartículas de otros metales nobles, como platino y paladio, siguiendo estas rutas verdes, pero sin lugar a dudas son las nanoestructuras de oro de especial interés debido a sus múltiples aplicaciones en campos que van desde la catálisis hasta el diagnóstico de enfermedades, incluyendo la nanoelectrónica y la genómica (Akhtar, Panwar, & Yun, 2013).

La utilización de extractos de plantas en la obtención de NPs está en continua exploración debido a la rica biodiversidad que ofrece este reino de la naturaleza. Por ejemplo, la *Armoracia rusticana* (rábano picante) es una planta ampliamente conocida por su gran poder reductor atribuido a la actividad de la enzima peroxidasa, pero también se conocen de otras fuentes vegetales como las plantas tropicales, Palma Real y el pasto Guinea, cuya actividad peroxidásica ha sido comprobada (Centeno, Solano, & Castillo, 2017)-

El presente trabajo permitió obtener nanoestructuras de oro usando del extracto de Pasto Guinea como agente reductor y estabilizador; lo cual hasta el momento no ha sido reportado. La metodología de síntesis implementada dio como resultado AuNPs con un tamaño alrededor de 35,05 nm, el cual fue evidenciado en los análisis por DLS y SEM. Estas nanoestructuras de morfología esférica mostraron ser moderadamente estables, con valores de Potencial Zeta de 50,08 mV. La ruta de sintética empleada permitió establecer fácilmente algunos parámetros de reacción como relación de masa entre las especies reaccionantes (EPG: HAuCl_4), temperatura de reacción y pH de medio. Notablemente, la implementación de este tipo de síntesis en la obtención de nanoestructuras hace posible el uso de precursores vegetales de fácil acceso que en su mayoría crecen como maleza como es el caso de Pasto Guinea.

1. Antecedentes

El estudio y conocimiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas de las AuNPs es un fenómeno científico relativamente nuevo, sin embargo uno de los primeros materiales sintetizados, del que se tiene conocimiento, es una suspensión de nanopartículas de oro. Un ejemplo de esto, se encuentra en la China del 2500 AC, donde hay registros de aplicaciones de la suspensión de oro en medicina, asimismo en el siglo XVI dicha sustancia se convirtió en el principal medicamento para el tratamiento de la epilepsia, y en el siglo XIX se usó ampliamente para combatir la sífilis. No obstante, fue Faraday quien preparó oficialmente oro coloidal en 1856 y lo llamó “metal dividido”. Luego, en 1890, el bacteriólogo alemán Robert Koch descubrió que los compuestos elaborados con oro inhiben el crecimiento de bacterias, por lo que ganó el premio Nobel de Medicina en 1905 (Noruzi, 2015).

A pesar de que existen menciones históricas, el desarrollo científico de las AuNPs tomó tiempo en iniciar y, más tiempo aún en el caso de las AuNPs obtenidas por síntesis verde. Esto sorprende de manera más notoria, si consideramos que 59 años atrás se reconoció la nanotecnología como una nueva área de estudio para la ciencia, cuando Richard Feynman dio el banderazo de salida al establecer la posibilidad de manejar la materia átomo por átomo. Pero solo 39 años más tarde, en 1998 con la publicación de los 12 principios de la Química Verde, que surgió el interés por la biosíntesis de materiales (Rodríguez E. , 2010).

En 2003 Shankar y col. efectuaron la primera biosíntesis de AuNPs utilizando un extracto de hoja de *Geranio spp.* como agente reductor y protector. Las nanopartículas se obtuvieron tras 48 horas de reacción y sus morfologías fueron bastante variadas, entre esféricas, triangulares y decahedrales, con tamaño de partícula entre 16-40 nm. El efecto reductor se le atribuyó a los terpenoides presentes en el extracto. Más tarde, en 2004 este grupo de investigación reportó la obtención de AuNPs a partir de extracto de hojas de *Neem* en un tiempo de reacción de 2.5 horas y con forma predominantemente esférica. Esta mejora en la síntesis

se le atribuyó a la gran abundancia de grupos terpenoides presentes en la planta. En la siguiente década se reportaron varios estudios sobre síntesis de AuNPs que utilizaron extractos de partes de plantas como hojas, flores o raíces. Por ejemplo, en 2006 Chandran y col., emplearon hojas de *Aloe vera* para obtener AuNPs, luego de 25 horas de reacción, con un tamaño de 50-350 nm y morfologías esféricas, triangulares y hexagonal. Un estudio similar realizado en 2008 por Vilchis-Nestor y col., utilizaron hojas de té verde (*Camellia sinensis*) como agente reductor y estabilizador en la síntesis de AuNPs con un tiempo de reacción de 24 horas, un tamaño de partícula promedio de 40 nm y formas triangulares y esféricas. Kumar Das y Gogoi usaron en 2011 un extracto de flores de *Nyctanthes arbortristis*, planta muy conocida en la medicina de India, para producir AuNPs con un tamaño de 19.8 nm en un tiempo de reacción de 30 minutos y con una morfología esférica, además estas nanoestructuras resultaron estables por cerca de 6 meses. Recientemente se han reportado investigaciones en las que se usan los frutos de la planta como es el caso de Rajan y col., quienes en 2014 aprovecharon los frutos de la *Garcinia cambogia* para hacer un extracto que fue empleado para obtener AuNPs anisotrópicas con tamaños de 12, 16 y 21 nm y con un tiempo de reacción de 150 minutos que presentaron una estabilidad por alrededor de 2 meses (Akhtar, Panwar, & Yun, 2013; Noruzi, 2015).

La gran mayoría de estudios sobre síntesis verde de nanopartículas se han centrado en la utilización de extractos de plantas sin purificación. No obstante existen estudios que reportan la utilización de un componente del extracto, como Mishra y col., quienes sintetizaron AuNPs usando peroxidasa, cuya fuente vegetal es el rábano picante, obtuvieron tamaños de partícula entre 20-80 nm, con formas anisotrópicas, a las 12 horas de reacción, y determinaron que los residuos de aminoácidos presentes en la enzima, como ser, thr, arg, gly y lys, podrían estar implicados en la reducción de los iones Au^{+3} (Mishra, Singh, & Sardar, 2015). Por otro lado, se ha venido estudiando la actividad peroxidasa de las plantas tropicales, como muestran en su trabajo Sakharov y col, quienes aislaron una peroxidasa, altamente termoestable, de las hojas

de la palma real (RPTP). Actualmente Castillo y col. presentan otro ejemplo de peroxidasa en plantas tropicales, tal y como lo registran en su trabajo de inmovilización de peroxidasa extraída del pasto Guinea (*Panicum maximum*) para la construcción de un biosensor amperométrico (Centeno, Solano, & Castillo, 2017).

Este recorrido por diferentes trabajos científicos claves para el campo ofrece un panorama general de lo que se ha hecho hasta el momento en cuanto a síntesis de AuNPs con plantas, y permite vislumbrar el camino hacia el uso de extractos de plantas tropicales como precursores más económicos, con alta biodisponibilidad y amigables con la vida en el planeta.

2. Marco teórico

2.1. Nanopartículas

Las nanopartículas son eslabones de construcción diminutos que actúan como un punto de comunicación entre las moléculas y los sistemas macroscópicos, tanto así que están definidas como “la unidad más pequeña que aún puede comportarse como una unidad completa en términos de propiedades y transporte” (López, y otros, 2013). La IUPAC define una nanopartícula en el siguiente término: “partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros, a menudo es restringido a las llamadas partículas nanométricas”. La definición de una nanopartícula está sujeta a debate y aunque puede parecer obvio que una nanopartícula debería tener simplemente un tamaño de partícula medido en nanómetros, muchas definiciones limitan una nanopartícula a tener al menos una dimensión inferior a 100 nm (Howard, 2010).

- ✓ Estructuras de dimensión cero (0D). Las tres dimensiones son nanométricas, como, por ejemplo, los puntos cuánticos.
- ✓ Estructuras de una dimensión (1D). Solo una dimensión es nanométrica y presenta una longitud variable, como los nanoalambres y nanotubos.
- ✓ Estructura de dos dimensiones (2D). Poseen dos longitudes que no son nanométricas y constituyen áreas definidas, pero mantienen un espesor nanométrico. Tal es el caso de las películas delgadas.
- ✓ Estructuras de tres dimensiones (3D). Este es el caso de macro estructuras masivas o bulks, cuyas dimensiones están arriba de la escala nanométrica pero se componen de nanopartículas, como por ejemplo, las superredes tridimensionales de nanopartículas.

El tamaño nanométrico así como la morfología que adoptan dichas nanoestructuras es en gran medida responsable de las propiedades optoelectrónicas, magnéticas, mecánicas y químicas que exhiben y que difieren notablemente del mismo material a una escala de tamaño macroscópica (Li, y otros, 2014).

2.2. Métodos de Obtención

En general existen dos rutas para la preparación de nanopartículas metálicas, la disminución de materiales de gran tamaño, conocida como top-down, o la construcción a partir de átomos y moléculas, denominada bottom-up. Las rutas top-down no son la mejor opción para preparar nanoestructuras metálicas, ya que no se obtienen partículas homogéneas en forma y tamaño, y además los tamaños menores a 10 nm son especialmente difíciles de sintetizar. Por el contrario, las rutas bottom-up resultan ser la mejor opción para obtener nanopartículas homogéneas y de tamaños pequeños. Estas rutas incluyen tanto los métodos clásicos, físicos y químico, como los métodos modernos de síntesis verde, que involucran microorganismos y plantas (López, y otros, 2013; Noruzi, 2015).

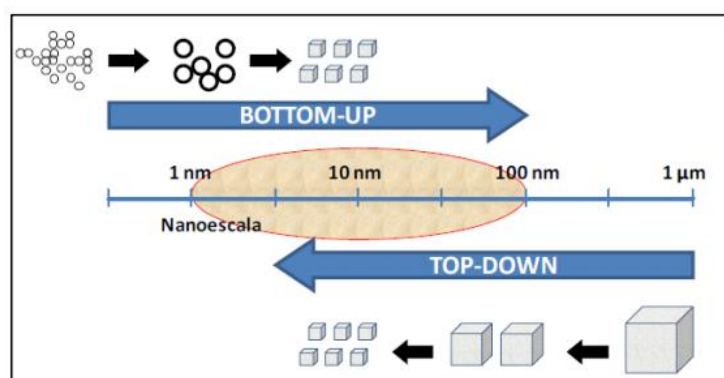


Figura 1. Rutas de síntesis de nanopartículas metálicas
Fuente: (De Lamo, 2015)

Los métodos físicos son procesos donde no hay precursor pues se comienza con el mismo material que se desea obtener. Entre los más comunes está el aleado mecánico, que involucra la deformación, fractura y soldadura de partículas finas que están sujetas a una molienda constante. También se encuentra la ablación láser, que consiste en hacer incidir un láser de alta potencia de manera pulsada sobre la superficie de un blanco sólido. Otros métodos incluyen la exposición a altas temperaturas como la termólisis, que utiliza temperaturas cercanas a los 200°C para descomponer sólidos hasta obtener nanopartículas (López, y otros, 2013).

Entre los métodos químicos más comunes se encuentran el sol-gel, en el que hay una transición de redes a través de la formación de una suspensión coloidal (sol) y posteriormente una gelificación del sol para formar una red en fase líquida continua (gel). Otro de los métodos convencionales es la reducción química, método es bien conocido y ampliamente usado, dada su versatilidad y facilidad si se tienen los precursores metálicos y agentes reductores adecuados. El principio básico de este proceso es la reducción de una sal metálica precursora a átomos cero-valentes del metal, que actúan como centros de nucleación, lo que da lugar a la formación de un clúster cuyo crecimiento continuará a medida que se sigan agregando más átomos (López, y otros, 2013; Sifontes, y otros, 2010).

Finalmente, están los métodos de síntesis verde, también llamados de biorreducción, que abarcan la utilización de sistemas biológicos vivos como microorganismos y plantas, así como la utilización de extractos de partes de plantas. Sharma y col. establecen en 2015 que una síntesis extracelular es la que emplea extractos de plantas, mientras que una síntesis intracelular es llevada a cabo por sistemas biológicos vivos que actúan como “bio-laboratorios”; tal es el caso de las *Algas* o la *Penicillium rugulosum*, organismos que producen AuNPs al metabolizar los iones del metal que son añadidos al medio de cultivo en condiciones controladas. Por otro lado, Akhtar y col. hacen una diferenciación entre biosíntesis y fitosíntesis, siendo la primera aquella síntesis basada en organismos vivos mientras que la segunda es la que emplea extractos de partes plantas. En síntesis verde la utilización de extractos de plantas es la técnica más común, primero porque es una ruta amigable con el ambiente para la síntesis química y, segundo, por presentar alta disponibilidad de biomasa que no requiere de cultivos en condiciones extremas con tiempos de reacción de minutos a horas, contrario a lo que sucede con la utilización de microorganismos o plantas *in vivo* (Akhtar, Panwar, & Yun, 2013; Noruzi, 2015; Sharma, Kanchi, & Krishna, 2015).

2.3. Pasto Guinea (*Panicum maximum*)

El pasto guinea fue renombrado científicamente en 2003 como *Megathyrsus maximus* a partir de su basónimo *Panicum maximum*. La taxonomía describe la planta como una gramínea perenne de porte alto, desarrollada en macollos aislados que pueden alcanzar hasta tres metros de altura, y cuya inflorescencia es una espiga abierta con ramificaciones laterales (Tovar, 2016).

JERARQUÍA TAXONÓMICA	
REINO	Plantae
PHYLUM	Magnoliophyta
CLASE	Liliopsida
ORDEN	Poales
FAMILIA	Poaceae
GÉNERO	Megathyrsus
ESPECIEM	Megathyrsus maximus



Figura 2. Ilustración y organización taxonómica de la especie *Megathyrsus maximus*.
Fuente: Catalogo de Biodiversidad de Colombia.

El pasto guinea, *Panicum maximum*, es un forraje verde originario del sur de África, que ha demostrado una excelente adaptación al trópico colombiano, soportando alturas desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm. Este pasto es de fácil y rápida fertilización, aun sin siembra controlada, por lo que es abundante en lugares cotidianos (Ruiz, Rodríguez, Pinzón, Anzola, & Castro, 2015). Es comúnmente utilizado en ganadería no solo por su alta disponibilidad sino también por su valor nutritivo en las dietas de las reses, el cual puede mejorar significativamente con regulación de las condiciones de siembra (Tovar, 2016). Dentro de la composición química de estos pastos se encuentra un alto porcentaje de proteína cruda (PC), relacionado con la presencia de peroxidases; carbohidratos, como hemicelulosa, celulosa y

lignina; minerales, cuya mayor concentración en *Panicum máximum* son fósforo y calcio; y extracto etéreo, que contiene principalmente lípidos (Molano, 2012).

2.4. Peroxidasa del Pasto Guinea (*Panicum maximum*)

Las Peroxidasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y micrororganismos, y según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular presentan los números de clasificación (E.C.1.11.1.7). Estas enzimas son parte del grupo de las oxidoreductasas que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas (donadores de hidrógeno) y utilizan como sustrato el H_2O_2 (Rodríguez N. , 2011). La superfamilia de las peroxidasas se puede clasificar en tres grandes grupos dependiendo de la homología de aminoácidos y su capacidad de unión al metal. La Clase I incluye las peroxidasas de células animales; la Clase II recoge las peroxidasas secretadas por enzimas fúngicas y, por último, la Clase III contiene las peroxidasas secretadas por plantas (Ghaemmaghami & Alemzadeh, 2010) .

Debido a su función biológica, las peroxidasas adquirieron un elevado valor comercial, lo que hace más atractiva su extracción. Las peroxidasas comercializadas actualmente se extraen del rábano picante (*A Armoracia rusticna*), y son usadas ampliamente como reactivos en síntesis orgánica, diagnóstico clínico, inmunoensayos enzimáticos y en detoxificación de compuestos fenólicos de aguas residuales (Rodríguez N. , 2011).

La actividad peroxidasa del pasto guinea, PPG, fue reportada por primera vez en 1999 por Shakarov y col., en un estudio acerca del contenido de peroxidasa de diferentes plantas tropicales en Colombia, en el cual se concluyó que las hojas de *Panicum maximum* son una fuente de peroxidasa vegetal alternativa a la disponible comercialmente; esto debido a que se encuentra fácilmente disponible y además presenta una actividad de la enzima alrededor de 980.0 U/g de hoja (Shakharov, Bautista, Shakarova, Rojas, & Pletjuschkina, 1999). Basado en

dichas propiedades y su disposición en la naturaleza, recientemente se utilizó la PPG para modificar un electrodo de grafeno con el fin de construir un biosensor amperométrico para la detección de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Centeno, Solano, & Castillo, 2017). Así se abre el camino de esta enzima hacia aplicaciones en otras áreas de la biotecnología.

2.5. Aplicaciones

Las múltiples aplicaciones de las AuNPs incluyen áreas como la catálisis, electrónica, físico-química y medicina. Las propiedades de las AuNPs pueden ser moduladas de acuerdo con las rutas de síntesis y a los agentes químicos involucrados en ellas. La biosíntesis de nanomateriales brinda sistemas con mayor biocompatibilidad debido a la presencia de especies químicas naturales que cumplen la función de reducir los iones metálicos y estabilizar las NPs ya formadas. En medicina las AuNPs son ampliamente usadas por su actividad biológica, ya que exhiben propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y anticancerígenas, entre otras. Las AuNPs actúan como supresores de las enzimas de la cadena respiratoria que son vitales para la síntesis de la pared celular de las bacterias, por lo que pueden conducir a la muerte o crecimiento estático (Sharma, Kanchi, & Krishna, 2015). Aunque las AuNPs pueden ser modificadas en sus superficies por procesos de funcionalización, en los cuales se unen otras moléculas otorgándoles mayor especificidad y selectividad, también hay reportes de estudios sobre la penetración nuclear de nanopartículas de oro sin superficies funcionalizadas. Por ejemplo, se ha reportado que AuNPs con diámetros de 1,4 nm fueron capaces de entrar en el núcleo de las células de melanoma metastásico y unir ADN con alta eficiencia (24,5% del total de nanopartículas de oro internalizadas unidas al ADN) (Alkilany & Murphy, 2010).

La absorción de las AuNPs en la región visible del espectro electromagnético y de los fenómenos de resonancia plasmónica ha permitido su aplicación en el desarrollo de biosensores de tipo óptico. Estas propiedades son aprovechadas en medicina para el diagnóstico de

enfermedades y también se han aplicado con éxito a la determinación cuantitativa de metales pesados, glucosa en sangre y plaguicidas (Noruzi, 2015).

2.6. Técnicas de Caracterización de la AuNPs

2.6.1. Espectroscopia UV-Visible. La espectroscopia de Ultravioleta Visible es usualmente la primera técnica utilizada para caracterizar AuNPs, dado que permite confirmar la formación de estas nanoestructuras al establecer la ausencia o presencia de su banda característica en el rango de 500- 600 nm, en el que la fuerte absorción propia de las AuNPs se hace máxima y da lugar a la banda de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR); dicho fenómeno es atribuido a la oscilación colectiva de electrones libres confinados en la superficie en presencia de un campo electromagnético interactivo.

La banda SPR ofrece información general acerca del tamaño y forma de las AuNPs pues, según se ha reportado en la literatura, el aumento en el tamaño de partícula provoca el aumento de la longitud de onda máxima (desplazamiento rojo), y la reducción en el tamaño de partícula conduce a la disminución de la longitud de onda máxima (desplazamiento azul). Asimismo, las bandas asimétricas y anchas de SPR podrían indicar la formación de nanopartículas anisotrópicas (Noruzi, 2015).

2.6.2. Dispersión de la Luz en Modo Dinámico (DLS). DLS es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región de 1-100 nm. Las aplicaciones habituales de la dispersión de luz dinámica son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado en un líquido. El fundamento de esta técnica se basa en el movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión que hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del

movimiento Browniano y, por lo tanto, el tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein (Zimbonea, Calcagnoa, Messinab, Baeria, & Compagninib, 2011).

2.6.3. Potencial Z. Este es un factor muy importante en la evaluación de la estabilidad de los sistemas coloidales pues permite conocer la fuerza de repulsión electrostática de las partículas involucradas, entre más elevada sea la carga de los coloides menos será su tendencia a aglomerarse y más tiempo permanecerán en solución. La técnica consiste en medir la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a la partícula dispersada, lo cual brinda información sobre la carga superficial de las partículas (Noruzi, 2015).

2.6.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Esta técnica se basa en un haz de electrones de energía elevada que barre la superficie de la muestra y en consecuencia genera una serie de señales relacionadas con la estructura atómica del material investigado. Estas señales incluyen electrones retrodispersados, secundarios y electrones Auger, fotones debidos a la fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. Los nuevos microscopios SEM utilizan como fuente de electrones un cañón de emisión de campo (Field Emission Gun, FEG) que proporcionan haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar y causar así menos daños en muestras sensibles. Este tipo de microscopía se conoce como FE-SEM (López A. , 2015). La caracterización por SEM proporciona una visión de la morfología de las nanopartículas y permite al obtener una estimación de la composición (Noruzi, 2015).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Obtener AuNPs empleando el extracto vegetal de pasto guinea (*Panicum maximum*) como agente reductor y estabilizador.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar AuNPs de tamaños entre 1 y 100 nm por reducción química usando el extracto de pasto guinea como agente reductor y estabilizador.
- ✓ Establecer los parámetros óptimos de la reacción como relación de masa de los precursores, temperatura y pH.
- ✓ Caracterizar las AuNPs por métodos físico-químicos empleando las técnicas microscópicas y espectroscópicas de Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS), absorción Ultravioleta Visible y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

4. Metodología

La metodología utilizada se desarrolló en un proceso de tres etapas, tal y como se muestra en la figura 3. La primera etapa ilustra todo el procedimiento de obtención del EPG semipurificado, luego se esboza la síntesis de las AuNPs a partir del EPG, así como la ruta empleada para determinar los mejores parámetros en esta, y, por último, en la etapa tres se describen las técnicas analíticas utilizadas para caracterizar el material.



Figura 3. Esquema general de la metodología que se implementó para la síntesis y caracterización de las AuNPs.

Fuente: Autor

4.1. Materiales y Métodos

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron reactivos de grado analítico (Tabla 1) principalmente en la etapa de extracción, y el extracto aquí obtenido luego se empleó como un reactivo para la etapa de síntesis de AuNPs.

Tabla 1.

Lista de reactivos de grado analítico utilizados a lo largo del proceso experimental de la presente investigación.

Reactivo	Formula	Laboratorio
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Sulfato de amonio al 10% p/v	$((NH_4)_2)SO_4$	Merck KGaA
Polietilenglicol PEG (15 000-20 000)		Merck KGaA
Peróxido de hidrogeno al 30%	H_2O_2	PanReac Applichem
Guayacol		Sigma-Aldrich
Ácido cloroáurico trihidratado	$HAuCl_4$	Sigma-Aldrich

4.2. Preparación del Extracto de Pasto Guinea EPG

El extracto de pasto guinea (*Panicum maximum*), PPG, parcialmente purificado, se obtuvo según el protocolo establecido en el laboratorio del Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología, GIBIM (Centeno, Solano, & Castillo, 2017). Este protocolo sigue un proceso de cuatro fases fundamentales: extracto crudo, eliminación de pigmentos, separación mediante cromatografía por exclusión de tamaño y concentración por ultrafiltración.

La fase del extracto crudo incluye el corte del pasto, destrucción mecánica de membranas y extracción con buffer fosfatos. Luego se eliminan los pigmentos característicos de la planta utilizando la técnica de reparto bifásico separando los pigmentos de las proteínas por acción del PEG y $((NH_4)_2)SO_4$. Seguidamente se realiza separación en fracciones de todo el volumen del extracto por cromatografía de exclusión por tamaño, para determinar aquellas con mayor actividad peroxidasa. Por último, se concentró la solución con ultrafiltración usando amicones de 35 kDa.

4.3. Síntesis de AuNPs

En esta síntesis se siguió una ruta bottom-up por reducción del ácido cloroáurico (HAuCl_4) usando EPG como agente reductor y estabilizador. A 500 μL de HAuCl_4 (0,34mg/ml) se adicionaron 500 μL del EPG en un rango de concentración entre 6 mg y 34 mg, de acuerdo a estudios previos reportados, bajo agitación constante. La síntesis se llevó a cabo partiendo de la fracción del extracto con mayor contenido de peroxidasa, de acuerdo al estudio hecho por Centeno y col. Luego, se estudió la relación HAuCl_4 a EPG en términos de masa requerida para lograr la reducción del Au^{3+} en solución, para lo cual fue preciso liofilizar previamente el EPG.

4.3.1. Parámetros Evaluados en la Síntesis

✓ Relación de masa de los precursores

Se estableció una relación masa entre HAuCl_4 y el EPG. Partiendo de una solución de HAuCl_4 (0,34 mg/ml) y se fijaron concentraciones de 6, 8, 12, 24 y 34 mg/mL del EPG liofilizado (Noruzi, 2015). Se tomaron alícuotas de 100 μL cada 15 minutos después de adicionado el EPG y se realizó el seguimiento de cada ensayo de reacción empleando espectroscopia UV-Vis con el fin de observar la aparición una banda de absorción alrededor de 540 nm, correspondiente a la banda de resonancia plasmónica superficial (SPR) característica de AuNPs.

✓ Efecto de la temperatura

Para analizar este parámetro, la reacción de reducción se realizó en un rango entre 30°C y 70°C, teniendo en cuenta que la actividad de las peroxidasas aumenta por encima de 30°C y disminuye al desnaturalizarse por encima de 70°C. Estas consideraciones se realizaron ya que la mayor composición del extracto viene dada por una peroxidasa (Mizobutsi, y otros, 2010).

✓ Efecto del pH del EPG

Los valores de pH evaluados fueron aquellos donde, de acuerdo con la literatura existente, se conserva la estructura nativa y mayor actividad de la peroxidasa. Los valores de pH a evaluar son 7.5, 8.0 y 8.5 (Centeno, Solano, & Castillo, 2017).

4.4. Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas

4.4.1. Espectroscopia de Ultravioleta Visible. Para este análisis se usó un equipo espectrofotómetro marca Shimadzu UV-2600, en un rango de 300-800 nm, con una lámpara de halógeno de 50 W y un rango espectral de 220--1400 nm. Para esta medida se utilizaron microceldas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm y se usó como referencia el extracto semipurificado.

4.4.2. Dispersión de la luz en modo dinámico. Con esta medición se determinó la dispersión de los tamaños hidrodinámicos presentes en las AuNPs sintetizadas, para lo cual se usó un equipo zetasizer Nano ZS90 con un láser de He-Ne a 633 nm y potencia de 100 VA. Para tomar las mediciones se utilizó una celda polimérica DTS0012 a una temperatura de 18.0°C y el medio dispersante fue el agua.

4.4.3. Potencial Z. Este análisis se realizó en un equipo zetasizer Nano ZS90, analizador de tamaño/molecular y de potencial Z, utilizando una celda DTS1070 con una constante dieléctrica 78.5 y con un ángulo de dispersión de 90°, con el fin de conocer el potencial zeta el cual está relacionado con la estabilidad por repulsión electrostática de los sistemas formados.

4.4.4. Microscopía de barrido electrónico. Para conocer la morfología del sistema nanoestructurado obtenido se depositaron 2.0 µL de AuNPs en solución en un grid, se dejó secar a temperatura ambiente y se dispuso para el análisis en un microscopio de barrido FEI

Quanta 650 FEG ambiental (ESEM) y un detector LFD de electrones secundarios para modo de bajo vacío.

5. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos, así como el análisis de estos, se presentan en tres bloques o secciones de discusión de la misma forma que se presenta la metodología. En la primera sección se indican las particularidades del proceso de extracción del EPG y algunos parámetros enzimáticos. En la segunda sección se muestran los resultados de la síntesis de AuNPs y se indican los parámetros evaluados para mejorar el proceso. Por último, en la tercera sección se presenta toda la caracterización de las nanoestructuras.

5.1. Obtención y Purificación Parcial del EPG

Para realizar la síntesis de AuNPs propuesta primero se preparó el EPG, proceso que comenzó desde el momento de la recolección del pasto Guinea (Figura 4). Las características del pasto apto para corte son hojas de aproximadamente 40 cm que presenten señales de exposición a estrés oxidativo, ya que bajo estas condiciones se encuentra un incremento de la actividad peroxidásica en plantas de hasta el 50% (Centeno, Solano, & Castillo, 2017).



Figura 4. Fotografía del pasto guinea utilizado para preparar el extracto vegetal precursor
Fuente: Autor

Una vez identificado el pasto se recogieron 144 g que pasaron por un molino para la destrucción mecánica de las células en las hojas. Luego se hizo la extracción con la solución Buffer fosfatos y se procedió a homogenizar el sistema con agitación constante por 18 horas para posteriormente filtrar, separar y desechar el sólido; se reservó el filtrado (Figura 5). Para este punto se obtuvo el extracto crudo, que mantenía el color verde propio de los pigmentos vegetales, por lo que se hizo una eliminación de estos pigmentos mediante reparto bifásico utilizando una mezcla de PEG y $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ favoreciendo la formación de dos fases, una clara y una oscura (Figura 6A). La naturaleza química de las enzimas hace que se precipiten en la fase acuosa de la sal (parte clara), por tanto fue la muestra que se almacenó para continuar el experimento.



Figura 5. Primera parte del proceso extracción para la obtención del extracto crudo. A) Destrucción mecánica de la planta; B) Agitación constante buffer de extracción; C) Filtración del extracto.
Fuente: Autor

Seguidamente, se realizó la separación en fracciones de la muestra mediante cromatografía de exclusión por tamaño empleando sephadex S-75, como fase estacionaria, y TRIS-básica como fase móvil y equilibrante que permitió aislar las fracciones del extracto con más actividad peroxidásica (Figura 6). Por último se usó la ultrafiltración como técnica de concentración, en la que se hizo pasar por unos amicones de 35 kDa, para garantizar que todas las moléculas en solución sean de tamaños menores a esta medida.



Figura 6. Segunda parte del proceso extracción para la separación en fracciones del extracto según su actividad peroxidásica. A) Eliminación de pigmentos; B) Equipo purificador de proteínas Bio-Rad Biologic; C) Fracciones recolectadas
Fuente: Autor

Todo el proceso de obtención del EPG se resume en la Tabla 2. Allí se reflejan los parámetros enzimáticos de la purificación como el rendimiento y la eficiencia en cada etapa. Aunque era de esperarse que un procedimiento en el que se trabajan sustancias provenientes de material vivo el rendimiento disminuya sin salir del rango aceptable 25%--35%, el valor de rendimiento obtenido en esta purificación estuvo por debajo de este rango, 20,69%, lo que implicó que en este EPG había una baja presencia de peroxidasa.

Sin embargo, al realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturizantes de la proteína, se ve expresada una banda particular que se presenta de cada una de las etapas reportadas en la Tabla 2, la cual se hace más fina a lo largo del proceso de extracción y permite constatar el grado de pureza del EPG obtenido. Con este análisis también se determinó el peso molecular de la proteína en estudio, al comparar la corrida electroforética con un marcador molecular comercial y al tener la HRP como patrón (Figura 7). El resultado deja ver una banda tenue entre los 25 y los 35 kDa que es el rango característico de las peroxidasas de Clase III o de origen vegetal. Con todo lo anterior, se puede afirmar la presencia de la peroxidasa en el extracto, pero sin llegar a exhibir una alta concentración.

Tabla 2.

Etapas del proceso de obtención del EPG: Tabla de purificación parcial. Fuente: La autora.

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	% Rendimiento
Extracto crudo	288	101,9	56,7	16329,23	160,28	1	100
Eliminación de pigmentos	176	66,26	83,8	14752,44	222,65	1,39	90,34
Separación Cromatografía	48	28,15	95,15	4567,31	162,25	1,01	27,97
Ultrafiltración	18	12,16	187,73	3379,13	277,9	1,73	20,69

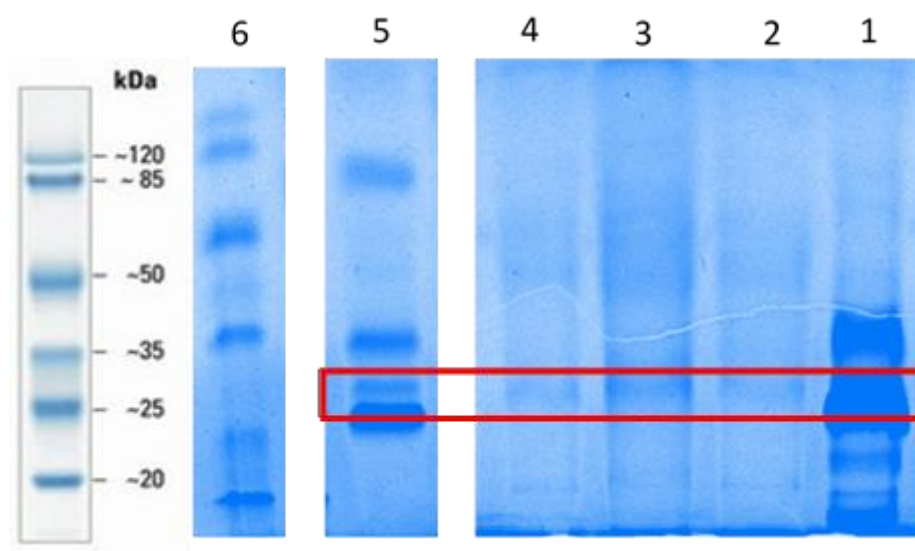


Figura 7. Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) al 8%. Carril 1: extracto crudo. Carril 2: eliminación de pigmentos. Carril 3: separación por cromatografía. Carril 4: ultrafiltración. Carril 5: HRP. Carril 6: Marcado Thermo Scientific 26612

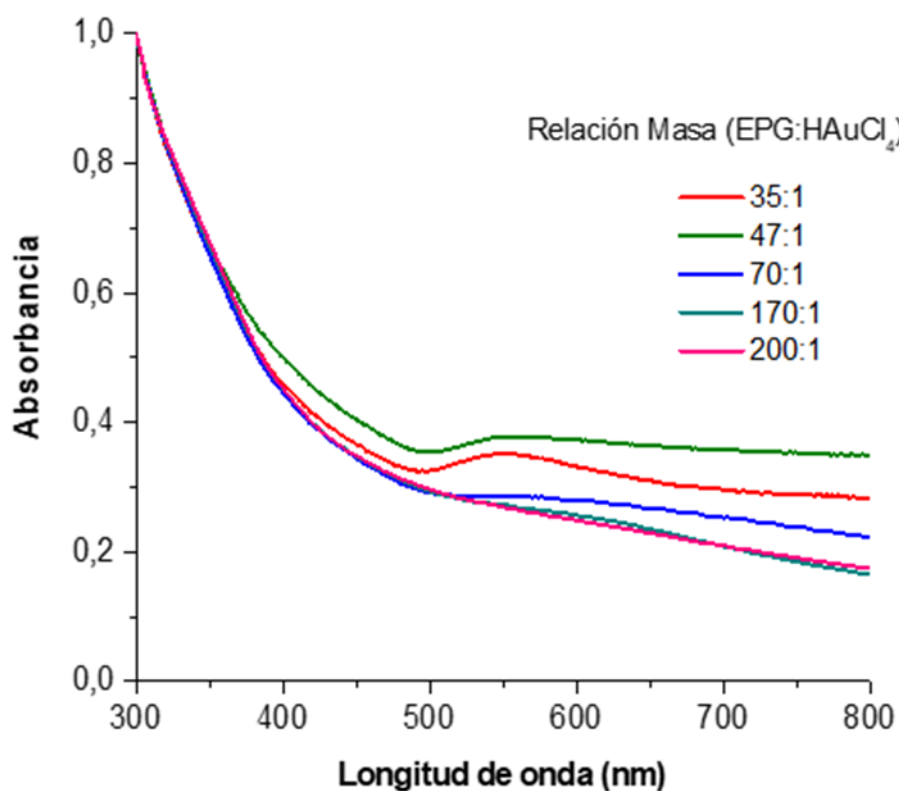
5.2. Síntesis y determinación de parámetros de síntesis.

Para determinar las condiciones más favorables en la síntesis de AuNPs se estudió la mejor relación de masa del EPG respecto a una solución de HAuCl_4 (0,34 mg/mL) así como la influencia de la temperatura y el pH.

En la determinación de la proporción EPG/HAuCl₄ adecuada, se estableció usar 500 µL de HAuCl₄ 0,34 mg/mL porque es la cantidad limitante de precursor para que se formen NPs sin que haya aglomeración y agregación, es decir, una nucleación continua. Por otro lado para facilitar la determinación de la concentración del EPG a utilizar, se liofilizó el extracto ya que en solución no se conoce la cantidad de proteína por 1 ml presente, además la eliminación de solvente mejora su preservación.

Del extracto liofilizado, se tomaron las cantidades de masa como se muestran en Tabla 3 y se resuspendieron en 500 µL de agua Tipo 1. Este experimento se hizo con agitación constante, de 300 rpm y T ambiente.

De acuerdo con la figura 8, la mejor relación a la cual se formaron AuNPs es la **B** ya que es donde se observa de forma clara la banda fuerte de absorbancia característica de estas nanoestructuras, aproximadamente sobre los 540 nm y que para **B** aparece en 555 nm, tal desplazamiento hacia el rojo se ve influenciado por el tamaño de las partículas formadas, lo cual es coherente con lo reportado en la literatura sobre bajas concentraciones de peroxidasa de rábano picante, HRP, que favorecen la síntesis de NPs. En cuanto a la definición de la SPR puede deberse a la una morfología esférica de las NPs. En las relaciones **A**, **C**, **D** y **E** se observa muy tenue o casi nula formación de la banda SPR que sugiere la sobresaturación de estos sistemas acuosos por la cantidad de masa del EPG disponible en solución. Este exceso del agente reductor ocasiona que el tamaño de partícula aumente debido a que muy rápidamente el extracto rodea a los iones Au⁺³, para formar núcleos o conglomerados más grandes que se ven favorecidos con un crecimiento cristalino (Rodríguez E. , 2010).



Grafica 1. Comparativa de la formación de la SPR característica de las AuNPs para cada proporción de los precursores EPG/HAuCl₄ evaluada.

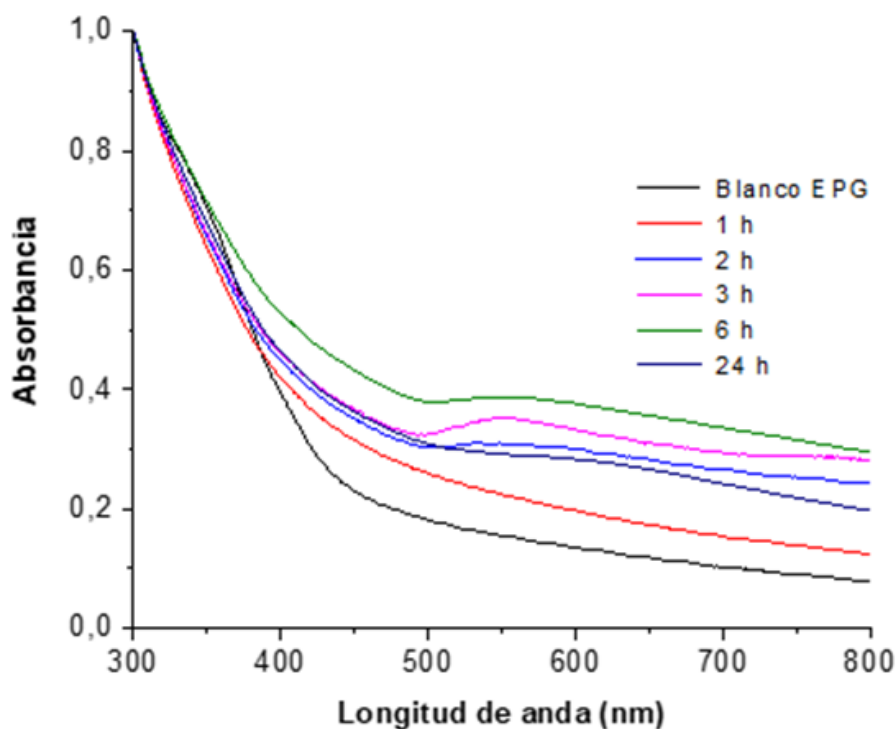
Fuente: Autor

Tabla 3.

Masas del EPG y sus respectivas proporciones EPG/HAuCl₄ evaluadas para la formación de las AuNPs.

Ítem	Masa del EPG (mg)	Proporción EPG/HAuCl ₄
A	8	47:1
B	6	35:1
C	12	70:1
D	24	140:1
E	34	200:1

Fuente: Autor



Grafica 2. Estudio del tiempo de formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl₄ 35:1.
Fuente: Autor

En la figura 9, se muestran los resultados de análisis UV-Vis para establecer el tiempo de formación de las AuNPs utilizando la proporción 35:1, seleccionada anteriormente como la mejor relación EPG/HAuCl₄. Este experimento se llevó a cabo manteniendo las condiciones iniciales de agitación constante, de 300 rpm y T ambiente. Así se observa que transcurridas las 3 horas de reacción, el plasmón de resonancia superficial se hace más notorio. Llega a un máximo transcurridas las 6 horas y después empieza a decaer, tal disminución de la banda se debe a que el medio en que se formaron las AuNPs no las mantiene estables. Con la intención de mejorar el tiempo de reacción y la eficiencia en la formación de AuNPs, se realizó un experimento con la agitación constante, a 300 rpm pero con T variable (Figura 10).

El efecto de la temperatura sobre la formación de las AuNPs permitió establecer que 30°C es la T óptima, pero esto no es posible determinarlo únicamente a partir del análisis Uv-vis (Figura 10), ya que es preciso tener en cuenta dos factores: la energía de activación asociada al mecanismo de formación de las AuNPs y la descomposición del extracto. De este modo, se tiene que en todo proceso de síntesis de NPs en fase líquida comprende la etapa de nucleación la cual requiere alta energía de activación y un posterior crecimiento que conlleva a un decaimiento en la energía de activación. Así, una alta temperatura puede favorecer la eficacia y la rapidez de la formación pero no el crecimiento, por lo cual se obtienen estructuras metálicas que continúan su nucleación hasta la agregación. También debe considerarse que la temperatura afecta la estabilidad del extracto y su capacidad de actuar como agente oxidoreductor atribuido a la presencia de las peroxidasas y que su actividad es dependiente de la temperatura, como es mencionado anteriormente en el ítem 5.2.3.

Al determinar el efecto de la temperatura en la formación de las AuNPs, se analizaron por UV-Vis las nanoestructuras formadas en las temperaturas propuestas en 5.2.3. En la figura 10 se observan los resultados obtenidos después de analizarlos por UV-Vis. De acuerdo a estos resultados la temperatura ideal para la formación de nanopartículas de oro es de 30 °C, lo cual se puede corroborar con las fotografías de la figura 11, en donde se observan precipitados a 70°C, 60°C, 50°C y 40°C, lo que indica que al trabajar en estas temperaturas, se sintetizan nanoestructuras altamente inestables, aunque con tiempos de formación más cortos (tabla 4). Además, debido a un crecimiento descontrolado sobre los 70°C, ya se puede asumir la desnaturalización de biomoléculas en el EPG. Cabe resaltar que en la figura 11 al observar la muestra a 30°C no se aprecian precipitados, lo cual indica que a esta temperatura las AuNPs una vez formadas presentan un proceso de nucleación controlado.

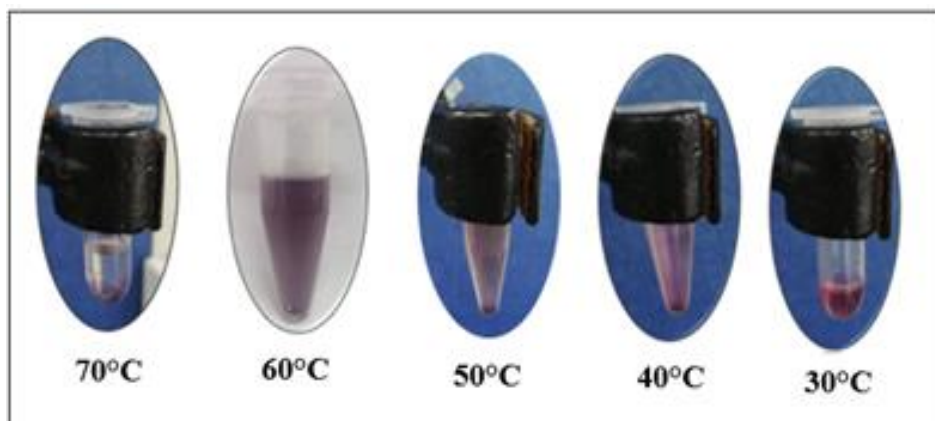
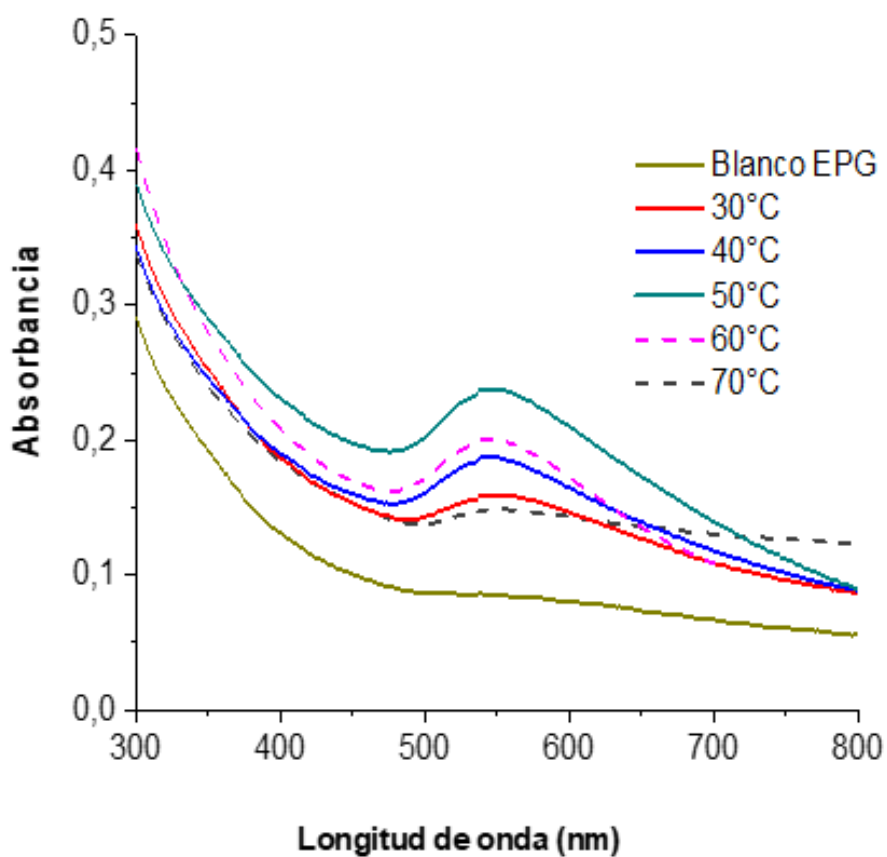


Figura 8. Apariencia de las estructuras formadas bajo el efecto de cada temperatura estudiada durante la formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl₄ 35:1
Fuente: Autor



Grafica 3. Estudio del efecto de la temperatura sobre la formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl₄ 35:1.
Fuente: Autor

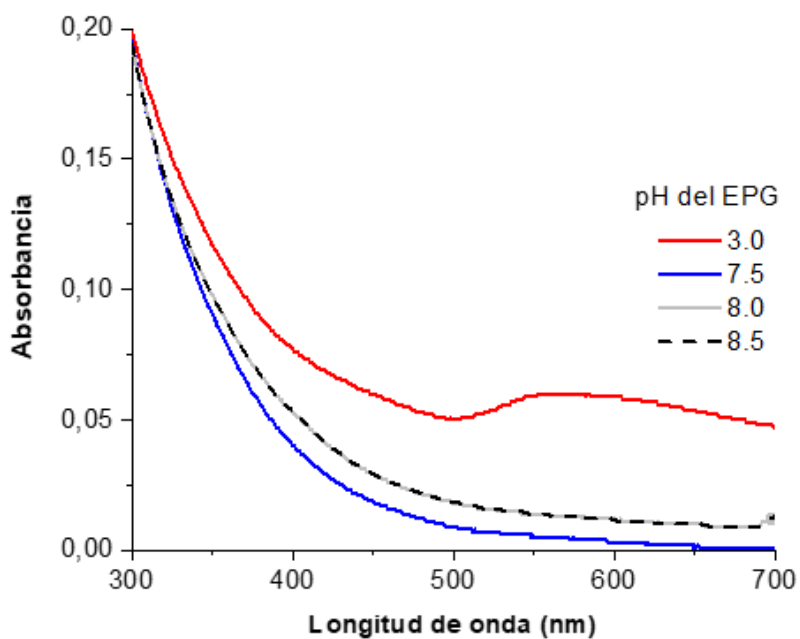
Tabla 4.

Tiempos de reacción para cada temperatura evaluada en la formación de AuNPs

T °C	Tiempo (min)
30	90
40	65
50	50
60	15
70	10

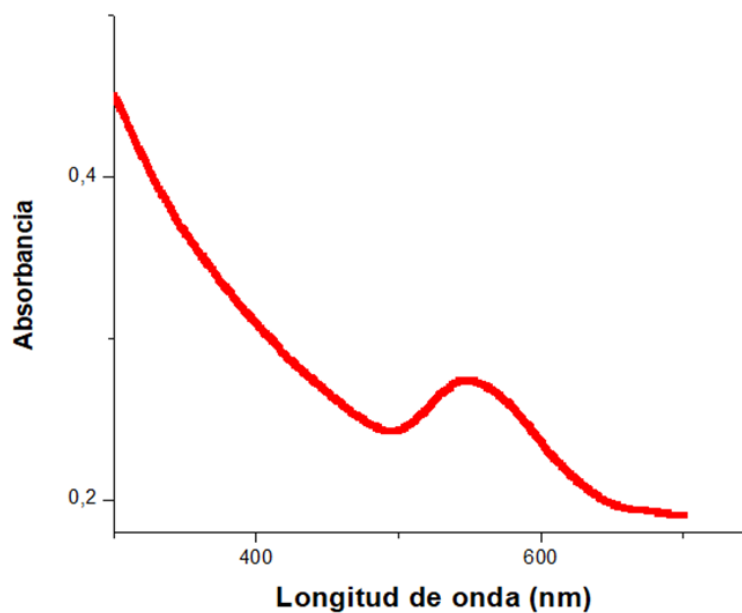
Fuente: Autor

Por último, se evaluó efecto del pH del extracto EPG en un rango de valores propuesto en el ítem 5.2.3. Como se observa en la figura 12, el espectro UV-Vis para los ensayos realizados a pH básicos no presenta banda de SPR, por lo cual se infiere que estos valores de pH no favorecen la obtención de AuNPs. A pH ácido (3.0), se observó rápidamente un cambio de coloración de la solución y la aparición de una banda de absorción en 555 nm en el espectro UV-Vis. Este resultado positivo para la síntesis de AuNPs a pH ácido resulta inesperado respecto al pH óptimo para la actividad de las peroxidasas presentes en el extracto difiere de lo esperado puesto que inicialmente se consideraba que al favorecer la mayor actividad de estas proteínas podría mejorar la reducción de los iones oro con el EPG. Sin, embargo debe discutirse a mayor profundidad y con otros estudios si otra región de las peroxidasas podría estar reduciendo y estabilizando los AuNPs, lo que es posible considerando que la presencia de aminoácidos como Tirosina, triptófano, fenilalanina y cisteína facilitan las reacciones de este tipo. Adicionalmente, el EPG presenta otras especies químicas en solución como azúcares y carbohidratos que estarían también involucradas en el síntesis.



Grafica 4. Estudio del efecto del pH sobre la formación de las AuNPs con la proporción EPG/HAuCl₄ 35:1.
Fuente: Autor

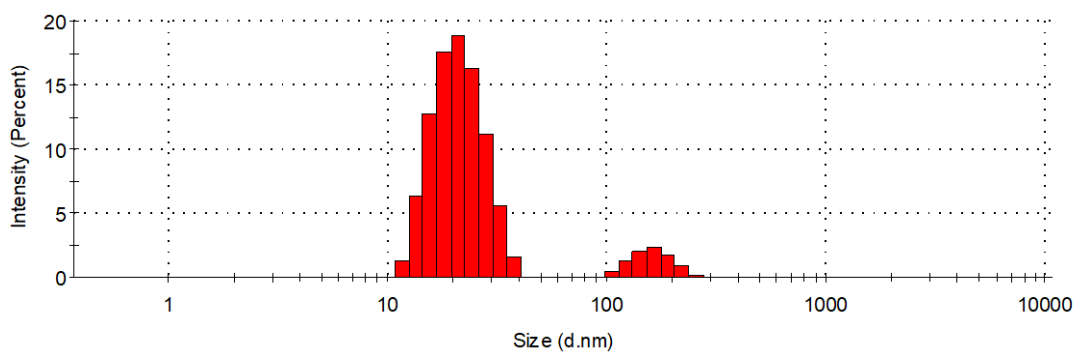
De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos y la variación de parámetros básicos como relación de masa (EPG: HAuCl₄), temperatura de reacción y pH del extracto, se infiere que las condiciones adecuadas para obtener nanoestructuras de oro son 35:1, 30°C y pH 3.0 (Figura 13).



Grafica 5. 11Espectro UV-vis de las AuNPs sintetizadas con relación de masa de los precursores 35:1, T=30°C y pH 3.0.
Fuente: Autor

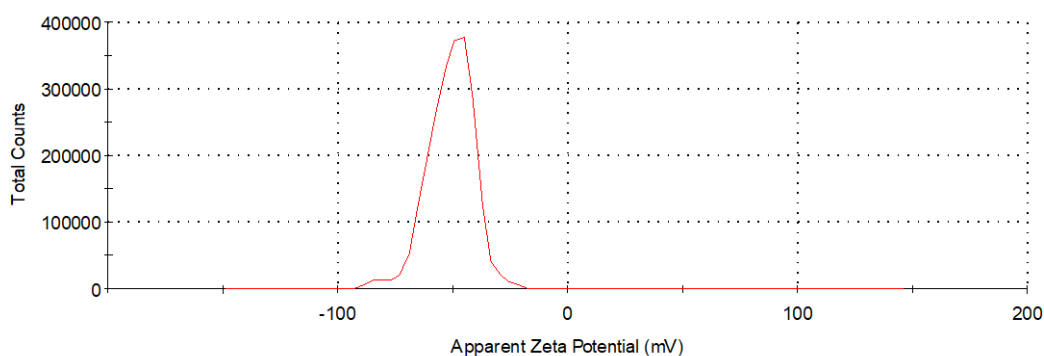
5.3. Caracterización de AuNPs

Para determinar el tamaño hidrodinámico de las AuNPs en suspensión acuosa, se realizó un análisis por dispersión de la luz en modo dinámico DLS (Figura 14). El histograma muestra dos poblaciones alrededor de 21,57 nm (91,1%) y 162,8 nm (8,9%). Pese a observarse poli dispersión, la abundancia de nanoparticulas inferiores a 100 nm es notable.



Grafica 6. Distribución de tamaños por DLS de las AuNP, con promedio de 35,05 nms.
Fuente: Autor

Se midió la estabilidad electrostática del sistema coloidal usando un zetametro. El valor de potencial Zeta medido fue de 50.8 mV, lo cual evidencia alta estabilidad por repulsión electrostática entre los *corels* de átomos de Au reducidos (Figura 15). Este número del valor absoluto muestra una tendencia de las AuNPs a repelerse entre sí, evitando la floculación, además su signo negativo puede ser un indicio de la baja capacidad de internalización del material en membranas celulares para aplicaciones biológicas, aunque no es la única determinante.



Grafica 7. Distribución de potencial Z de las AuNPs.
Fuente: Autor

Por último, se adquirieron las microfotografías de las AuNPs como se muestran en la figura 16, donde se observan nanoestructuras morfológicamente heterogénea, mayoritariamente esféricas y en menores proporciones triangulares y romboédricas. Lo cual infiere que el control de los parámetros de reacción favorecerá una u otras formas de acuerdo a lo reportado en la literatura.

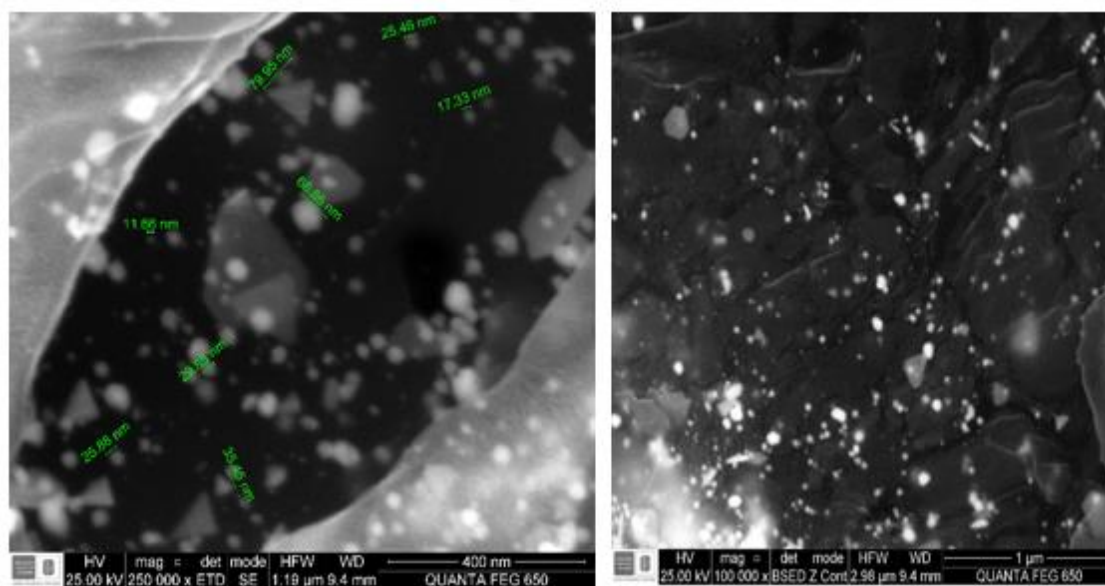


Figura 9. Micrografía SEM de las AuNPs sintetizadas a partir del EPG bajo las condiciones de T 30°C; pH 3 y relación EPG/HAuCl₄ de 35:1.

6. Conclusiones

Se logró extraer y purificar el extracto de pasto guinea (EPG) con un rendimiento del 20,69% y una actividad peroxidasa 277,9 U/mg siguiendo la metodología propuesta el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM). Aunque el este rendimiento EPG resultó ser bajo comparado con lo reportado en la literatura fue eficaz para obtención por una ruta de síntesis verde de AuNPs con morfología esférica mayoritariamente, altamente estables (50 mV Potencial zeta) y con un tamaño promedio de 35,05 nm.

Se fijaron parámetros adecuados para obtener AuNPs usando EPG como agente reductor y estabilizador los cuales fueron: temperatura de reacción igual a 30°C, pH del EPG igual 3.0, y una la relación de 35:1 de EPG: HAuCl₄ bajo agitación constante.

Se puede inferir de los resultados respecto al efecto del pH que aunque las proteínas peroxidasas se encuentra mayoritariamente en el extracto, otras especies químicas como azúcares y carbohidratos pueden estar involucrados en la reducción de los iones Au⁺³ a Au⁰, esto debido a que la síntesis más eficaz fue realizada con el EPG de baja actividad peroxidasa.

7. Recomendaciones

De acuerdo con a lo encontrado sobre las especies responsables del efecto reductor de las AuNPs, se recomienda realizar una caracterización exhaustiva del EPG y así elucidar un posible mecanismos de síntesis AuNPs por dicha ruta y las especies involucradas y de este modo, poder aplicarlas ya sea en fines biocatalíticos o como agentes biológicos.

En cuanto a la síntesis, se recomienda optimizar el proceso de síntesis y usar un diseño de experimentos que involucre otras variables, como el tiempo de reacción, para determinar su efecto en la morfología y el tamaño de los sistemas nanoestructurados que pueden ser obtenidos con el EPG.

Referencias Bibliográficas

- Akhtar, M., Panwar, J., & Yun, Y. (2013). Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 591-602.
- Alkilany, M., & Murphy, C. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 2313-2333.
- Centeno, D., Solano, X., & Castillo, J. (2017). A new peroxidase from leaves of guinea grass *Panicum maximum* A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*, 33-38.
- Cicek, S., Gungor, A., Adiguzel, A., & Nadaroglu, H. (2015). Biochemical Evaluation and Green Synthesis of Nano Silver Using Peroxidase from *Euphorbia* (*Euphorbia amygdaloides*) and Its Antibacterial Activity. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-7.
- De Lamo, B. (2015). Obtención y caracterización de nanopartículas de oro a partir de mostos . *Universidad de Valladolid*, 1-157.
- Ghaemmaghami, F., & Alemzadeh, I. (2010). Seed Coat Soybean Peroxidase: Extraction and Biocatalytic Properties Determination . *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 28-38.
- Howard, A. (2010). On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic. *Journal of Environmental Monitoring*, 135-142.
- Li, Z., Sun, Q., Zhu, Y., Tan, B., Xu, Z. P., & Doua, S. X. (2014). Ultra-small fluorescent inorganic nanoparticles for bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B* , 2793-2818.
- López, A. (2015). Crecimiento de nanoalambres de óxido de zinc verticalmente alineados usando el método sol-gel hidrotermal. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*, 1- 48.
- López, G., Morales, R., Olea, O., Sánchez, V., Trujillo, J., Varela, V., & Vilchis, A. (2013). *Nanoestructuras Metálicas Síntesis, Caracterización y Aplicaciones*. México: Reverté Ediciones.
- Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., & Haza, A. (2013). Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. *Acta Toxicol. Argent.*, 102-109.
- Mishra, A., Singh, P., & Sardar, M. (2015). Peroxidase assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: Characterization and computational study. *ADVANCED MATERIALS Letters*, 194-200.

- Molano, M. (2012). Caracterización Nutricional De Forrajes Tropicales Usando Espectroscopia De Infrarrojo Cercano (NIRS). Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Noruzi, M. (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. *Bioprocess Biosystems Eng*, 1-14.
- Pattanayak, M., Muralikrishna, T., & Nayak, P. (2014). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Cucumis Sativus (Cucumber) Aqueous Extract. *World Journal of Nano Science & Technology*, 59-65.
- Ramaswamy, S., Sivaraj, R., Suji C.M, M., & Vanathi, P. (2015). Role of Biogenic Synthesis of Biocompatible Nano Gold Particles and Their Potential Applications - A Review. *Journal of Pharmceutical, Chemical and Biological*, 104-109.
- Research And Markets. (16 de diciembre de 2016). Business Wire. Obtenido de Business Wire: <http://www.businesswire.com/>
- Rodríguez, E. (2010). Síntesis y caracterización de materiales bimetálicos nanoestructurados núcleo@coraza : Cu@Au, Pd@Au. Universidad de Sonora-División de Ingeniería, 1-115.
- Rodríguez, N. (2011). Expresión y Caracterización de una Peroxidasa Recombinante de Nabbo (*Brassica napus*) en un Sistema Bacteriano. Querétano: universidad Autónoma de Querétano-PROPAC.
- Ruiz, F. L., Rodríguez, E. G., Pinzón, J., Anzola, H. J., & Castro, L. F. (2015). Establecimiento y evaluación del guinea *Panicum máximum* cv. Massai en la hacienda Guachicono del Bordo, Patía (Cauca). *Ciencia Animal*, 125-154.
- Saha, K., Agasti, S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. (2012). Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*, 2739-2779.
- Shakharov, I., Bautista, G., Shakarova, I., Rojas, I., & Pletjuschkina, O. (1999). Peroxidasa de Plantas Tropicales . *Revista Colombiana de Química*, 97-106.
- Sharma, D., Kanchi, S., & Krisnha, B. (2015). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-25.
- Sifontes, A., MeloI, L., MazaI, C., Mendes, J., MediavillaI, M., BritoII, Z., . . . Alborn, A. (2010). Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polimeros estabilizantes. *Química Nova*, 12-66-1269.
- Tovar, C. (2016). Variables morfológicas y de composición nutricional en dos cultivares del pasto *Megathyrsus maximus*, Jacq sometido a una altura y diferentes frecuencias de

corte e intensidad lumínica en condiciones de Sabanas de Sucre, Colombia. Sincelejo: Universidad de Sucre.

Zimbonea, M., Calcagnoa, L., Messinab, G., Baeria, P., & Compagninib, G. (2011). Dynamic light scattering and UV–vis spectroscopy of gold nanoparticles solution. *Materials Letters*, 2906-2909.