

CUANTIFICACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS COMO AGENTES REDUCTORES EN LA SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SU EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA

M.C.A Ana Ketzaly Calvillo Anguiano

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dr. Luis Octavio Hernández Arteaga

Universidad Intercultural de San Luis Potosí

Dra. Idania De Alba Montero

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, idanialba@uaslp.mx

Dra. Alejandra Durán Almendárez

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dra. Ana Laura Ruiz Castillo

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dr. Facundo Ruiz

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

RESUMEN

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando extractos acuosos de cinco plantas medicinales: Prodigiosa (*Brickellia Cavanillesii*), Estafiate (*Artemisia Ludoviciana*), Ajenjo (*Artemisia Absinthium*), Hierba de San Nicolás (*Piqueria Trinervia*) y Geranio (*Pelargonium Domesticum*). El objetivo fue desarrollar un protocolo ecológico y de bajo costo para la producción de AgNPs con potencial aplicación en el área biomédica. Las nanopartículas se caracterizaron mediante UV-Vis, DLS y TEM. La concentración de taninos se cuantificó con el método Folin-Denis. La actividad antimicrobiana de las AgNPs y los extractos se evaluó frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*, utilizando el método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados mostraron una notable sinergia entre los extractos y las nanopartículas, siendo *Artemisia absinthium* y *Brickellia cavanillesii* las más efectivas. Este enfoque promueve la síntesis verde de nanomateriales con aplicaciones terapéuticas y antimicrobianas.

Palabras clave: Taninos, Nanopartículas de plata, síntesis verde.

Quantification of tannins in plant extracts used as reducing agents in the green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial evaluation

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized using aqueous extracts from five medicinal plants: Prodigiosa (*Brickellia cavanillesii*), Estafiate (*Artemisia ludoviciana*), Estafiate (*Artemisia absinthium*), Hierba de San Nicolás (*Piqueria trinervia*), and Geranium (*Pelargonium domesticum*). The objective was to develop an eco-friendly and low-cost protocol for AgNP production with potential biomedical applications. The nanoparticles were characterized by UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), and transmission electron microscopy (TEM). Tannin content was quantified using the Folin-Denis method. The antimicrobial activity of the AgNPs and plant extracts was evaluated against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterococcus faecalis* using the broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed a significant synergistic effect between the extracts and the nanoparticles, with *Artemisia absinthium* and *Brickellia cavanillesii* being the most effective. This approach supports green synthesis of nanomaterials for therapeutic and antimicrobial applications.

Keywords: Tannins, Silver nanoparticles, green synthesis, antimicrobial activity.

1.- Introducción

En las últimas décadas, el desarrollo de nanopartículas metálicas ha cobrado gran importancia en distintas áreas científicas y tecnológicas debido a sus propiedades únicas a nivel físico, químico y biológico. Las nanopartículas de plata (AgNPs), en particular, han demostrado un notable potencial en aplicaciones biomédicas, catalíticas y antimicrobianas. No obstante, muchos de los métodos tradicionales de síntesis de estas nanopartículas utilizan reactivos tóxicos y condiciones energéticamente demandantes, lo que genera preocupaciones ambientales y de seguridad.

Como alternativa, ha surgido la síntesis verde, una metodología sustentable que emplea organismos vivos o extractos naturales, como los provenientes de plantas, para reducir y estabilizar iones metálicos. Las plantas son una fuente rica en compuestos bioactivos que pueden actuar como agentes reductores y estabilizantes durante la formación de nanopartículas. Entre estos compuestos se encuentran flavonoides, alcaloides, terpenoides, cetonas, proteínas, vitaminas y taninos (Narayanan, 2011; Nadeem, 2019).

Los taninos hidrolizables, entre ellos el ácido gálico y el ácido tánico, son compuestos polifenólicos naturales, biodegradables y no tóxicos. Se ha reportado que estos metabolitos poseen una elevada capacidad para reducir iones metálicos, además de prevenir la aglomeración de las nanopartículas al actuar como estabilizantes (Herrera, 2010). El ácido tánico, por ejemplo, está compuesto por un núcleo central de glucosa unido por enlaces éster a unidades de ácido gálico, y suele acumularse en hojas, corteza, madera y frutos, donde cumple funciones defensivas frente a herbívoros y patógenos. Aunque a pH neutro actúa como un reductor débil, puede hidrolizarse bajo condiciones ácidas o básicas, liberando glucosa y ácido gálico (Bors, 2001; Tian, 2007).

Numerosos estudios han demostrado que tanto los taninos como las nanopartículas de plata poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos, virus y levaduras (Chung, 1998). Hatano et al. (2005) reportaron efectos antibacterianos de taninos y compuestos polifenólicos relacionados frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Asimismo, Buzzini et al. (2008) demostraron un efecto sinérgico al combinar taninos hidrolizables con antibióticos, reduciendo significativamente la concentración necesaria de estos últimos.

El presente estudio tuvo como objetivo sintetizar nanopartículas de plata utilizando como reductores químicos extractos vegetales ricos en taninos mediante un enfoque de síntesis verde, así como evaluar su actividad antibacteriana in vitro. Para ello, se utilizaron cepas bacterianas ATCC: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. La formación de nanopartículas fue monitoreada por espectroscopía UV-Vis. Posteriormente, se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar su morfología, tamaño y distribución. Además, se evaluó su estabilidad coloidal mediante potencial zeta y se determinó su tamaño hidrodinámico utilizando dispersión dinámica de luz (DLS), comparando estos resultados con los obtenidos por TEM.

2.- Materiales y método

2.1 Materiales

Las plantas utilizadas se adquirieron en un mercado local de la ciudad de San Luis Potosí, México. Las especies empleadas fueron: *Brickellia cavanillesii* D.C. (Prodigiosa), *Artemisia ludoviciana* (Estafiate), *Artemisia Absinthium* (Ajenjo), *Piqueria trinervia* (Hierba de San Nicolás) y *Pelargonium domesticum* (Geranio).

El nitrato de plata (AgNO_3 , Sigma-Aldrich, grado ACS) se utilizó como precursor, y el hidróxido de amonio (NH_4OH , solución acuosa al 30 % p/p, Sigma-Aldrich, grado ACS) se empleó para ajustar el pH en la síntesis de las nanopartículas.

2.2 Preparación de los extractos acuosos.

Para la obtención de los extractos acuosos, se pesaron 10 g de materia vegetal previamente seca y molida de cada especie. Posteriormente, se hirvieron 200 mL de agua desionizada y, una vez alcanzado el punto de ebullición, se colocó la planta para preparar la infusión. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos y se filtró con papel filtro Whatman de 125 mm. Este procedimiento se realizó por separado para cada planta.

2.3 Síntesis química de las nanopartículas de plata.

Bajo agitación magnética, se mezclaron 10 mL de cada extracto vegetal previamente filtrado con 100 mL de una solución de AgNO_3 0.01 M. Estas mezclas se trabajaron por separado. El pH de cada solución se ajustó lentamente hasta alcanzar un valor de 10, mediante la adición de NH_4OH .

2.4 Caracterización

Las nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas fueron caracterizadas mediante Espectroscopía UV-Vis (Spectrometer Ocean Optics Inc.), Dispersión Dinámica de Luz (DLS) (Malvern Zetasizer Nano ZS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (JEOL JEM-1230).

2.5 Cepas bacterianas

Se evaluaron cuatro cepas bacterianas: dos Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853) y dos Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Las cepas se obtuvieron del cepario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Previamente a los ensayos, las cepas fueron reactivadas en caldo Mueller-Hinton y cultivadas en agar nutritivo durante 24 horas a 37 °C.

2.6 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo el estándar CLSI (NCCLS-CLSI N7 A7 Vol. 26 No. 2, 1996). Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Las AgNPs fueron evaluadas en el mismo estado en el que se obtuvieron, sin modificaciones.

Para la CMI, se utilizaron placas de 96 pocillos, en las que se realizaron diluciones seriadas de las AgNPs en caldo Mueller-Hinton, con una concentración inicial de microorganismos de 10^5 UFC/mL. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se consideró como punto final la ausencia de turbidez en los pocillos.

La CMB se determinó sembrando en agar Mueller-Hinton los contenidos de los pocillos antes y después de la concentración límite de la CMI. Se consideró como CMB la menor concentración en la que no se observó crecimiento bacteriano en las placas tras 24 horas de incubación a 37 °C. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

2.7 Determinación de taninos.

La cuantificación de taninos en los extractos vegetales se realizó mediante el método colorimétrico de Folin-Denis, según lo reportado por Makkar (2003). Para ello, se preparó una solución saturada de carbonato de sodio y se construyó una curva de calibración utilizando ácido tánico como estándar. La absorbancia de las soluciones se midió a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis.

3.- Resultados y Discusión

3.1 Síntesis de las AgNps

Los extractos vegetales se emplearon como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de nanopartículas de plata. La reacción de reducción se llevó a cabo en condiciones alcalinas (pH 10–11), favoreciendo la ionización de los grupos fenólicos. Esta ionización incrementa la velocidad de la reacción redox, conduciendo a la formación de nanopartículas de morfología esférica (Martínez-Castañón et al., 2008). La oxidación de compuestos fenólicos genera estructuras quinoides y ceto-enólicas, las cuales pueden adsorberse en la superficie de las AgNPs y estabilizarlas (Wang et al., 2007).

3.2 Análisis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

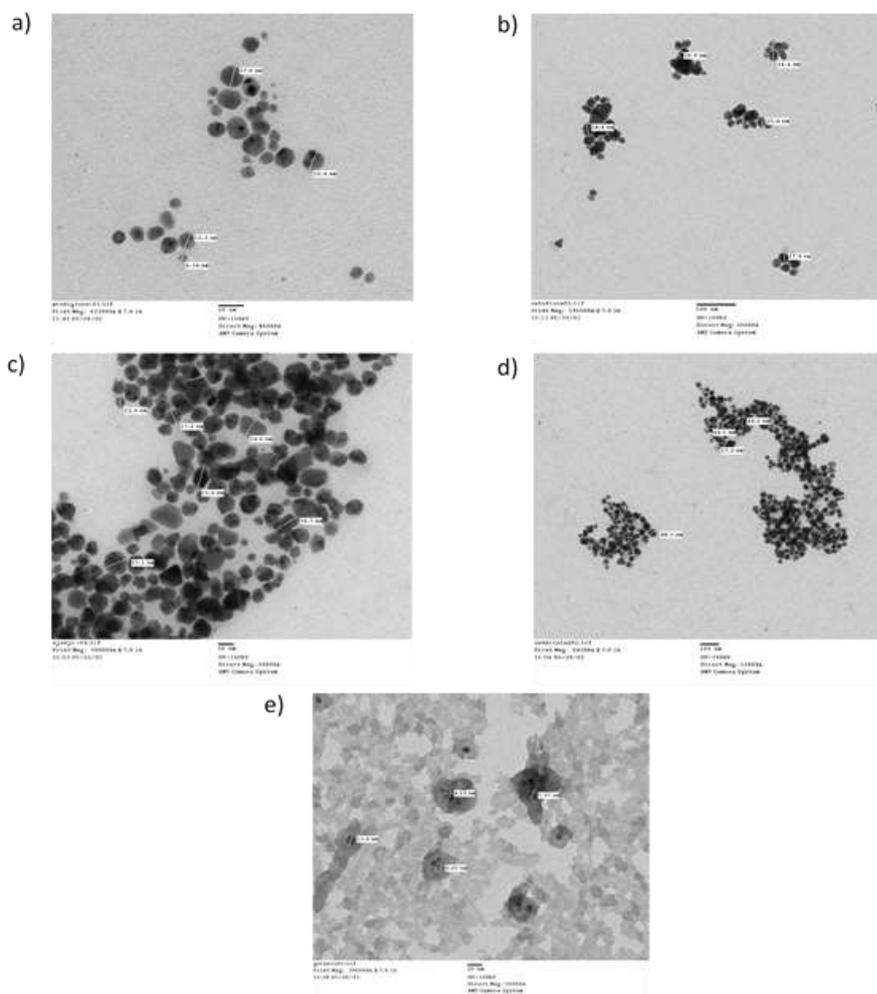
Las micrografías TEM mostraron que las nanopartículas sintetizadas presentaron morfologías predominantemente esféricas o pseudoesféricas y una distribución de tamaño relativamente estrecha. Los tamaños promedio observados fueron para Prodigiosa 6–16 nm, Estafiate 27 nm, Ajenjo 2–26 nm, Hierba de San Nicolás 2–46 nm y Geranio 9 nm, como se muestra en la Figura 1.

La similitud morfológica entre las muestras podría explicarse por la presencia de grupos funcionales comunes (como fenoles y taninos) en los extractos utilizados. No obstante, las diferencias en el tamaño sugieren que el perfil fitoquímico específico de cada planta influye en la nucleación y crecimiento de las nanopartículas.

Es importante señalar que la morfología no presentó cambios significativos entre las distintas muestras, lo que indica que el mecanismo de formación fue similar en todos los casos, probablemente controlado por compuestos polifenólicos comunes.

Fig. 1

Micrografía de Microscopía de Transmisión Electrónica, a) Prodigiosa (*Brickellia cavanillesii*), b) Estafiate (*Artemisia ludoviciana*), c) Ajenjo (*Artemisia absinthium*), d) Hierba de San Nicolás (*Piqueria trinervia*) y e) Geranio (*Pelargonium domesticum*)



3.3 *Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial Zeta*

Los tamaños promedio determinados por DLS fueron los siguientes: Prodigiosa 54.96 nm, Estafiate 20.31 nm, Ajenjo 05.24 nm, Hierba de San Nicolás 71.10 nm y Geranio 108.9 nm.

El potencial zeta, mostrado en la Tabla 1, indicó una estabilidad coloidal aceptable. De acuerdo con la teoría DLVO, valores mayores a ± 30 mV reflejan dispersiones estables (Ji, 2010). Aunque algunas muestras mostraron valores por debajo de ese umbral, la desviación estándar sugiere que no hubo aglomeración significativa, y las dispersiones se mantuvieron suficientemente estables para el análisis.

Tabla 1.

Valores de potencial Z de cada uno de los extractos.

| Planta Medicinal | Potencial Z (mV) |
|-----------------------|---------------------|
| Prodigiosa | -27.9 ± 8.43 |
| Estafiate | -26.6 ± 8.43 |
| Ajenjo | -28 ± 11.1 |
| Hierba de San Nicolás | -28.9 ± 18.5 |
| Geranio | -32 ± 5.4 |

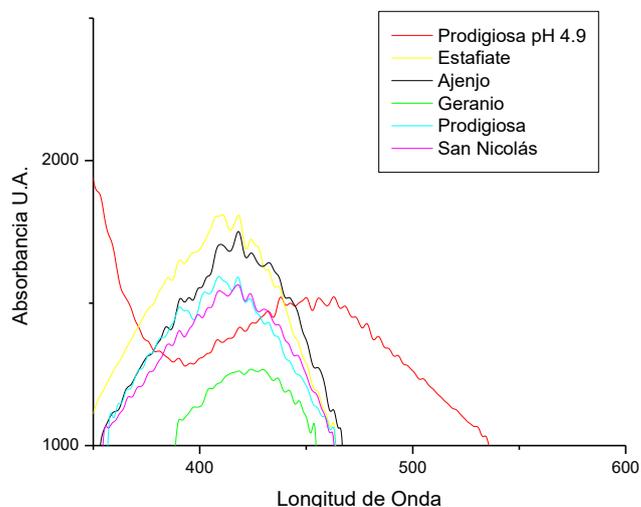
Las discrepancias que se observan entre los tamaños promedio de las nanopartículas determinadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y los obtenidos mediante dispersión dinámica de luz (DLS) puede atribuirse a la naturaleza de cada técnica, DLS mide el diámetro hidrodinámico, que incluye no solo el núcleo de la nanopartícula, sino también las moléculas de solvente y los compuestos orgánicos adsorbidos en su superficie.

3.4 Análisis UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis confirmaron la formación de nanopartículas de plata (AgNPs) mediante la presencia de una banda de plasmón de resonancia superficial localizada entre 420 y 430 nm, como se muestra en la Fig. 2, característica de las AgNPs bien dispersas en solución (Martínez-Castañón et al., 2005).

Figura 2.

Espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos vegetales.



3.5 Actividad Antimicrobiana.

Se evaluó la actividad de los extractos y AgNPs frente a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Los extractos vegetales, a las concentraciones ensayadas, no mostraron actividad antibacteriana.

Por el contrario, todas las AgNPs sintetizadas exhibieron actividad inhibitoria y bactericida significativa. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) fueron menores que las de las AgNPs obtenidas con ácido gálico (13 µg/mL), lo cual sugiere un efecto sinérgico entre los compuestos bioactivos del extracto y la acción de las nanopartículas, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Resultados de las pruebas antimicrobianas.

| Datos / Planta | Prodigiosa | Estafiate | Ajenjo | Hierba de San Nicolás | Geranio | Prodigiosa pH 4.9 |
|--|------------|-----------|----------|-----------------------|------------|-------------------|
| Concentración Mínima Inhibitoria Extractos | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | * |
| <i>S. aureus</i> | 25 000 ± 0 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | * |
| <i>E. faecalis</i> | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | 25 000 ± 0 | * |
| <i>P. aeruginosa</i> | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 | * |
| Concentración Mínima Inhibitoria AgNp's | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 1.67 ± 0 | 6.74 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| <i>S. aureus</i> | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 1.67 ± 0 | 6.74 ± 0 | 1.67 ± 0 |
| <i>E. faecalis</i> | 1.67 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 6.74 ± 0 | 3.37 ± 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 3.37 ± 0 | 6.74 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 6.74 ± 0 | 26.96 ± 0 |
| Concentración Mínima Bactericida Np's | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 1.67 ± 0 | 6.74 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 |
| <i>S. aureus</i> | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 1.67 ± 0 | 6.74 ± 0 | 1.67 ± 0 |
| <i>E. faecalis</i> | 1.67 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 13.48 ± 0 | 3.37 ± 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 3.37 ± 0 | 6.74 ± 0 | 3.37 ± 0 | 3.37 ± 0 | 13.48 ± 0 | 26.96 ± 0 |

* No se encontró actividad antimicrobiana a las concentraciones utilizadas en este trabajo.

Estudios previos han propuesto múltiples mecanismos de acción para las AgNPs, entre ellos están la adherencia a la membrana bacteriana, el aumento de la permeabilidad celular, el ingreso intracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), interferencia con la síntesis de ATP y replicación de ADN (Panacek, 2006; Marambio y Hoek, 2006, 2010; Morones et al., 2005).

Asimismo, se ha demostrado que las AgNPs de menor tamaño presentan mayor efectividad antimicrobiana (Martínez-Castañón et al., 2008), lo cual se observó en este estudio con las muestras obtenidas a partir de Ajenjo y Prodigiosa.

3.6 Estimación cuantitativa de taninos.

Los taninos fueron cuantificados mediante espectrofotometría, utilizando una curva de calibración con ácido tánico como estándar ($y = 0.03648 + 0.07567X$; $R^2 = 0.99975$; $SD = 0.00939$; $n = 5$). Los resultados se reportaron como equivalentes de ácido tánico (mg/mL), como se muestra en la Tabla 3.

Estos compuestos, por su alta capacidad para ceder electrones, probablemente desempeñaron un papel clave como agentes reductores en la síntesis de las AgNPs. Esto respalda el enfoque verde de la síntesis, al utilizar metabolitos secundarios vegetales como reactivos funcionales.

Tabla 3.

Resultados de la estimación cuantitativa de taninos.

| Planta Medicinal | Concentración de taninos (mg/mL) |
|-----------------------|----------------------------------|
| Prodigiosa | 0.0095054 |
| Estafiate | 0.0066656 |
| Ajenjo | 0.0072801 |
| Hierba de San Nicolás | 0.0146593 |
| Geranio | 0.0119235 |

5.- Conclusión.

Las nanopartículas de plata sintetizadas mediante extractos vegetales mostraron morfología esférica y buena estabilidad coloidal. Las técnicas de caracterización (UV-Vis, TEM, DLS y potencial zeta) confirmaron que se trató de nanopartículas metálicas de Ag⁰.

Los resultados sugieren que los taninos presentes en los extractos fueron los principales responsables de la reducción y estabilización de las AgNPs. Además, las nanopartículas mostraron una marcada actividad antibacteriana, especialmente aquellas obtenidas con Ajenjo y Prodigiosa, lo que indica una acción sinérgica entre los fitoquímicos y las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

Este trabajo contribuye a la validación del uso de extractos vegetales nativos como agentes funcionales en síntesis de nanomateriales con potencial biomédico.

6.- Agradecimientos.

Los autores agradecen el apoyo brindado por las becas de doctorado No. 733766 y 733623, así como a la estancia posdoctoral PA-20220720004022434-2911764 por su contribución al desarrollo de este trabajo.

7.- Referencias bibliográficas.

Buzzini P, Arapitsas P, Goretti M, Branda E, Turchetti B, Pinelli P, Ieri F, Romani A (2008) Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini-Rev Med Chem* 8:1179–1187

- Blainiski, A., Lopes, G. C., Palazzo-de-Mello, J.C. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of total phenolic content from *Limonium Brasilense* L. *Molecules* 18, 6852-6855.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998) Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38:421–464.
- Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T (2005) Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66:2047–2055.
- Herrera-Becerra, R., Rius, J. L., & Zorrilla, C. (2010). Tannin biosynthesis of iron oxide nanoparticles. *Applied Physics A*, 100, 453-459.
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ... & Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphoraleaf*. *Nanotechnology*, 18(10), 10510.
- Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia T., Mengh, H., Wang, E., Suárez, H., Zhang, H., Hoe3k, E., Godwin, H., Nel, A.E., and Zink, J. I. (2010). Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. *Environmental Science and Technology*, 44 (19) 7309-7314.
- Makkar, H. P., & Makkar, H. P. (2003). Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A Laboratory Manual*, 49-51.
- 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. *J Nanopart Res.* 12 ,(5),1531-1551.
- Martínez-Castañón, G.A., Martínez, J. R., Ortega-Zarzosa, G., Ruiz, F., Sánchez-Loredo, M.G. (2005). Optical absorption of Ag particles dispersed in a SiO₂ amorphous matrix. *J Sol-Gel Sci Technol.* 36, 137-145.
- Martínez-Castañón, G.A., Niño-Martínez, N., Martínez- Gutiérrez, F. Martínez- Mendoza, J. R., Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanopart Res.* 10, (8), 1343-1348.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camancho, A., Holt, J.B., Kourt, J. B., Ramirez, J.T., Yacaman, M.J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology* 16, 2346-2353.
- Nadeem, A., Naz, S., Sarfraz, J., Mannan, A., y Zia, M. (2019). Synthesis, characterization and biological activities of monometallic and bimetallic nanoparticles using *Mirabilis jalapa* leaf extract. *Biotechnology Reports*, 22, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00338>.
- Narayanan KB, Sakthivel N (2011) Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci* 169:59–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.08.004>
- NCCLS - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) N7 A7, 2006, 26(2).

- Pal, S. Tak, Y., Song J. (2007). "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*", *Appl Environ Microbiol.* 73, 6, 1712–1720.
- Panacek, A., Kvittek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V., Nevecna, T., Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B.* 110, 16248–16253.
- Salunke, D.K., Chavan, J.K. (1989). *Dietary tannins: consequences and remedies.* CRC-Press, pp 84-87.
- Saxena, V., Mishra, G., Saxena, A., Vishwakarma, K. (2013). A comparative study on quantitative estimation of tannins in *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica*, *Terminalia arjuna* and *Saraca indica* using spectrophotometer. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 6, 3, 139-140.
- Shankar S. S., Ahmad A., Sastry M. (2003), Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles, *Biotechnol. Prog.*, 19, 1627-1631.
- Shankar S. S., Ahmad A., Pasricha R., Sastry M. (2003), Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes, *J. Mater. Chem.*, 13, 1822-1826.
- Shankar S. S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. (2004), Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth, *J. of Colloid and Interface Science*, 275, 496-502.
- Shankar S. S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. (2005), Controlling the Optical Properties of Lemongrass Extract Synthesized Gold Nanotriangles and Potential Application in Infrared-Absorbing Optical Coating. *Chem. Mater.*, 17, 566-572.
- Song J. Y., Jang H. K., Kim B. S., (2009), Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts, *Process Biochemistry*, 44, 1133-1138.
- Sur U. K. 2014, Biological green synthesis of gold and silver nanoparticles, *Advances in Nano Research*, Vol. 2, No. 3, 135-145.
- Wang, W., Chen, Q., Jiang, C., Yang, D., Liu, X., Xu, S. (2007). One step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). *Colloids Surf a Physicochem. Eng. Asp.* 301, 73-79