



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES
MAESTRÍA EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

**PROGRAMA DE MESTRÍA EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

“SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA USANDO EXTRACTO DE
LAS PLANTAS *VALERIANA OFFICINALIS* Y *PASSIFLORA INCARNATA* Y SU
EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIBACTERIALES”

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Metalurgia y Ciencias de los
Materiales presenta:

Ing. NOEMI ALEJANDRA FLETES HERNÁNDEZ

Director de tesis

Dr. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO, 2016

**SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA USANDO EXTRACTO
DE LAS PLANTAS *VALERIANA OFFICINALIS* Y *PASSIFLORA INCARNATA* Y
SU EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIBACTERIALES**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme llegar a este momento y por darme fuerzas para superar todos los obstáculos que se presentaron en la realización de éste trabajo.

Agradezco a mi madre y a mis hermanos, por su apoyo incondicional a lo largo de mi preparación académica y quienes están orgullosos de este logro. También a Celeste Lagunas por creer en mí, por todos sus consejos, apoyo y cariño. A Mayra O. Vargas, quien es mi colega y mejor amiga.

Agradecimiento a los profesores Juan Zarate, José Lemus, María Eugenia Contreras, Ricardo Estrella, Jorge Verduzco, Juan Serrato, Ena Athenea Aguilar; por sus enseñanzas, apoyo y críticas constructivas. De igual manera, extendiendo mi agradecimiento al Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo asesor del proyecto, por su valiosa guía y supervisión.

Agradezco al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la UMSNH, por ser mi segunda casa estos dos años. Quiero también mencionar a CONACYT por su sustento y al programa PIFI-PROFOCIE de la Universidad Michoacana por su apoyo en movilidad y mantenimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	16
1.3 HIPÓTESIS.....	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 Nanociencia y nanotecnología	18
2.2 Nanomateriales y nanopartículas.....	22
2.3 Formación de nanopartículas	26
2.4 Métodos de síntesis de nanomateriales	27
2.4.1 “Arriba → Abajo”	27
2.4.2 “Abajo → Arriba”	28
2.5 Nanopartículas de plata	29
2.6 Métodos de síntesis de NPs de Ag	30
2.6.1 Síntesis química.....	30
2.6.2 Síntesis por reducción química.....	31
2.6.3 Síntesis verde.....	32
2.7 Discusión del estado del arte	34

2.7.1	Síntesis de NPs de Ag por el método de reducción química	34
2.7.2	Síntesis verde de nanopartículas de plata	35
2.7.2.1	Efecto del pH.....	37
2.7.2.2	Efecto de la temperatura.....	39
2.7.2.3	Efecto de la concentración de extracto de la planta	40
2.7.2.4	Efecto de la concentración de nitrato de plata sobre la síntesis de NPs de Ag	43
2.7.3	El efecto bactericida de nanopartículas de plata.....	43
2.7.4	Compuestos orgánicos en las plantas	46
2.7.5	Fitoquímica de <i>Passiflora incarnata</i>	47
2.7.6	Fitoquímica de <i>Valeriana officinalis</i>	48
CAPITULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL		54
3.1	Selección de las plantas.....	55
3.2	Elaboración de los extractos.....	55
3.3	Preparación de la sal de plata (AgNO ₃).....	55
3.4	Síntesis verde de nanopartículas de plata	57
3.5	Caracterización estructural de las NPs de Ag	58
3.5.1	Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	58
3.5.2	Difracción de rayos-X (DRX)	58
3.5.3	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	58
3.5.4	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	59
3.5.5	Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	59
3.6	Evaluación de la propiedad bactericida.....	59
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS		61
4.1	Caracterización estructural de las NPs de Ag	61
4.1.1	Espectroscopía UV-Vis.....	61
4.1.2	Difracción de rayos X	71
4.1.3	Espectroscopía de infrarrojo.....	72
4.1.4	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	77
4.1.5	Microscopía electrónica de transmisión	83
4.2	Evaluación de la propiedad bactericida contra <i>Escherichia coli</i>	85
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		88

REFERENCIAS 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1. Las propiedades del oro macroscópico no dependen de su tamaño [1].	19
Figura 2. 2. Nanopartículas de oro de diferentes tamaños [1].	20
Figura 2. 3. Clasificación de los nanomateriales de acuerdo a sus dimensiones [2].	23
Figura 2. 4. Imagen de MET de una estructura 3-D, mostrando la estructura nanocristalina del cobre a granel. Aunque los granos están en la nanoescala, las dimensiones del material pueden estar en la escala micro o macro [2].	24
Figura 2. 5. Espectros de UV-Vis de NPs de Ag a diferentes valores de pH. En el recuadro de la figura se observan los contenedores con las muestras sometidas a ultrasonido de la biomasa de <i>Caléndula officinalis</i> con NPs de Ag a diferentes pH [25].	38
Figura 2. 6. Espectros de UV-Vis de NPs de Ag sintetizadas a 30°C y 60°C [25].	39
Figura 2. 7. Espectros de UV-Vis de NPs de Ag usando extracto de las hojas de <i>A. indicum</i> a diferentes concentraciones (a) 2.0 mL, (b) 2.5 mL, (c) 3.0 mL y (d) 3.5 mL [29].	41
Figura 2. 8. Espectros de UV-Vis de las AgNPs (diluidas 1:6), registrados como una función de la concentración de ASPE en la reacción usando una solución de 6 mM de AgNO ₃ [12].	42
Figura 2. 9. Terpenoides en <i>V. officinalis</i> [40].	49
Figura 2. 10. Monoterpenos y Sesquiterpenos encontrados en <i>Valeriana officinalis</i> [40].	50
Figura 2. 11. Compuestos de derivados valerénicos en <i>V. officinalis</i> [40].	51
Figura 2. 12. Aminoácidos presentes en <i>Valeriana officinalis</i> [41].	52
Figura 3. 1. Metodología experimental.	54

Figura 4. 1. Espectros de UV-Vis de las NPs de plata a diferentes concentraciones del extracto: (a) 0.25, (b) 0.50, (c) 0.75 y (d) 1.0 g. En cada una de estas concentraciones de extracto se varió la cantidad de sal de plata en: 5, 7, 9, 11 y 15 mM.....	63
Figura 4. 2. Gráficas de los espectros de UV-Vis de las NPs sintetizadas usando solución de nitrato de plata en: (a) 5 mM, (b) 7 mM, (c) 9 mM y (d) 15 mM, variando la concentración del extracto en cada una de éstas en: 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 g....	64
Figura 4. 3. Espectros de UV-Vis de las NPs de plata sintetizadas variando la concentración del extracto de <i>P. incarnata</i> en: (a) 0.5, (b) 1.0 y (c) 2.0 g. En cada una de éstas se varió la molaridad de la sal de plata en: 3, 4, 5, 7 y 9 mM.	66
Figura 4. 4. Tiempos de reacción de NPs sintetizadas a una concentración de sal de 5 mM y 1.0 g del extracto, en un rango de 0 a 60 min con un intervalo de 5 min.....	67
Figura 4. 5. Efecto de la concentración de la sal a 4 mM en los tiempos de reacción de NPs sintetizadas bajo irradiación ultravioleta, en un rango de 0 a 60 min en intervalos de 5 min.....	68
Figura 4. 6. Efecto de la concentración de la sal a 5 mM en los tiempos de reacción de NPs sintetizadas bajo irradiación ultravioleta, en un rango de 0 a 60 min en intervalos de 5 min.....	69
Figura 4. 7. Tiempos de reacción de nanopartículas de plata sintetizadas bajo irradiación solar y a una concentración de sal de plata de 5 mM, en un rango de 0 a 60 min con un intervalo de 5 min.	70
Figura 4. 8. Tiempos de reacción de NPs sintetizadas en condiciones de ultrasonido, en un rango de 0 a 60 min en intervalos de 5 min.....	71
Figura 4. 9. Patrón de difracción de las nanopartículas de plata sintetizadas con: (a) <i>V. officinalis</i> y (b) <i>P. incarnata</i>	72
Figura 4. 10. Espectros IR de <i>Valeriana officinalis</i> (a) antes de la reacción y (b) después de la reacción con AgNO ₃	74
Figura 4. 11. Espectros IR de: (a) <i>Passiflora incarnata</i> y (b) NPs de Ag sintetizadas.	74

Figura 4. 12. Imágenes de MEB de NPs de plata sintetizadas con AgNO ₃ a 5 mM y con extracto de <i>V. officinalis</i> en una concentración de: (a) 0.5 g y (b) 1.0 g.	78
Figura 4. 13. Imágenes de MEB de NPs de plata sintetizadas con AgNO ₃ a 7 mM y con extracto de <i>V. officinalis</i> en una concentración de: (a) 0.5 g y (b) 1.0 g.	79
Figura 4. 14. Imágenes de MEB de NPs de plata sintetizadas con extracto de <i>V. officinalis</i> en una concentración de 0.5 g y AgNO ₃ a una concentración de: (a) 5 mM y (b) 7 mM.....	79
Figura 4. 15. Composición química realizada mediante EDS de las nanopartículas de plata sintetizadas con <i>V. officinalis</i>	80
Figura 4. 16. Imágenes de MEB a diferentes ampliaciones de las NPs de plata sintetizadas con extracto de <i>Passiflora incarnata</i> en una concentración de 0.5 g y concentración 9 mM de AgNO ₃	81
Figura 4. 17. Imágenes de MEB a diferentes ampliaciones de las NPs de plata sintetizadas con extracto de <i>Passiflora incarnata</i> en una concentración de 1 g y concentración 7 mM de AgNO ₃	82
Figura 4. 18. Imágenes de MEB a diferentes ampliaciones del sólido AgCl presente en las NPs sintetizadas con extracto de <i>Passiflora incarnata</i> en una concentración de 1 g y concentración 7 mM de AgNO ₃	82
Figura 4. 19. Micrografía de TEM de campo claro de NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO ₃ a 5 mM y 1.0 g de extracto de la planta.	83
Figura 4. 20. Micrografía de TEM de campo claro de NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO ₃ a 3 mM y 1.0 g de extracto de la planta.	84
Figura 4. 21. Histograma del tamaño de las NPs de Ag.....	84
Figura 4. 22. Imagen de MET de alta resolución de una nanopartícula de plata. El recuadro es el patrón de difracción de la nanopartícula.	85
Figura 4. 23. Prueba antibacterial de las NPs de Ag contra la bacteria <i>E. coli</i>	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. 1. Plantas utilizadas en la biosíntesis de NPs de Ag.	37
Tabla III. 1. Soluciones de nitrato de plata usadas en la síntesis.....	56
Tabla III. 2. Variables de las reacciones de síntesis de las NPs de Ag.....	57
Tabla IV. 1. Grupos funcionales del extracto antes y después de reaccionar con AgNO ₃ ...	75
Tabla IV. 2. Grupos funcionales del extracto antes y después de la reacción.....	76
Tabla IV. 3. Resultados de las pruebas antibacteriales utilizando el método de difusión de disco.....	86

RESUMEN

En esta investigación se sintetizaron nanopartículas de plata (NPs de Ag) vía química verde usando extracto acuoso de las plantas *Valeriana officinalis* y *Passiflora incarnata*, como agentes reductores y nitrato de plata (AgNO_3) como sal precursora. La reacción de biorreducción de iones Ag^+ a plata cerovalente (Ag^0), se evaluó a diferentes concentraciones de AgNO_3 y de extracto de las plantas.

La caracterización estructural de las nanopartículas se realizó mediante las técnicas de espectroscopía UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía de infrarrojo (IR). Todas estas técnicas confirmaron la formación de nanopartículas de plata, lo que indica que las plantas contienen las sustancias adecuadas, tales como: terpenos, flavonoides, compuestos antioxidantes, taninos, etc., que son capaces de realizar la reducción de iones de plata a Ag^0 .

Se observó que a medida que la concentración de nitrato de plata aumenta, se incrementa la formación de NPs de Ag. Además, las nanopartículas en solución aumentan con la concentración del extracto de la planta. El tamaño promedio de las nanopartículas obtenidas mediante *Valeriana officinalis* fue alrededor de 22 nm. La distribución del tamaño tuvo una tendencia bimodal con nanopartículas en el rango de 10-20 nm y 45-60 nm. En el caso de *Passiflorina incarnata*, se observó el mismo comportamiento, al incrementar la concentración del extracto, se detectó una mayor formación de NPs, además, la velocidad de reducción de NPs es mejor que utilizando la planta *Valeriana officinalis*.

Se evaluó la efectividad bactericida de las NPs de Ag contra la bacteria *E. coli*, mediante el método de difusión de disco, indicando que a medida que se incrementó la concentración de NPs, un mayor halo de inhibición del crecimiento bacteriano se obtuvo indicando su eficacia bactericida.

Palabras clave: nanopartículas de plata, síntesis verde, *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis* y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

In this study silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized via green chemistry using aqueous extracts of *Valeriana officinalis* and *Passiflora incarnata* as reducing agents and silver nitrate (AgNO_3) as a precursor salt. The bioreduction reaction of Ag^+ ions to Ag^0 was evaluated to different plant extract and silver salt concentrations.

Afterwards, the structural characterization of the nanoparticles was performed by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and infrared spectroscopy (IR) techniques. All of these techniques confirm the formation of silver nanoparticles, which indicates that the plant contains substances suitable and capable of performing the reduction of silver ion to elemental silver.

It was observed that as the concentration of silver nitrate increases the formation of the AgNPs is increased. Also, the AgNPs in the solution increases with the concentration of the plant extract was increased. The average size of the Ag nanoparticles obtained was around 22 nm. The size distribution had a bimodal tendency with nanoparticles in the range of 10-20 nm and 45-60 nm. For *Passiflora incarnata*, it is observed same that increasing the concentration of the extract, increased the formation of NPs was detected furthermore NPs rate reduction is better than using *Valeriana officinalis* plant.

The bactericidal effect of the Ag NPs against *E. coli* bacteria by disc diffusion method was evaluated; it was observed that with increasing concentration of NPs, more halo bacterial growth inhibition was obtained indicating its bactericidal efficacy.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Durante años recientes, el desarrollo y uso de las nanopartículas de plata (NPs de Ag) ha aumentado considerablemente debido a las inusuales propiedades ópticas, químicas, electrónicas, foto-electroquímicas, magnéticas, catalíticas y bactericidas. Las nanopartículas de plata han atraído el interés de la investigación en nanotecnología, debido a sus aplicaciones ventajosas en: biomedicina, administración de fármacos, industria de alimentos, agricultura, industrias textiles, tratamiento de aguas, catálisis, como agentes antibacteriales y anti fúngicas. Recientemente, la síntesis biológica o verde de nanopartículas recibió una enorme atención sobre la síntesis física y química, ya que es un método limpio, no tóxico y respetuoso del medio ambiente, que incluye un diseño y desarrollo que utiliza materiales de alta eficiencia energética renovables, medios de reacción benignos y no peligrosos. Por lo tanto, la integración de los principios de la química verde en nanotecnología es esencial para su desarrollo y podría beneficiarse con un enfoque más ecológico que promueve tanto el rendimiento como la seguridad. El desarrollo de procesos experimentales de base biológica para la síntesis de NPs se considera como una rama importante de la nanotecnología. La síntesis verde de NPs de Ag utilizando bacterias, hongos, algas, plantas, así como compuestos biológicos ha sido reportada en los últimos años.

El presente trabajo, pretende realizar la biosíntesis de NPs de Ag por reducción de nitrato de plata en solución (AgNO_3) utilizando extracto acuoso de Valeriana (*Valeriana officinalis*) y Pasiflora (*Passiflora Incarnata*) en condiciones normales de temperatura y presión, variando únicamente la relación de concentración de extracto de planta a concentración de sal precursora y la cinética de la reacción.

Se ha reportado que, la planta Valeriana (*Valeriana officinalis*) contiene un aceite esencial, en el que se han identificado monoterpenos, sesquiterpenos, lignanos, componentes fenólicos y flavonoides. Se ha demostrado que los extractos acuosos de esta planta presentan actividad antibiótica contra bacterias y hongos patógenos. Por su parte, la pasiflora (*Passiflora Incarnata*) liana trepadora pubescente contiene flavonoides, aceites esenciales y fenoles. Por lo tanto, las características de estas plantas proponen sustancias

activas que pueden actuar como agentes reductores que permiten utilizarlas para la biosíntesis de nanopartículas de plata.

A través de espectroscopía UV-Vis se podrán conocer, en forma rápida, los resultados después de la reacción de los iones Ag^+ y si hay presencia de NPs de plata. La topografía y la morfología se determinarán mediante microscopía electrónica de barrido. El tamaño y distribución de las NPs de Ag se realizará mediante microscopía electrónica de transmisión. La naturaleza cristalina se confirmará a partir de difracción de rayos-X. Por otro lado, con el fin de identificar los compuestos responsables de la biorreducción del ión y la estabilización de Ag^0 , se utilizará la técnica de FTIR. La evaluación de la propiedad antibacterial de las NPs sintetizadas contra *Escherichia coli*, se realizará mediante el método de difusión de disco, que consiste en la medición de la inhibición del desarrollo de las bacterias. Una vez comprobada la propiedad antibacterial se corroborarán los datos haciendo estudios por el método de la mínima concentración inhibidora.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es realizar la síntesis verde de nanopartículas de plata usando extracto de Valeriana (*Valeriana officinalis*) y Pasiflorina (*Passiflora incarnata*) y la caracterización de las mismas, además de la evaluación de su propiedad antibacteriana.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.1.2.1 Sintetizar nanopartículas de plata mediante las plantas: Valeriana (*Valeriana officinalis*) y Pasiflora (*Passiflora incarnata*), para la posterior evaluación de su efecto bactericida.

1.1.2.2 Encontrar las condiciones óptimas para la síntesis verde de nanopartículas de plata, variando la relación de concentración del extracto de la planta a concentración de la sal metálica.

1.1.2.3 Realizar la caracterización morfológica y estructural de las nanopartículas de Ag mediante espectroscopía UV-Vis, espectroscopía de infrarrojo, microscopia electrónica de barrido y transmisión, para conocer la morfología, tamaño y distribución de los productos.

1.1.2.4 Evaluar la efectividad bactericida de las nanopartículas de plata.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las nanopartículas de plata tienen una gran variedad de aplicaciones, sin embargo, los métodos de síntesis hasta ahora empleados, requieren materiales costosos y tóxicos, los cuales limitan en gran medida la aplicación de las mismas en algunas áreas como medicina, remediación ambiental, textiles, etc.

Debido a lo anterior, existe un gran interés en utilizar métodos de síntesis empleando materiales orgánicos como agentes reductores y estabilizantes, los cuales sean económicos, no tóxicos y cuyos subproductos sean amigables con el medio ambiente.

El presente trabajo, pretende la síntesis de nanopartículas de plata las cuales puedan ser aplicadas en el campo de la medicina, tratamiento de agua y catálisis, para lo cual se emplearán sustancias orgánicas, como agentes reductores y estabilizadores, provenientes de extractos de determinadas plantas típicas del estado de Michoacán o nuestro país, las cuales pueden contener compuestos con potenciales de reducción sinérgicos incluyendo diferentes flavonoides, catequinas y fotoquímicos que pueden funcionar para la síntesis de nanopartículas de plata. Se considera que este método es muy económico, ambientalmente benigno y técnicamente factible. Generalmente, los estudios en previas investigaciones, han encontrado que, entre las sustancias lixiviadas de la planta, se presentan agentes que pueden estabilizar la solución coloidal.

1.3 HIPÓTESIS

El presente trabajo fundamenta que las plantas Valeriana (*Valeriana officinalis*) y Pasiflora (*Passiflora Incarnata*), comúnmente empleadas en la medicina tradicional conteniendo monoterpenos, sesquiterpenos, componentes fenólicos y flavonoides, pueden realizar la bioreducción a temperatura ambiente, de Ag^+ a nanopartículas (Ag^0) partiendo de la sal AgNO_3 .

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Nanociencia y nanotecnología

El prefijo *nano-* proviene del latín *nanus*, que significa “enano” y actualmente tiene la acepción de una milmillonésima parte. Así, un nanómetro (abreviado nm) es una milmillonésima parte (1/1 000 000 000) de un metro. Para tener una idea de que tan pequeño es un nanómetro, se piensa en el diámetro de un cabello humano, el cual mide aproximadamente 75 000 nm. El tamaño del objeto más pequeño que se puede ver a simple vista es de unos 10 000 nm, el diámetro de un glóbulo rojo es aproximadamente de 3 000 nm y la distancia entre dos átomos en un anillo, en una moneda o en cualquier objeto de oro es de aproximadamente 0.3 nm.

La nanociencia es el estudio de los procesos fundamentales que ocurren en las estructuras de un tamaño entre 1 y 100 nm, las cuales se conocen como nanoestructuras. La nanotecnología es el área de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales o sistemas a escala nanoscópica y les da alguna aplicación práctica, es decir, la ciencia de lo minúsculo. Sin embargo, en muchas ocasiones se denomina nanotecnología a la habilidad de controlar la materia átomo por átomo.

La necesidad de la industria de los semiconductores de reducir el tamaño de sus dispositivos ha ayudado a que hoy sea posible ver, medir, modificar y manipular átomos y moléculas en una escala del orden de los nanómetros. Pero ¿Qué tiene de especial ese tamaño? Si se compara una moneda de oro con un lingote del mismo material y de la misma pureza se puede observar que la moneda, aunque mucho más pequeña, tiene las mismas propiedades físicas y químicas del lingote, como el color, la dureza, el punto de fusión, la densidad, etc. Si, hipotéticamente, se divide la moneda en dos partes iguales, cada una de las mitades seguirá siendo dorada, brillante y con todas las propiedades de la moneda entera o del lingote. Al repetir este proceso muchas veces, pasando de los centímetros a los milímetros y de los milímetros a los micrómetros, no debería haber

cambios observables en los pedazos de la moneda de oro (Figura 2.1). Sin embargo, cuando se llega a la nanoescala todo cambia: el fragmento nanoscópico de oro ya no es dorado. Una nanopartícula de oro puede ser roja, naranja, púrpura o hasta verdosa, dependiendo de su tamaño, cambian también su punto de fusión y sus propiedades físicas y químicas [1].



Figura 2. 1. Las propiedades del oro macroscópico no dependen de su tamaño [1].

La fabricación y el uso de nanopartículas no es algo nuevo. Los artesanos de la Edad Media aprendieron que al mezclar pequeñas cantidades de oro o plata con el vidrio se obtenían diferentes colores, ideales para usarse en los vitrales de las iglesias. En ese entonces los artesanos no sabían por qué el tratamiento que le daban al vidrio producía ese efecto. Hoy se sabe que el color de los vitrales se debe a la formación de pequeñas nanopartículas de oro o plata con diámetros menores a los 100 nm (Figura 2.2).

Las propiedades físicas, químicas y biológicas que tienen los materiales en los sistemas nanométricos difieren en muchas formas de sus propiedades en los sistemas macroscópicos. La investigación en nanotecnología busca entender y aprovechar estas nuevas propiedades para fabricar materiales y dispositivos que puedan superar las limitaciones del presente, ya

sea creando estructuras con tipos de arreglos atómicos diferentes o con nuevas composiciones químicas.

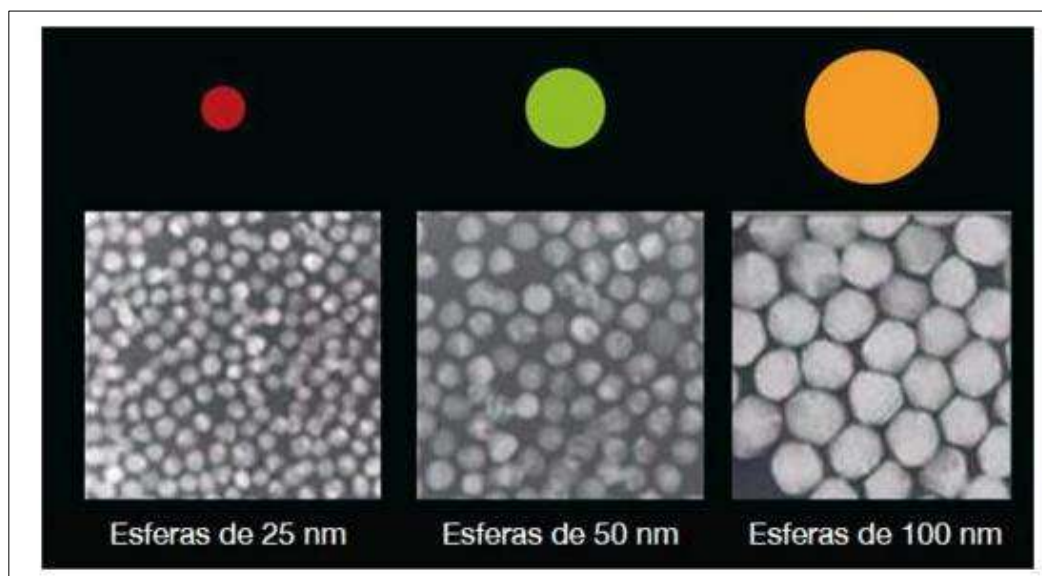


Figura 2. 2. Nanopartículas de oro de diferentes tamaños [1].

En el ejemplo de la moneda de oro, hablamos de un proceso de fabricación que con frecuencia se denomina “de arriba hacia abajo”, porque a partir de un objeto grande se obtiene uno pequeño. La nanotecnología también puede funcionar de manera contraria, es decir, “de abajo hacia arriba” copiando la forma como trabaja la naturaleza, ya que busca construir estructuras controlando la manera como se acomodan los átomos.

En la investigación en nanociencia y nanotecnología participan científicos de diversas disciplinas. Los químicos están interesados en el estudio de las moléculas y de cómo estas reaccionan para formar nuevos compuestos. Han desarrollado métodos y procedimientos para fabricar plásticos, cerámicas, semiconductores, superconductores, vidrios, metales y otros materiales compuestos que han impulsado el avance de la nanotecnología. Así mismo, una rama de la física estudia las propiedades de la materia, que, como se vio, son diferentes en la nanoescala y muchas veces dependen del tamaño exacto de las nanopartículas. Los investigadores en ciencia de materiales, así como los ingenieros químicos, eléctricos y mecánicos, estudian cómo las propiedades de las nanoestructuras pueden ser utilizadas en

la fabricación de materiales completamente nuevos, los cuales a su vez podrían servir para médicos, biólogos y otros profesionales, así como a las industrias, los usan para desarrollar productos con una gran variedad de aplicaciones en sus distintas ramas.

Es por esto que se espera mucho de la nanotecnología, pues se piensa que tendrá un impacto directo en todos los aspectos de la vida: en la salud, en la vivienda, en el transporte y hasta en la seguridad del mundo. No se sabe cuántas de las aplicaciones que se están planeando actualmente funcionarán y serán adoptadas. Sin embargo, hoy por hoy, sin percibirlo se disfruta de muchas de ellas: cuando se reproduce una película en el DVD, cuando se reciben llamadas en el teléfono celular, al utilizar computadoras personales, tabletas, dispositivos de almacenamiento masivo (USB), etc.

Las ideas y los conceptos detrás de la nanociencia y la nanotecnología comenzaron con una plática dictada por el físico Richard Feynman, en una reunión de la Sociedad Americana de Física en el Instituto Tecnológico de California (CalTech), el 29 de diciembre de 1959, titulada "Hay mucho espacio en la parte inferior". En su charla, Feynman describe un proceso en el cual los científicos serían capaces de manipular y controlar los átomos y moléculas individuales. Una década más tarde, en sus exploraciones de mecanizado de ultraprecisión, el profesor Norio Taniguchi, acuñó el término nanotecnología. No fue hasta 1981, con el desarrollo del microscopio de efecto túnel, que se desarrolló la nanotecnología moderna [1].

Las consecuencias más importantes de la nanoescala son la presencia de una alta fracción de átomos/moléculas en la superficie de la partícula además de en el interior de la misma y la inmensa área superficial por unidad de volumen del material. Ambas propiedades aumentan a medida que el tamaño de partícula disminuye. Las propiedades únicas físicas, químicas y biológicas de los nanomateriales se originan a partir de estas dos características. Algunos materiales en la nanoescala exhiben efectos cuánticos lo que permite un número de aplicaciones interesantes.

2.2 Nanomateriales y nanopartículas

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales (sean cerámicos, metálicos, semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de éstos), en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nm. Éstos representan una transición entre moléculas y átomos, y un material con dimensiones de sólido volumétrico (*bulk*). Mientras que un material en el orden micrométrico aún presenta propiedades similares a las de un sólido volumétrico (*bulk*), en los nanomateriales, debido a su tamaño reducido a unos cuantos nanómetros, se modifican sus propiedades que finalmente difieren del mismo material con dimensiones de sólido volumétrico, de las moléculas y los átomos. De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos [2], como se puede ver en la Figura 2.3, quedando de la siguiente manera:

- a) Cero-dimensional (0-D). Son materiales en los que todas sus dimensiones están dentro de la escala nanométrica. El ejemplo más común son las nanopartículas, las cuales pueden tener diversas formas.
- b) Unidimensional (1-D). A diferencia de las nanoestructuras 0-D, éstas tienen una de sus dimensiones fuera de la escala nanométrica. Los nanotubos, nanorodillos y nanoalambres son ejemplos de nanoestructuras 1-D.
- c) Bidimensional (2-D). Son materiales en los cuales dos de sus dimensiones no se encuentran en el rango nanométrico. Ejemplos de estas nanoestructuras son nanocapas y nanopelículas.
- d) Tridimensional (3-D). A esta escala, son conocidos como nanomateriales a granel, no tienen ninguna de sus dimensiones en el rango nanométrico, sin embargo, estos materiales tienen una estructura nanocristalina, es decir, están compuestos de un arreglo múltiple de cristales o sólidos de tamaño nanométrico (ver Figura 2.4). En términos de estructura nanocristalina, los materiales a granel (*bulk*) pueden estar compuestos de una disposición múltiple de cristales de tamaño nanométrico, más típicamente en diferentes orientaciones. Con respecto a la presencia de características en la nanoescala, nanomateriales 3-D pueden contener dispersiones de nanopartículas, nanocables y nanotubos, así como múltiples nanocapas.

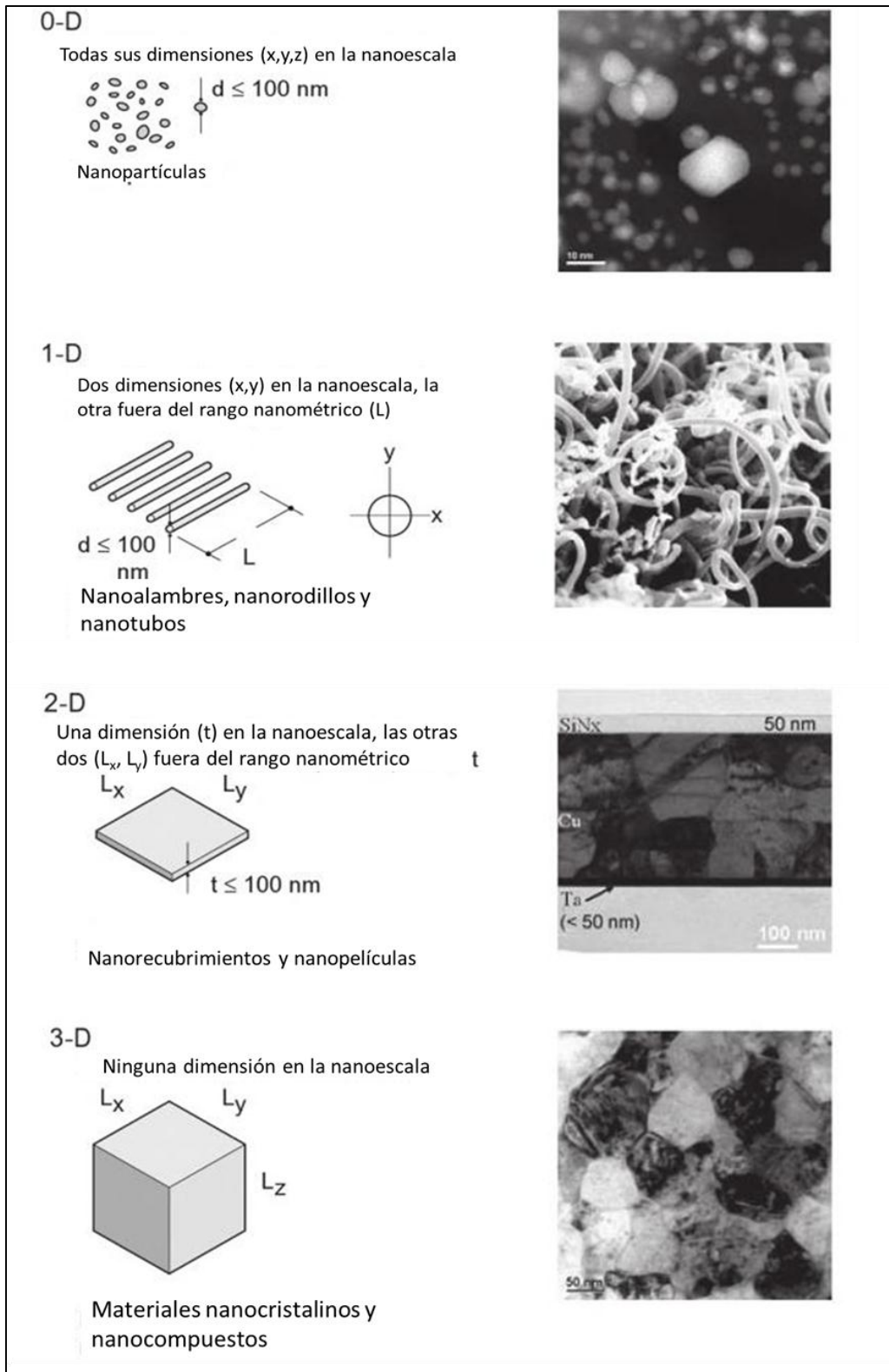


Figura 2. 3. Clasificación de los nanomateriales de acuerdo a sus dimensiones [2].

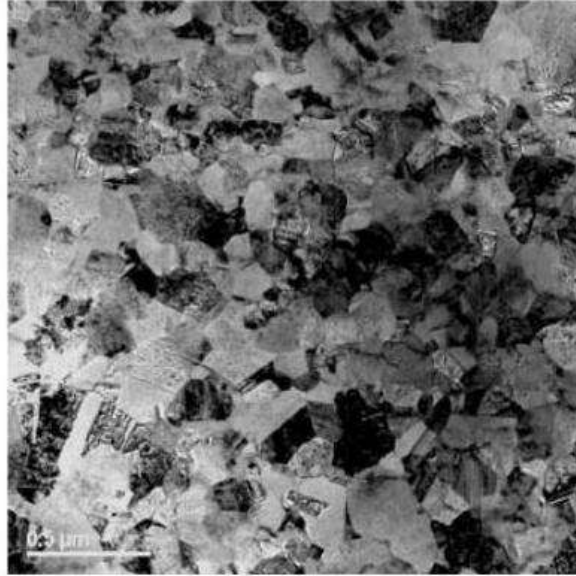


Figura 2. 4. Imagen de MET de una estructura 3-D, mostrando la estructura nanocristalina del cobre a granel. Aunque los granos están en la nanoescala, las dimensiones del material pueden estar en la escala micro o macro [2].

Aunque el interés por el estudio de los nanomateriales surgió con gran fuerza en las últimas décadas, éstos ya existían desde hace varios siglos atrás. Las nanopartículas específicamente, han existido en el planeta por siglos. Más adelante, en algunas civilizaciones antiguas ya se utilizaban, aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales [3].

Las nanopartículas metálicas en particular, poseen propiedades interesantes con aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. Respecto a sus primeros usos puede citarse el caso de la cultura egipcia, que empleaban nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener buena salud (actualmente se siguen utilizando para tratamientos de artritis) y la civilización china, además de utilizarlas con fines curativos, también las empleaban como colorantes inorgánicos en porcelanas [3].

Aun cuando se tenían antecedentes de la utilización de nanopartículas metálicas, no es sino hasta 1857 que Faraday realiza el primer estudio sistemático de nanopartículas, presentando

un estudio de la síntesis y propiedades de coloides de oro. Desde esa época hasta la fecha, grandes avances se han logrado en el conocimiento de las nanopartículas metálicas: se han desarrollado diversos métodos de síntesis químicos y físicos, con la finalidad de poder diseñar sus dimensiones, forma, composición, y modificadores de superficie, y con esto controlar su comportamiento frente a diversos estímulos (radiación electromagnética o reactividad química, entre otros). Asimismo, se ha profundizado en el conocimiento de su estructura electrónica con base en el número de átomos que las conforman, y su efecto en las propiedades del material.

A medida que la dimensión de las partículas se reduce, sobre todo en el intervalo de 1 a 10 nm los efectos de tamaño y superficie son cada vez más notables. Entre los efectos de tamaño más importantes, se ha determinado el confinamiento de los electrones, y esto en nanopartículas metálicas y semiconductoras tiene interesantes implicaciones, como es la manifestación de efectos cuánticos en el material, y que pueden percibirse a través de sus propiedades magnéticas y/o de conducción electrónica, por ejemplo, así como de algunas propiedades termodinámicas, como la capacidad calorífica [3]. Es por esto que a este tipo de partículas se les ha conocido también como puntos cuánticos.

Por otra parte, también los efectos de superficie son de gran importancia, ya que se tiene en las partículas pequeñas un incremento en áreas superficiales por unidad de volumen y en energías libres superficiales respecto a los sólidos volumétricos. Debido a que los átomos en la superficie de las nanopartículas están menos “enlazados” que el resto de sus átomos, y su esfera de coordinación está incompleta, se incrementa su energía libre superficial, afectando propiedades como temperatura de fusión y reactividad química. Se ha reportado por ejemplo, que la temperatura de fusión de nanopartículas de Pt se reduce de 1773 °C en un sólido volumétrico a 600 °C en nanopartículas de 8 nm en promedio [3]. Por otra parte, la absorción óptica en nanopartículas también es un fenómeno de superficie que se modifica, y se puede modular dependiendo de las características de la partícula (composición, tamaño, protectores de superficie, etc.).

El conocimiento de este tipo de propiedades y características ha hecho posible aplicar nanopartículas en diversas tecnologías, en áreas como electrónica, medicina y catálisis, pero existen otras áreas en donde las nanopartículas han sido empleadas, no solo para crear dispositivos sofisticados o de alta presión. Aunque se ha marcado como línea prioritaria en un futuro inmediato la aplicación de nanopartículas (de metales y semiconductores principalmente) en áreas de almacenamiento, producción y conservación de energía, en la actualidad se encuentran ya formando parte de productos, equipos y sistemas de uso común para la población, aunque en múltiples ocasiones esto no sea tan evidente. Así, podríamos citar diversos casos, por ejemplo, según reporte de Forbes, 6 de los 10 principales productos comercializados en Nanotecnología durante 2004, fueron generados con base en nanopartículas. Uno de los sectores industriales en donde se ha observado un rápido crecimiento con base en nanopartículas es el área de deportes [3].

2.3 Formación de nanopartículas

Las propiedades ópticas notables demostradas por nanopartículas metálicas están directamente relacionadas con las resonancias de plasmón de superficie que poseen [4]. La resonancia de plasmón superficial (RPS) se refiere a la oscilación de los electrones de conducción que surge como resultado de la incidencia de la radiación electromagnética. Las nanopartículas metálicas que tienen electrones libres tienen resonancias de plasmones que son causadas por la radiación electromagnética en el espectro visible. Ya que las nanopartículas de plata y el oro (junto con el cobre y los metales alcalinos) poseen electrones libres (debido a sus dimensiones a nanoescala), exhiben colores intensos únicos, y las bandas de RPS de estos materiales se pueden detectar usando espectrofotometría en las longitudes de onda de la luz visible.

La resonancia del plasmón superficial exhibida por partículas isotrópicas, tales como esferas, difiere significativamente de la de las partículas anisotrópicas. Mientras que las nanoesferas suelen tener resonancias de plasmones u oscilaciones en una longitud de onda específica, las partículas anisotrópicas tienen ambas oscilaciones transversales y longitudinales que se producen en diferentes longitudes de onda de la luz. Por lo tanto, en

los espectros de partículas anisotrópicas, se detectan dos bandas de resonancia. En las partículas esféricas se muestra solamente un pico en sus espectros [4].

El color mostrado por estas nanopartículas metálicas está supeditado a muchos factores, además de la composición, la forma y el tamaño de estas partículas tienen una influencia sustancial sobre el color y sólo una ligera variación en la geometría puede causar cambios de color significativos, que se reflejan en los espectros. Como se mencionó antes, los espectros de partículas anisotrópicas tales como nanorods muestran dos picos distintos, correspondiente a las oscilaciones transversales y longitudinales. Cuando la relación de aspecto de las nanopartículas se altera incluso ligeramente, las oscilaciones longitudinales de electrones se ven afectadas en gran medida, las cuales pueden causar cambios de color llamativos. La influencia del medio que rodea a las nanopartículas también debe ser considerada, así como el índice de refracción del material en el que se dispersan las nanopartículas, ya que ayuda a determinar las propiedades ópticas. También se ha encontrado que la interacción entre nanopartículas vecinas afecta a la longitud de onda de resonancia, y cuando las nanopartículas están muy juntas, los modelos que describen el comportamiento de las partículas individuales ya no son aplicables.

2.4 Métodos de síntesis de nanomateriales

La síntesis de los nanomateriales es clave para el éxito futuro de esta nueva tecnología y en principio, los métodos para la síntesis de los nanomateriales se pueden dividir en dos clases principales: los métodos de “arriba hacia abajo” y los de “abajo hacia arriba” [5].

2.4.1 “Arriba → Abajo”

Los métodos “arriba-abajo” consisten en técnicas de miniaturización que parten de una partícula macro o microscópica reduciéndola de tamaño hasta el tamaño deseado (nanométrico). Estos métodos de síntesis tienen una gran desventaja, ya que introducen imperfecciones o defectos en la estructura de la superficie de las partículas, lo cual pudiera tener un impacto significativo en las propiedades físicas de las nanopartículas [6].

A pesar de las imperfecciones de la superficie y otros defectos que los métodos “arriba-abajo” pueden introducir, estas técnicas seguirán desempeñando un papel importante en la síntesis y fabricación de nanoestructuras y nanomateriales.

Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. Existen varios métodos que utilizan la aproximación de arriba-abajo, los más representativos son:

- Evaporación térmica
- Proceso de explosión
- Ablación laser
- Molienda mecánica
- Pulverización catódica

2.4.2 “Abajo → Arriba”

Por otra parte, los métodos “abajo-arriba” se basan en la construcción de nanoestructuras átomo por átomo, molécula por molécula, haciendo uso de las fuerzas físicas o químicas presentes a nivel atómico o molecular.

En general, los métodos químicos son de bajo costo para grandes volúmenes, sin embargo, sus desventajas incluyen precursores químicos que pueden contaminar, el uso de disolventes tóxicos y generación de subproductos peligrosos [6].

Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas.

Una de las principales técnicas abajo-arriba es la precipitación química, la cual generalmente se lleva a cabo en una solución acuosa o no acuosa, la cual contiene la sal metálica disuelta. En este método la concentración de los agentes así como la temperatura juegan un papel importante en la producción de nanopartículas monodispersas, mientras que el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula pueden ser controlados variando tanto la temperatura como el valor del pH [6].

2.5 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata han atraído un gran interés debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, en comparación con sus homólogos de tamaño macro [4]. Las NPs de Ag tienen propiedades físico-químicas distintivas, incluyendo una alta conductividad eléctrica y térmica, una mayor superficie de dispersión Raman, estabilidad química, actividad catalítica y aumento en el área superficial por unidad de volumen [4]. Estas propiedades las hacen de valor potencial en las tintas, la microelectrónica y las imágenes médicas [4], además, exhiben amplia actividad bactericida y fungicida que las ha hecho aplicables en una vasta gama de productos de consumo, incluyendo plásticos, jabones, pastas, alimentos y textiles, lo que aumenta su valor de mercado, además, para mejorar la función de máquinas de lavado, refrigeradores, filtros y contenedores de comida [4].

Hasta la fecha, las tecnologías a base de plata nanométrica han aparecido en una variedad de procesos de fabricación y productos finales. Las NPs se pueden utilizar en una forma líquida, tal como un coloide (recubrimiento y spray) o contenida dentro de un champú (líquido) y también puede aparecer incrustado en un sólido tal como una mezcla madre de polímero, o ser suspendidas en una barra de jabón (sólido). También se pueden utilizar ya sea en la industria textil, mediante su incorporación en la fibra (hilado) o emplearse en membranas de filtración de los sistemas de purificación de agua. Además, en investigaciones recientes, las nanopartículas de plata también han demostrado la capacidad de atacar los virus, como el VIH-1, para prevenir posiblemente la transmisión y matar las células infectadas [4].

2.6 Métodos de síntesis de NPs de Ag

Actualmente, muchos métodos se han reportado para la síntesis de NPs de Ag mediante el uso de rutas químicas, físicas, fotoquímicas y biológicas. Cada método tiene sus ventajas y desventajas como costos, escalabilidad, tamaños de partícula y distribución de tamaño. Entre los métodos existentes, los métodos químicos son los más utilizados ya que proporcionan una manera de sintetizar NPs de Ag de formas y tamaños controlados, sin embargo, limita sus aplicaciones ya que algunos de los reactivos usados son tóxicos y contaminan el medio donde las NPs están suspendidas [7].

2.6.1 Síntesis química

El proceso poliol es una ruta de síntesis química, en la cual, la reacción se lleva a cabo mediante la reducción de nitrato de plata (AgNO_3) con etilenglicol en presencia de polivinilpirrolidona (PVP) [7]. En este caso, el etilenglicol funge como agente reductor y disolvente. Se demostró que la presencia de PVP y su relación molar con respecto al nitrato de plata, desempeñan un papel importante tanto en la determinación de la forma como en el tamaño de las NPs de Ag.

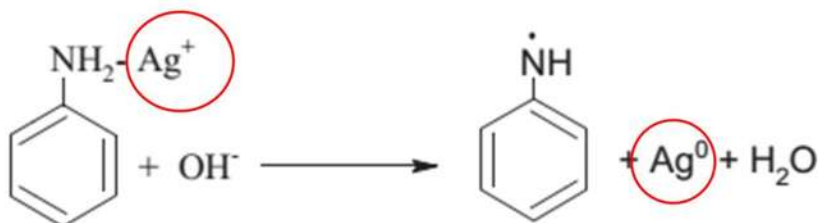
Las NPs de Ag esféricas con un tamaño controlable y alta monodispersidad se sintetizaron mediante el proceso de poliol y una técnica modificada de inyección del precursor [7]. El método modificado de inyección del precursor, requiere de un control en la temperatura y la velocidad de inyección, ya que son factores importantes para la formación de NPs de Ag de tamaños uniformes y reducidos. Nanopartículas con tamaños por debajo de los 20 nm se obtuvieron a una velocidad de inyección de 2.5 mL/s y a una temperatura de reacción de 100 °C. La inyección de la solución precursora caliente, es un medio eficaz para inducir la nucleación rápida en un corto periodo de tiempo, garantizando la formación de NPs de Ag con un tamaño más pequeño y una distribución de tamaño estrecha.

Generalmente, el proceso de síntesis química en solución de las NPs de Ag, consta principalmente de tres etapas: (i) los precursores del metal, (ii) agentes reductores y (iii)

estabilizantes/agentes de encapsulamiento. La formación de soluciones coloidales a partir de la reducción de sales de plata, implica dos etapas: nucleación y crecimiento. El tamaño y la forma de las NPs de Ag sintetizadas son dependientes de estas dos etapas. Además, para la síntesis de NPs monodispersas con distribución de tamaños uniforme, se requiere que todos los núcleos se formen al mismo tiempo. En este caso, todos los núcleos deben tener el mismo o similar tamaño, y entonces tendrán el mismo crecimiento subsiguiente. La nucleación inicial y el posterior crecimiento de núcleos iniciales se pueden controlar mediante el ajuste de los parámetros de reacción tales como temperatura, pH, precursores del metal, agentes reductores (NaBH₄, etilenglicol, glucosa) y agentes estabilizantes (PVA, PVP, oleato de sodio) [7].

2.6.2 Síntesis por reducción química

El método de síntesis por reducción química, implica, como bien lo dice su nombre, una reacción de oxidación-reducción (redox). Se denomina reacción de reducción-oxidación a toda reacción química en la que uno o más electrones se transfieren entre los reactivos, provocando un cambio en sus estados de oxidación. El agente reductor es aquel elemento químico que suministra electrones de su estructura química al medio, aumentando su estado de oxidación, es decir, siendo oxidado. El agente oxidante es el elemento químico que tiende a captar esos electrones quedando con un estado de oxidación inferior al que tenía, es decir, siendo reducido. A continuación, se presenta una reacción de oxidación-reducción de un complejo de anilina-plata (C₆H₅NH₂-Ag⁺) para obtener plata elemental.



La reducción química es el método más frecuentemente aplicado para la preparación de nanopartículas de plata estables y sus dispersiones coloidales en agua o en disolventes orgánicos [8].

2.6.3 Síntesis verde

Actualmente, un gran número de métodos físicos, químicos, biológicos e híbridos, están disponibles para sintetizar diferentes tipos de nanopartículas. Por ejemplo, la reducción en soluciones, reacciones químicas y fotoquímicas en micelas inversas, descomposición térmica de compuestos de plata, la radiación asistida, electroquímica, sonoquímica, proceso asistido por microondas y, recientemente, por **vía química verde o biosíntesis**.

Aunque, los métodos físicos y químicos son más populares para la síntesis de nanopartículas, el uso de algunos compuestos tóxicos limita parcialmente sus aplicaciones. El desarrollo de métodos seguros ecológicos para la producción biogénica es ahora de más interés debido a la simplicidad de los procedimientos y versatilidad. Debido a su amigabilidad a la funcionalización biológica, las nanopartículas biológicas están encontrando importantes aplicaciones en el campo de la medicina. Se trata de un área nueva y emergente de la investigación en el mundo científico, donde día a día la evolución se nota en que existe un gran futuro en este campo, debido a la viabilidad y a la amplia gama de aplicaciones que se presentan como en: nanomedicina, catálisis, nano-optoelectrónica, etc. Los métodos químicos de síntesis conducen a la presencia de alguna sustancia química tóxica absorbida en la superficie que puede tener efectos adversos en las aplicaciones médicas.

La naturaleza ha desarrollado diversos procesos para la síntesis de materiales inorgánicos nanométricos y micro-escala de longitud, que han contribuido al desarrollo de la relativamente nueva y grande área de la investigación basada en la biosíntesis de nanomateriales. La síntesis utilizando bio-organismos es compatible con los principios de la química verde. La "síntesis verde" de nanopartículas hace uso respetuoso del medio ambiente, no es tóxica y los reactivos son seguros.

Este método es muy similar al método coloidal. La biosíntesis de nanopartículas utiliza un enfoque "abajo hacia arriba", en el que la reacción principal que ocurre es la reducción/oxidación. Se debe reconocer el potencial de las plantas es decir, "Química

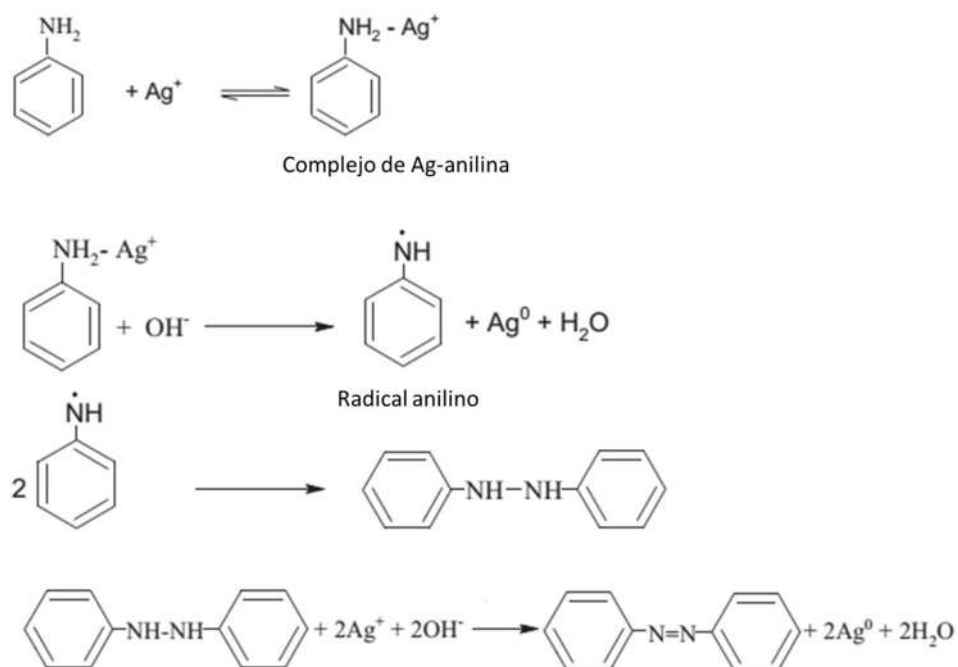
verde" para sintetizar nanopartículas no sólo en el laboratorio, sino también en su entorno natural. El uso de materiales ambientalmente benignos para la síntesis de nanopartículas de plata como el extracto de hojas de la planta, bacterias, hongos y enzimas, ofrecen numerosos beneficios en aplicaciones biomédicas, ya que no utiliza productos químicos tóxicos para el protocolo de síntesis. Este método de síntesis proporciona un avance sobre los métodos físico-químicos, ya que es rentable, favorable al medio ambiente, fácilmente escalable para la síntesis y no hay necesidad de usar alta presión, energía y temperatura. El potencial antimicrobiano de las nanopartículas a base de metal ha llevado a su incorporación en consumibles relacionados con la salud y productos industriales [9].

Este trabajo estará enfocado a la síntesis de nanopartículas de plata por medio de extractos de plantas. Las biomoléculas presentes en los extractos de plantas se pueden utilizar para reducir iones metálicos; esta reducción biogénica de ión de metal a metal base es bastante rápida, fácilmente llevada a cabo a temperatura y presión ambiente. Los agentes reductores involucrados incluyen los diversos metabolitos solubles en agua (por ejemplo, alcaloides de plantas, compuestos fenólicos, terpenoides) y coenzimas. Una amplia gama de extractos de especies de plantas se han utilizado con éxito en la fabricación de nanopartículas.

2.7 Discusión del estado del arte

2.7.1 Síntesis de NPs de Ag por el método de reducción química

La síntesis de nanopartículas de plata por el método de reducción química, generalmente utiliza, borohidruro de sodio, hidrazina, ácido ascórbico y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), dodecil sulfato de sodio, polivinilpirrolidona, como agentes reductores y estabilizadores, respectivamente, para preparar nanocristales de plata de forma y tamaño controlados. El método de reducción química es probablemente el más versátil y económico. Khan y col. [8], en su investigación presentaron un nuevo método para la preparación de nanopartículas de plata estabilizadas con CTAB, basado en la reducción de los iones Ag^+ por anilina. Reportaron también que, la formación de nanopartículas respecto al tiempo fue extremadamente lenta, además, establecieron que la velocidad de reducción de los iones Ag^+ disminuye con el aumento de la concentración de anilina. Por lo tanto, sus resultados sugirieron que la forma, el tamaño y la distribución del tamaño de las nanopartículas de Ag no se modifican significativamente con la concentración de anilina. Sin embargo, obtuvieron NPs de Ag esféricas con tamaños dentro del rango de 10 a 30 nm. A continuación se presenta un mecanismo de reducción propuesto por Khan y col.



El primer mecanismo representa la formación del complejo de anilina con plata, cuando se añadieron los iones de Ag^+ a una solución de anilina, los iones Ag^+ se unieron fuertemente a la anilina para formar complejos con el grupo nucleófilo $-\text{NH}_2$. El grupo fenilo está retirando electrones, por lo tanto, una gran carga positiva reside en el átomo de nitrógeno, desactivándolo para la complejación.

Por otro lado, Wang y col. [10], estudiaron la síntesis de nanopartículas de plata por el método de reducción química, mediante la reducción de los iones de plata presentes en la solución de nitrato de plata por glucosa en presencia de PVP (polivinilpirrolidona), fungiendo como agente reductor la glucosa y el PVP como estabilizante. Además, agregaron hidróxido de sodio (NaOH) para acelerar la velocidad de reducción de los iones de plata. También observaron que, a una relación molar de $\text{NaOH}:\text{AgNO}_3$ en un rango de 1.4 a 1.6, las nanopartículas de plata eran estables y la reducción procedía con mayor rendimiento; de igual manera, a una relación en peso de $\text{PVP}:\text{AgNO}_3$ no menor a 1.5, las partículas podrían ser dispersadas individualmente, ya que el PVP encapsula a las mismas y evita el crecimiento y aglomeración. Mencionan también que, debido a la velocidad de mezclado de los reactivos tiende a formarse Ag_2O .

2.7.2 Síntesis verde de nanopartículas de plata

En la síntesis de nanopartículas usando extractos de plantas, el extracto es simplemente mezclado con una solución de sal metálica a temperatura ambiente. Las nanopartículas de plata, oro y algunos otros metales han sido producidas de esta manera. La naturaleza del extracto de la planta, su concentración, la concentración de la sal metálica, el pH, la temperatura y el tiempo de contacto se sabe que afectan a la velocidad de reducción de las nanopartículas, su cantidad y otras características [11].

En la literatura se ha reportado una amplia variedad de plantas utilizadas para la síntesis verde de nanopartículas de plata. Umesh y col. [12], han reportado la síntesis verde de NPs de Ag mediante el uso del extracto de semilla molida de *Artocarpus heterophyllus Lam.* (ASPE) comúnmente conocida como yaca, la cual actúa como agente reductor. La semilla

de yaca contiene jacalín, una lecitina que es la única proteína principal que representa más del 50% de las proteínas del extracto, las nanopartículas obtenidas presentaron irregularidades en forma y diferentes rangos de tamaño de 3 a 25 nm con un tamaño promedio de 10.78 nm. Deenadayalan y col. [13] estudiaron la síntesis verde de NPs de Ag utilizando extracto acuoso de *Alternanthera dentata* (Ruby) y obtuvieron un tamaño promedio de NPs alrededor de 10-80 nm. Prakash y col. [14], utilizaron extracto de la hoja de *Mimusops elengi L.* (Cereza española) para realizar la síntesis, obtuvieron NPs de formas esféricas con un rango de tamaños de 55 a 83 nm.

Otari y col. [15], utilizaron un método de fitosíntesis para producir NPs de Ag mediante extracto acuoso de semillas de *Manilkara zapota L.* (MZSE), comúnmente conocido como árbol de chicle, las NPs de esta manera sintetizadas presentaron tamaños de 5-35 nm. Kumara y col. [16], realizaron la síntesis verde de NPs usando extracto de la planta *Boerhavia diffusa* como agente reductor. Esta planta es comúnmente conocida como: batatilla, matapavo, punarnava, tostón y yerba tostada, en esta investigación mediante la microscopía electrónica de barrido se confirmó la formación de nanopartículas muy pequeñas y esféricas con una distribución de tamaño uniforme alrededor de 25 nm.

Shankar y col. [17] informaron acerca de la rápida biosíntesis de nanopartículas estables de plata, oro y bimetalicas núcleo-coraza de Ag/Au con 20 g de biomasa de hojas de *Azadirachta indica* (nim) y solución acuosa de AgNO_3 1 mM, con una reducción del 90% de los iones metálicos dentro de 4 h. Prathna y col. [18], quienes sintetizaron nanopartículas de plata empleando extracto de *Citrus Kunth* (limón), mostraron que se formaban nanopartículas más pequeñas al incrementar la relación entre el extracto y la solución metálica, lo cual se debió al incremento de la cantidad de agentes bioreductores cuando se incrementa la concentración del extracto en el medio de reacción. La Tabla II.1 muestra algunas plantas que han sido utilizadas en la síntesis verde de nanopartículas de plata, así como, datos de parámetros importantes como temperatura de reacción, volumen de sal precursora, concentración de sal de plata, además, muestra el tamaño de las NPs sintetizadas.

Tabla I. 1. Plantas utilizadas en la biosíntesis de NPs de Ag.

Nombre de la planta/agente reductor	Características de precursor (AgNO ₃) adicionado		Condiciones de reacción		Tamaño promedio de las NPs (nm)	Referencias
	Vol. (ml)	Concentración	T (°C)	Tiempo (h)		
<i>Boerhaavia diffusa</i>	90	0.1	100	24	25	[19]
<i>Vitis vinifera</i> (uva)	10	20 x10 ⁻³	25	24	18-20	[20]
<i>Eucalyptus chapmaniana</i>	90	0.01	50	1	60	[21]
<i>Carica papaya</i>	90	1x10 ⁻³	25	6	10-50	[22]
<i>Eclipta prostrate</i>	88	1x10 ⁻³	25	1	35-60	[23]

2.7.2.1 Efecto del pH

Se ha demostrado que el tamaño y la forma de las nanopartículas biosintetizadas podrían ser manipulados mediante la variación del pH de las mezclas de reacción. La importante influencia del pH en la reacción, es su capacidad de cambiar las cargas eléctricas de las biomoléculas, que pueden afectar a su capacidad de encapsulamiento-estabilización y subsecuentemente el crecimiento de las nanopartículas. Esto podría resultar en la formación favorable de nanopartículas de ciertas formas en un intervalo de pH particular, por lo que se podría lograr una mayor estabilidad.

Para la síntesis de nanopartículas de plata se ha observado otro comportamiento, tal y como lo reportaron Sathishkumar y col. [24], quienes emplearon polvo y extracto de *Curcuma*

longa (cúrcuma). En sus resultados mostraron que nanopartículas de plata grandes se formaron para valores de pH pequeños, mientras que las nanopartículas pequeñas y altamente dispersadas se formaron a mayores valores de pH. Lo anterior se debe a que para un pH alcalino, un gran número de grupos funcionales cargados negativamente están disponibles para la unión de Ag, facilitando una mayor cantidad de Ag catiónica para reducirse y formar un gran número de nanopartículas con diámetros más pequeños debido a la mayor tendencia de nucleación en lugar de agregación.

La síntesis verde de NPs de Ag realizada por Baghizadeh y col. [25] se realizó con extracto de Caléndula, en la cual se estudió el efecto del pH sobre la reacción de síntesis en condiciones ácidas, básicas y neutras, los resultados mostraron que la síntesis realizada en condiciones neutras y con un aumento en el pH (básicas) no ocurre cualquier alteración en los espectros de UV-Vis de las NPs de Ag (ver Figura 2.5), este comportamiento indica que a valores de pH altos la síntesis de NPs de Ag no se ve favorecida. Por otra parte, en la condición ácida no se observó una banda de absorbancia para las NPs de Ag, ya que es poco el número de nanopartículas formadas. La agregación para formar nanopartículas más grandes se creía estaba favorecida por la nucleación.

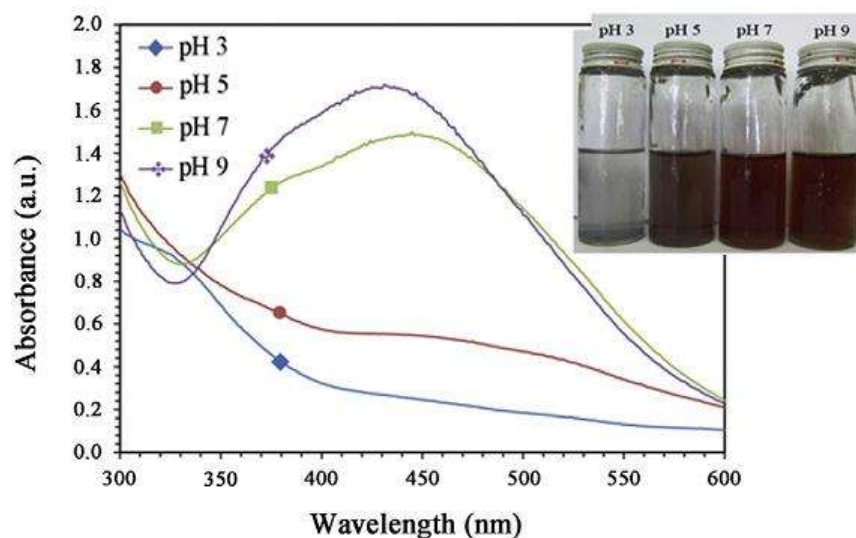


Figura 2. 5. Espectros de UV-Vis de NPs de Ag a diferentes valores de pH. En el recuadro de la figura se observan los contenedores con las muestras sometidas a ultrasonido de la biomasa de *Caléndula officinalis* con NPs de Ag a diferentes pH [25].

El valor inicial de pH de las soluciones acuosas de AgNO_3 es un parámetro importante en la síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de piel de mango [26]. Se observó que el color de las soluciones AgNO_3 cambió de color amarillo marrón a marrón oscuro cuando se aumentó el pH inicial de la solución, el cambio de color es un indicativo de la biorreducción de los iones de plata mediada por el extracto de piel de mango y la sucesiva formación de nanopartículas de plata después de 15 min de las reacciones.

2.7.2.2 Efecto de la temperatura

Varios estudios han encontrado que el control de la temperatura, durante el proceso de síntesis por medio de plantas es crítico en el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas. Lukman y col. [27], reportaron que exudados de semillas de *Medicago sativa* pueden producir nanotriángulos de plata a temperaturas mayores de 30°C debido a la supresión de agentes controladores de forma a temperaturas más bajas. El trabajo de biosíntesis de NPs de Ag usando caléndula [25] demostró que la velocidad de formación de las nanopartículas aumentó a medida que se incrementa la temperatura en la síntesis, como se puede ver en la Figura 2.6.

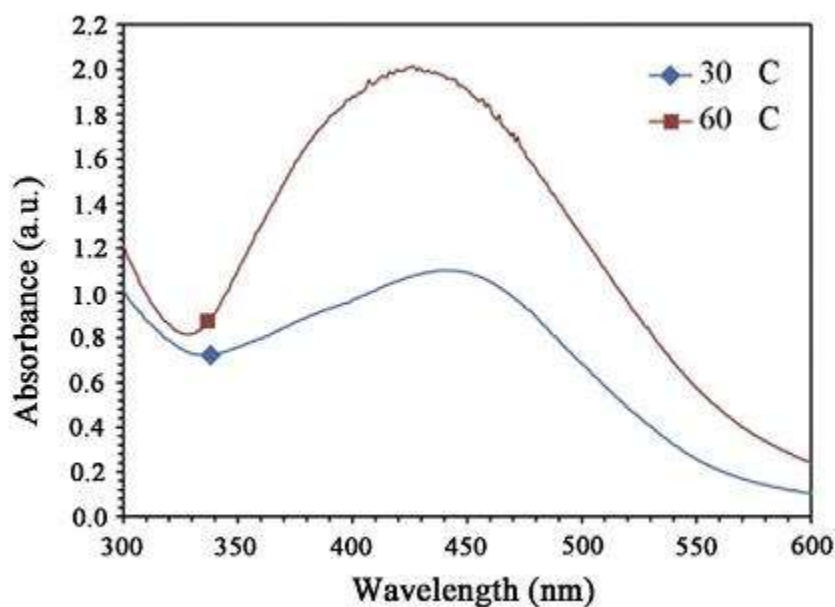


Figura 2. 6. Espectros de UV-Vis de NPs de Ag sintetizadas a 30°C y 60°C [25].

El trabajo realizado por Haytham y col. [28], muestra la influencia de la temperatura sobre la síntesis de NPs de Ag, en el cual se reporta que la temperatura afecta el proceso de reducción de la plata, en su análisis informaron que a temperaturas por debajo de 50 °C las soluciones muestran un color marrón rojizo tenue y espectros de UV-Vis menos intensos, en comparación con las nanopartículas de plata formadas aumentando la temperatura de reacción de 50 a 100°C, las cuales presentaron un banda de resonancia del plasmón superficial de plata mayor. De tales resultados, concluyeron que a mayor temperatura de incubación (60, 80 y 100 °C) el color de la solución se intensificó y, por ende, los picos de UV-Vis se intensificaron.

Por otro lado, a temperatura ambiente (30 °C) la solución tomó 10 min para cambiar de color, mientras que, en las mezclas de reacción realizadas a temperaturas de 40 a 100 °C, el proceso de reducción fue más rápido y el color marrón rojizo se desarrolló dentro de 5 min. La intensidad máxima del pico de absorbancia se observó a 100 °C. El espectro de UV-Vis afilado y estrecho observado a una longitud de onda de 412 nm, indica la formación de nanopartículas de plata más pequeñas, mientras que, a menor temperatura de reacción (30°C), el pico de absorción ubicado en 440 nm, es ancho y menos afilado, lo que indica claramente un aumento en el tamaño de las nanopartículas de plata formadas.

2.7.2.3 Efecto de la concentración de extracto de la planta

El efecto de la cantidad de extracto en la síntesis representa un papel importante en la formación de nanopartículas de plata, Ashokkumar y col. [29], por medio de un estudio de UV-Vis (Figura 2.7), en su trabajo observaron que la absorbancia del pico depende de la concentración del extracto de la planta, siendo así más nítida con una concentración más alta. La posición del pico del plasmón depende del tamaño y forma de las partículas, el aumento en la cantidad de extracto en el medio de reacción ocasionó un desplazamiento del pico de absorción de 428 a 402 nm y este cambio indica que el diámetro medio de las nanopartículas de plata disminuye. A medida que la banda de absorción se hace estrecha y afilada significa que se tienen nanopartículas de plata esféricas y monodispersas.

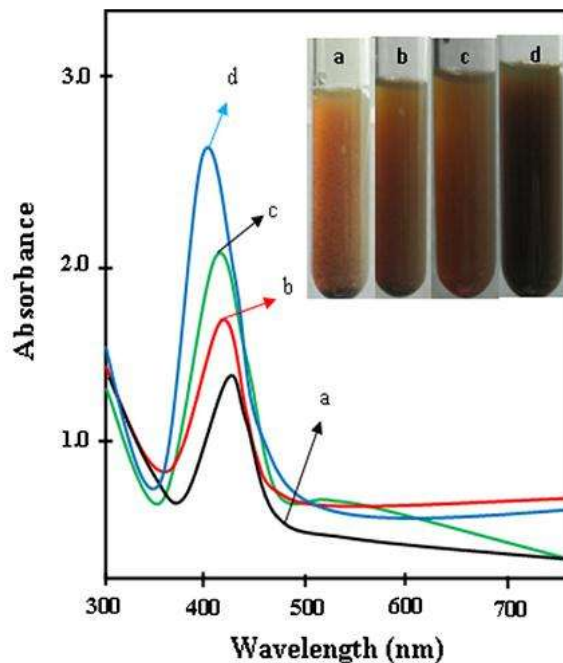


Figura 2. 7. Espectros de UV-Vis de NPs de Ag usando extracto de las hojas de *A. indicum* a diferentes concentraciones (a) 2.0 mL, (b) 2.5 mL, (c) 3.0 mL y (d) 3.5 mL [29].

La concentración del extracto de hojas de *A. indicum* [29] aumenta, por lo tanto, el número de biomoléculas disponibles para reducir los iones de plata es mayor y nanopartículas muy pequeñas se forman, dando lugar a una banda de absorbancia aguda e intensa (como se puede apreciar en la curva azul de la Figura 2.7), de igual manera se muestra el cambio de color en la solución (recuadro), aumentando la coloración para la concentración mayor.

La cantidad de material vegetal juega un papel crítico en el control del tamaño y la disparidad de tamaño de las nanopartículas de plata, de tal manera que las más pequeñas y con una distribución de tamaño estrecha se producen cuando más extracto de la planta es añadido en el medio de reacción. Por lo tanto, esta variable es un factor muy importante en la síntesis verde de nanopartículas.

Umesh y col. [12], en su trabajo reportaron dos metodologías diferentes de reducción de nanopartículas de plata, en una utilizaron concentraciones variadas del extracto de la planta *Artocarpus heterophyllus Lam.* (ASPE): 2, 4, 6, 8, y 10 % w/v, con una concentración fija

de sal de plata (AgNO_3) de 6 mM. Posteriormente, diferentes concentraciones de AgNO_3 se añadieron a una concentración fija de 6 % w/v del extracto acuoso de la planta. De acuerdo al análisis de la resonancia del plasmón superficial (*SPR*, por sus siglas en inglés) de los espectros UV-Vis (Figura 2.8), en general se observó que, a medida que la concentración de extracto de planta aumenta, la intensidad de la banda *SPR* se incrementa, lo cual indica que a mayor concentración de extracto de planta hay mayor producción de nanopartículas de plata.

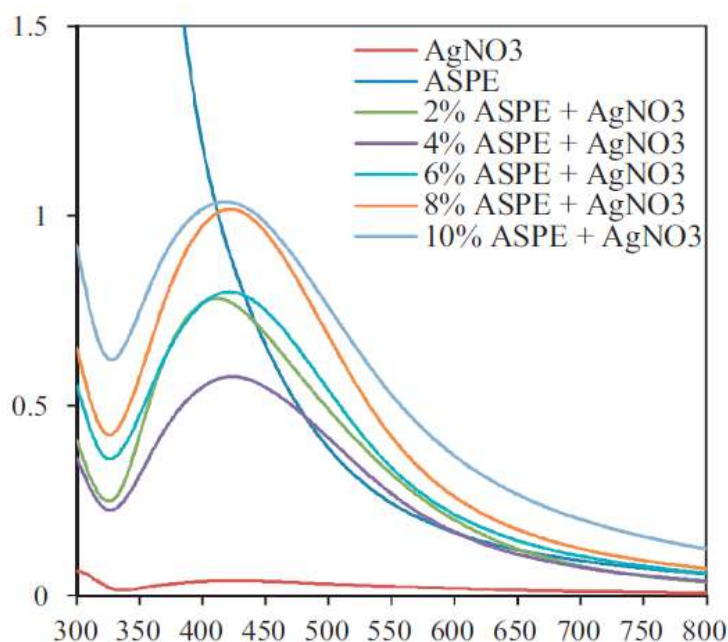


Figura 2. 8. Espectros de UV-Vis de las AgNPs (diluidas 1:6), registrados como una función de la concentración de ASPE en la reacción usando una solución de 6 mM de AgNO_3 [12].

Hojas de *Cinnamomum camphora* secadas al sol cuando se incubaron con precursores de plata o de oro acuosos a temperatura ambiente produce tanto nanopartículas de plata (55-80 nm) triangulares o nanopartículas esféricas de oro [30]. La marcada diferencia en la forma de las nanopartículas de oro y plata se podría atribuir al potencial comparativo de las biomoléculas de protección y reductoras que presentan los extractos de las hojas. Los componentes heterocíclicos poliol y solubles en agua fueron principalmente responsables de la reducción de iones de plata o iones cloroaurato. La biosíntesis de nanopartículas es un

enfoque ecológico para recuperación de metales, por ejemplo oro, que son catalíticamente activos a las reacciones y la oxidación selectiva de CO.

2.7.2.4 Efecto de la concentración de nitrato de plata sobre la síntesis de NPs de Ag

La concentración de nitrato de plata sobre la síntesis de nanopartículas de plata es un parámetro importante ya que es la cantidad máxima de plata que participa en el proceso de reducción, por lo tanto, variaciones de concentración se realizan durante el proceso para observar la influencia de esta variable en la formación de nanopartículas de plata. Baghizadeh y col. [31] analizaron el efecto de la concentración de nitrato de plata en diferentes concentraciones (1, 3, 5 y 10 mM) sobre la formación de NPs de Ag, siendo la solución a 10 mM la condición donde se obtuvo el máximo rendimiento en la formación de las mismas. Haytham y col. [28] observaron un cambio de color en la solución cuando se aumentó la cantidad de nitrato de plata, pasando de color marrón amarillento a tonos más oscuros (marrón rojizo), este cambio en la coloración de la solución ocasiona una modificación en la banda de absorción del plasmón superficial de las NPs de Ag en los espectros de UV-Vis, el pico se hizo más intenso y agudo, lo cual tiene que ver con el tamaño, cantidad y distribución de las nanopartículas de plata en solución.

2.7.3 El efecto bactericida de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata han atraído un gran interés en la investigación debido a sus importantes aplicaciones como material antimicrobiano, catálisis y una mayor superficie de dispersión Raman. Los iones de plata y compuestos a base de plata son altamente tóxicos para los microorganismos, que han mostrado efecto biocida contra muchas especies microbianas. El mecanismo de la acción inhibitoria de los iones de plata sobre los microorganismos es parcialmente conocido. Se cree que el ADN pierde su capacidad de replicación y las proteínas celulares se desactivan con el tratamiento con Ag^+ . Además, también se demostró que la Ag^+ se une a los grupos funcionales de las proteínas, lo que resulta en una desnaturalización de las proteínas. Las nanopartículas de plata son especies altamente reactivas debido a sus grandes áreas superficiales. El reciente resurgimiento del

interés por este elemento en particular se centra en la amenaza creciente de resistencia a los antibióticos, causada por el abuso de los mismos.

Hay varias hipótesis para explicar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata. La rápida descomposición de las nanopartículas de plata libera plata iónica que inactiva bacterias vitales, enzimas esenciales interactuando con grupos tiol. Los iones de plata pueden inhibir la replicación del ADN bacteriano, causando daño bacteriano, disminuyendo los niveles de trifosfato de adenosina intracelular (ATP) y finalmente la muerte celular.

La alta relación específica superficie/volumen de las nanopartículas de plata aumenta el contacto con los microorganismos, la promoción de la disolución de los iones de plata y mejora así la eficacia biocida. La capacidad de las nanopartículas de plata para liberar iones de plata es la clave de su actividad bactericida.

Se espera que la nanotecnología abra nuevos caminos para combatir y prevenir enfermedades mediante la adaptación de los materiales a nivel atómico. Entre los nanomateriales más prometedores con propiedades antibacterianas están las nanopartículas metálicas, que exhiben una mayor actividad química debido a su gran relación superficie a volumen y su estructura de la superficie. El estudio de los nanomateriales bactericidas es particularmente oportuno teniendo en cuenta el reciente aumento de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos más potentes. Esto ha promovido la investigación en la bien conocida actividad de iones de plata y compuestos basados en plata, incluyendo nanopartículas de plata. Las propiedades bactericidas de las nanopartículas son dependientes del tamaño, ya que las únicas nanopartículas que presentan una interacción directa con las bacterias preferentemente tienen un diámetro de 1-100 nm.

El desarrollo de nuevas cepas de bacterias resistentes a antibióticos actuales se ha convertido en un serio problema en la salud pública. Por lo tanto, se presenta un fuerte estímulo para el desarrollo de nuevos bactericidas. Esto hace actual la investigación en nanomateriales bactericidas [30].

Las bacterias tienen diferentes membranas estructurales las cuales permiten una clasificación general de ellas como Gram-positivas o Gram-negativas. Las diferencias estructurales se hallan en la organización de un componente clave de la membrana, peptidoglicano. Las bacterias Gram-negativas solo exhiben una capa delgada de peptidoglicano (aproximadamente 2-3 nm) entre la membrana citoplasmática y la membrana exterior; en contraste, la bacteria Gram-positiva carece de membrana exterior, pero tiene una capa de peptidoglicano de alrededor de 30 nm de espesor. Desde hace tiempo se sabe que la plata exhibe fuerte toxicidad contra un amplio rango de microorganismos; NPs de Ag son muy eficientes en la interrupción de la membrana bacteriana y, de este modo, ocasionan la producción de radicales libres incluyendo especies reactivas oxidantes (*ROS*, por sus siglas en inglés). La producción de *ROS* es también una de las razones de la toxicidad, ya que causa el estrés oxidativo, la inflamación, daños de ADN y proteínas. Por esta razón los compuestos basados en plata han sido ampliamente usados en muchas aplicaciones bactericidas. Vale la pena mencionar algunos ejemplos tales como compuestos inorgánicos con una lenta velocidad de liberación de plata que se utilizan actualmente como conservadores en una variedad de productos; otra aplicación actual incluye compuestos basados en micro esferas de gel sílice, las cuales contiene un tiosulfato de plata complejo, que son mezclados dentro de plásticos para protección antibacteriana duradera. Los compuestos de plata también han sido utilizados en el campo de la medicina para tratar quemaduras y una variedad de infecciones.

La aparición de cepas bacterianas resistentes hacia los antibióticos conocidos es un problema enorme, que promueve un fuerte incentivo a buscar otras maneras de crear más bactericidas. Las nanopartículas son comparativamente mucho más reactivas químicamente que sus homólogos a granel.

Se ha estudiado la interacción de las nanopartículas de metal con virus y se observó que las NPs de Ag se someten a una interacción dependiente del tamaño con el virus VIH-1, donde sólo NPs con un tamaño de 1-10 nm pueden pegarse al virus [33]. Además, se encontraron nanopartículas con un efecto completamente citotóxico para *Escherichia coli* para concentraciones superficiales tan bajas como 8 μg de NPs de Ag/cm² [34].

Las nanopartículas de plata de 20-30 nm obtenidas usando hojas de *Acalypha indica* (hierba del golpe), mostraron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Vibrio cólera* [35]. Mientras que se ha informado que las nanopartículas de plata de 3-12 nm obtenidas usando cáscaras de *Citrus sinensis* (naranja dulce) muestran actividad contra *Bacillus subtilis* [36]. Las partículas de tamaños entre 33-67 nm obtenidas usando *Allium cepa* (cebolla) muestran actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. typhimurium* [37]. Las nanopartículas de plata de tamaños de 8 nm obtenidas usando hojas de *Nicotiana tobaccum* (nicotina) inhiben *Pseudomonas putida*, *P. vulgaris*, *Escherichia coli* DH5, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhi* [38].

Las dimensiones del área superficial y la energía de superficie podrían ser importantes propiedades que contribuyen de algún modo a la toxicidad. Por lo tanto, no sería poco razonable proponer que la hipótesis de la toxicidad de nanopartículas de plata podría basarse en la superficie disponible expuesta para la reacción con la célula, aumentando con la disminución de tamaño de las nanopartículas o incremento de la concentración de NPs individuales por unidad de volumen [38].

2.7.4 Compuestos orgánicos en las plantas

Se ha reportado en la literatura que los compuestos orgánicos solubles en agua presentes en el extracto acuoso de las plantas pueden ser los responsables de la estabilización eficiente de nanopartículas y de la reducción de iones metálicos Ag^+ . La presencia de dichas sustancias se confirma mediante estudios de espectroscopía de infrarrojo (FTIR).

Prakash y col. [14], con el fin de identificar los compuestos responsables de la biorreducción de ion Ag^+ y la estabilización de NPs de Ag producidas utilizaron espectroscopía FTIR. Anteriores informes a este estudio informaron que las hojas de *Mimusops elengi* L., contienen diversos compuestos orgánicos tales como: alcaloides, flavonoides, taninos, terpenoides, esteroides, glicósidos y benzenoides.

La medición mediante espectroscopía de IR se utilizó para predecir la capacidad del extracto de hoja *Mimusops elengi L* para reducir y estabilizar. Se registraron los espectros de FTIR para el extracto de la hoja y también para las NPs de Ag. El espectro FTIR del extracto *Mimusops elengi L.*, presentó señales en 3415 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} y 1041 cm^{-1} . La banda a 3415 cm^{-1} es responsable del estiramiento del enlace O-H. La banda en 2928 cm^{-1} es debida a la presencia del estiramiento del enlace aldehídico C-H y se trasladó a una frecuencia más baja (2925 cm^{-1}) en NPs de Ag, en comparación con el polvo de la hoja en crudo. La banda de 1618 cm^{-1} en polvo de la hoja *Mimusops elengi, L.* fue debido a la presencia de vibraciones de una amida I y esta banda se desplaza a 1623 cm^{-1} en NPs debido a las proteínas que posiblemente se unirán a NPs de Ag a través de los grupos amina. La banda de 1041 cm^{-1} es responsable del estiramiento en enlaces C-O-C, que podría atribuirse a la reducción de Ag^+ , porque la banda se desplaza a 1038 cm^{-1} en nanopartículas de plata [14].

2.7.5 Fitoquímica de *Passiflora incarnata*

Una investigación sobre *P. incarnata* muestra que diversos constituyentes bioactivos pueden contribuir a los efectos clínicos notificados, probablemente de una manera sinérgica [39]. Actualmente, los investigadores creen que sólo una parte de los compuestos farmacológicamente activos han sido identificados con precisión. Las partes aéreas de *Passiflora incarnata* se caracterizan por la presencia de un patrón de varios componentes primarios que consisten en flavonoides, maltol, glucósidos cianogénicos y alcaloides de indol. Los alcaloides de indol están representados por Harman, harmin, harmalin, harmol y harmalol, que puede actuar como inhibidores de la monoamino-oxidasa, pero están presentes en pequeñas cantidades.

Los flavonoides representan 2.5% de los compuestos en esta planta (Tabla II.2), con vitexina, isovitexina, orientin, isoorientina, apigenina, kaempferol, vicenin, lucene y saponarin identificado. Además, fenólico, graso, linoleico, linolénico, palmítico, oleico y mirístico están presentes, así como los ácidos fórmico y butírico, cumarinas, fitosteroles y aceites esenciales.

2.7.6 Fitoquímica de *Valeriana officinalis*

Las raíces de *V. officinalis* contienen algunos compuestos con actividad farmacológica demostrada, estos incluyen el aceite esencial y sus sesquiterpenoides (ácido valerénico), iridioides (valepotriatos) y sus productos de descomposición como el baldrinal y homobaldrinal, aminoácidos (arginina, GABA, glutamina, tirosina), y alcaloides. *V. officinalis* también contiene pequeñas cantidades de ácidos fenólicos y flavonoides, ácido clorogénico, ácido cafeico, colina, β -sitosterol, ácidos grasos y varios minerales [40].

Terpenoides

El aceite volátil producido por esta especie consiste en una mezcla de mono y sesquiterpenoides. Los sesquiterpenoides son los componentes de mayor interés e importancia por su quimiotaxonomía y actividad biológica que presentan. El aceite esencial se encuentra entre 0.1 a 0.6% y su composición varía significativamente; contiene mono y sesquiterpenos carbonados, dentro de los constituyentes se encontró acetato de bornilo, valerianol, valeranona, criptofauronol y valeranal. Los sesquiterpenos tienen tres tipos de estructuras basadas en los esqueletos de kesano, valeranona y ácido valerénico. El ácido valerénico y sus derivados (ácido acetoxivalerénico y ácido hidroxivalerénico) han sido reportados como característicos de esta especie y de sus subespecies. Sin embargo, estos compuestos han sido encontrados en otras especies.

Más de 150 compuestos han sido reportados en el aceite esencial. El acetato de bornilo y el isovalerato han sido reportados como los componentes primarios del aceite esencial, otros componentes primarios incluyen valerianol, valeranona y valeranal; otros compuestos secundarios incluyen isoborneol, borneol, acetato de isobornilo, terpinoleno, α -pineno, β -pineno, kanfeno, β -cariofileno y limoneno. Las fórmulas químicas de algunos de los componentes más frecuentemente encontrados se describen en las Figuras 2.9 a 2.11 [40].

Entre otros terpenoides no presentes en el aceite volátil de *V. officinalis* están los Valepotriatos que son triésteres de un terpenoide, el alcohol trihídrico; este alcohol tiene la

estructura de un iridioide ciclopentapirano con un anillo epóxido unido. Las concentraciones de valepotriatos están entre 0.5 y 2%, sin embargo en la raíz este porcentaje puede llegar hasta 14% dependiendo de la especie. Los valepotriatos se degradan rápidamente, especialmente en soluciones ácidas. Secada cuidadosamente, *V. officinalis* puede llegar a contener 0.8% de valepotriatos [40].

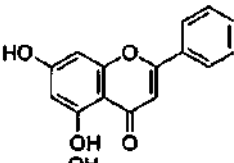
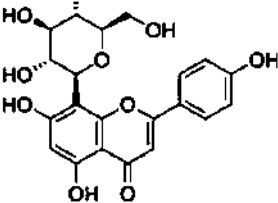
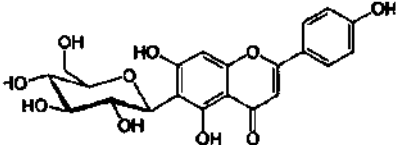
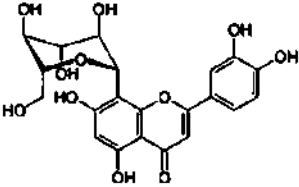
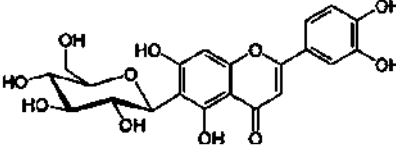
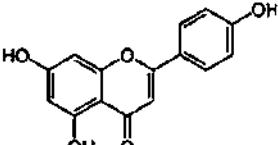
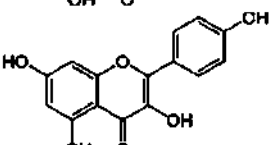
Flavonoide	Fórmula molecular	Esqueleto
Crisin	$C_{15}H_{10}O_4$	
Vitexina	$C_{21}H_{20}O_{10}$	
Isovitexina	$C_{21}H_{20}O_{10}$	
Orientina	$C_{21}H_{20}O_{11}$	
Isoorientina	$C_{21}H_{20}O_{11}$	
Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	

Figura 2. 9. Terpenoides en *V. officinalis* [40].

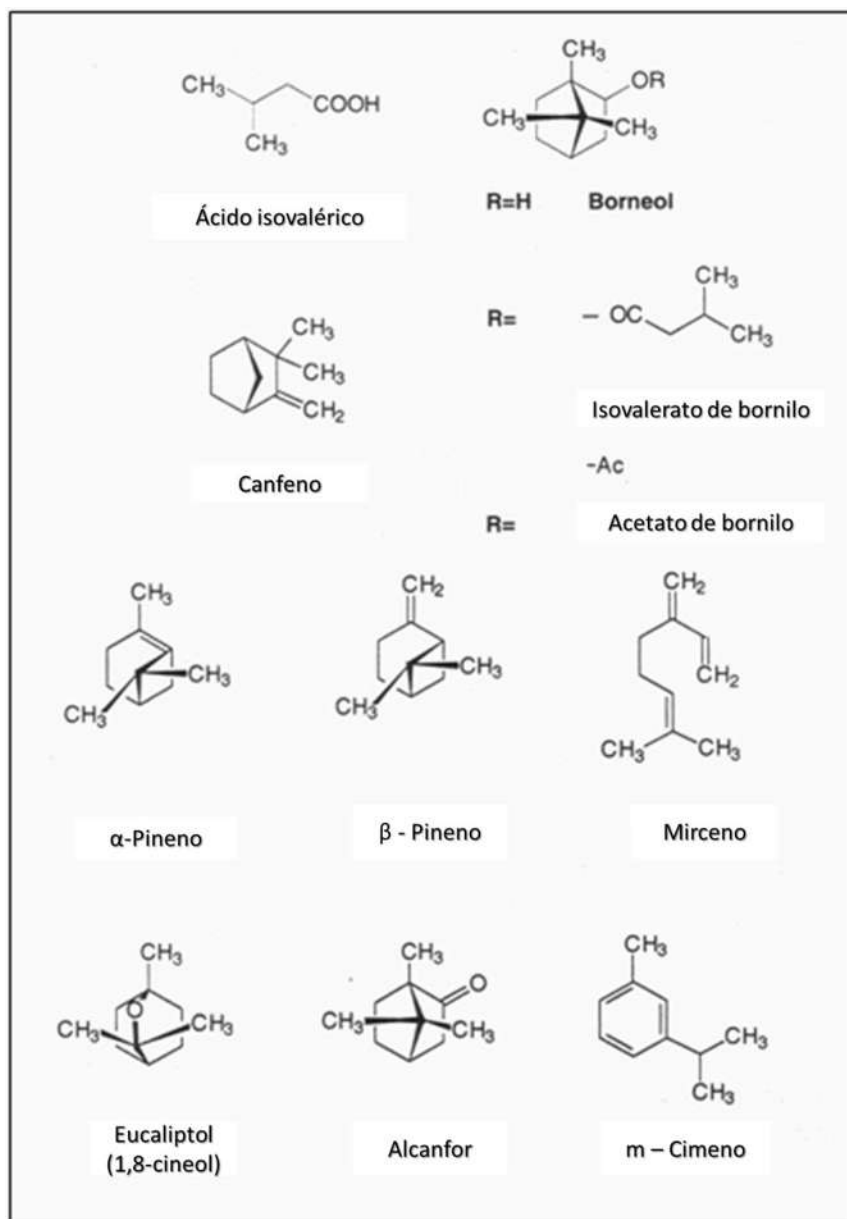


Figura 2. 10. Monoterpenos y Sesquiterpenos encontrados en *Valeriana officinalis* [40].

Los valepotriatos fueron aislados por primera vez en 1996 de *Valeriana wallichii*. El aislamiento de estas sustancias fue de gran interés ya que ello proveyó algunas respuestas en torno al efecto sedativo tranquilizante de los extractos de valeriana, los cuales no podían ser explicados únicamente con base en la cantidad de aceite volátil presente [40]. El esqueleto monoterpénico de los valepotriatos es esencialmente el mismo que el del grupo de glicósidos monoterpénicos conocidos como iridioides, sin embargo los valepotriatos usualmente no tienen un azúcar residual en su estructura [40].

Los primeros tres valepotriatos aislados de *V. Wallichii* fueron nombrados como valtrato, acevaltrato y didrovaltrato.

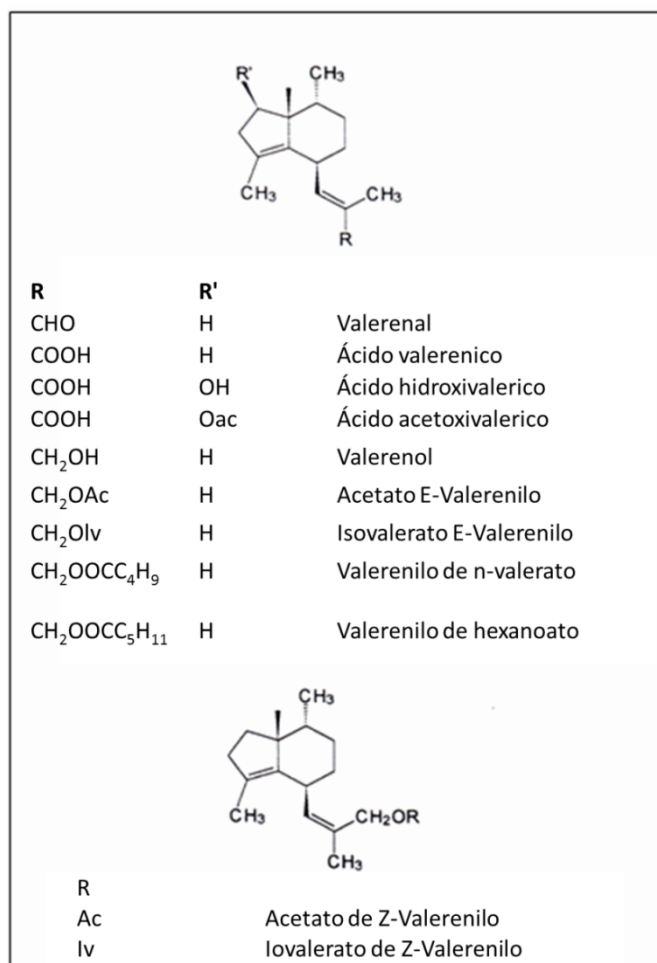


Figura 2. 11. Compuestos de derivados valerénicos en *V. officinalis* [40].

Basados en su estructura química, los valepotriatos pueden ser divididos en cuatro grupos: tipo dieno, tipo monoeno, tipo hidrino-valtrato y tipo dexosi monoeno de valepotriatos [41]. Los valepotriatos son compuestos inestables: ellos son termolábiles y se descomponen rápidamente bajo condiciones ácidas o básicas, en soluciones acuosas y también en soluciones alcohólicas. Los valepotriatos se hidrolizan rápidamente y no se encuentran presentes cantidades significantes de los mismos en soluciones acuosas o alcohólicas diluidas, después de pocos días.

Alcaloides

En algunas plantas medicinales los alcaloides son los metabolitos secundarios más importantes pero este no es el caso de Valeriana, donde los alcaloides presentes se encuentran en pocas cantidades. La presencia de alcaloides en este género se conoce desde finales del siglo XIX, pero no fue sino hasta 1967 que se aislaron los alcaloides valerianina y actinidina de *V. officinalis* [17].

Aminoácidos

V. officinalis contiene una cantidad apreciable de aminoácidos. En un estudio realizado se encontró la presencia de tirosina, glutamina y GABA (ácido γ -amino butírico) [41]. En la Figura 2.11, se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

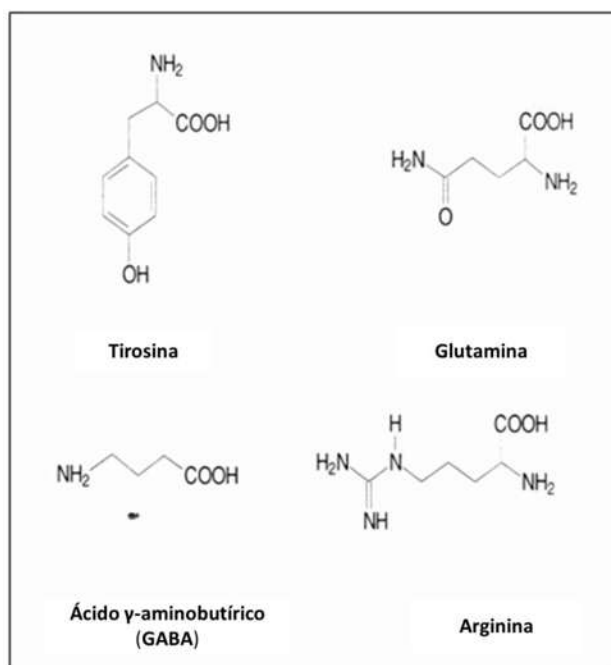


Figura 2. 12. Aminoácidos presentes en *Valeriana officinalis* [41].

La síntesis de nanopartículas de plata por reducción química tiene la ventaja de formar nanopartículas de tamaños por debajo de los 50 nm, aunque, la velocidad de formación es lenta y la concentración del agente reductor no modifica de manera significativa la forma ni la distribución del tamaño. En este tipo de síntesis generalmente se utilizan reactivos tóxicos como agentes reductores y estabilizadores.

Por otro lado, la síntesis verde de nanopartículas de plata es un método económico, sencillo, no utiliza reactivos tóxicos, se puede realizar a temperatura ambiente y es amigable con el medio ambiente. Se pueden utilizar extractos de plantas, microorganismos, hongos, bacterias, levaduras, etc., como agentes reductores, lo cual le da una ventaja sobre el método convencional. Las variables más importantes a controlar utilizando este método son: la concentración tanto de la sal precursora como del agente biológico que se utilice. Se obtienen NPs de Ag en un rango de tamaño de 10 a 100 nm.

En la biosíntesis de NPs utilizando extractos de plantas se ha utilizado *Artocarpus heterophyllus Lam*, *Alternanthera dentata*, *Mimusops elengi L*, *Manilkara zapota L*, *Boerhavia diffusa*, *Azadirachta indica*, *Citrus Kunth*, *Vitis vinifera*, *Eucalyptus chapmaniana*, *Carica papaya*, *Eclipta prostrate*, etc. Dichas plantas contienen compuestos tales como: alcaloides, flavonoides, taninos, terpenoides, antioxidantes, etc. Capaces de reducir las NPs de Ag.

En ambos casos variables como el pH y la temperatura, tienen influencia sobre la síntesis. El pH puede afectar la estabilización de las NPs, ya que modifica las cargas eléctricas de las biomoléculas ocasionando un crecimiento de los sólidos formados. La temperatura tiene influencia sobre la forma de las NPs, cambiando de cuasiesferas a triángulos o platos.

CAPITULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la Figura 3.1 se muestra el diagrama de la metodología experimental que se empleó en la síntesis de nanopartículas de plata usando extracto de las plantas *Valeriana officinalis* y *Passiflora incarnata* en el cual se describen las condiciones experimentales bajo las cuales se realizó la síntesis.

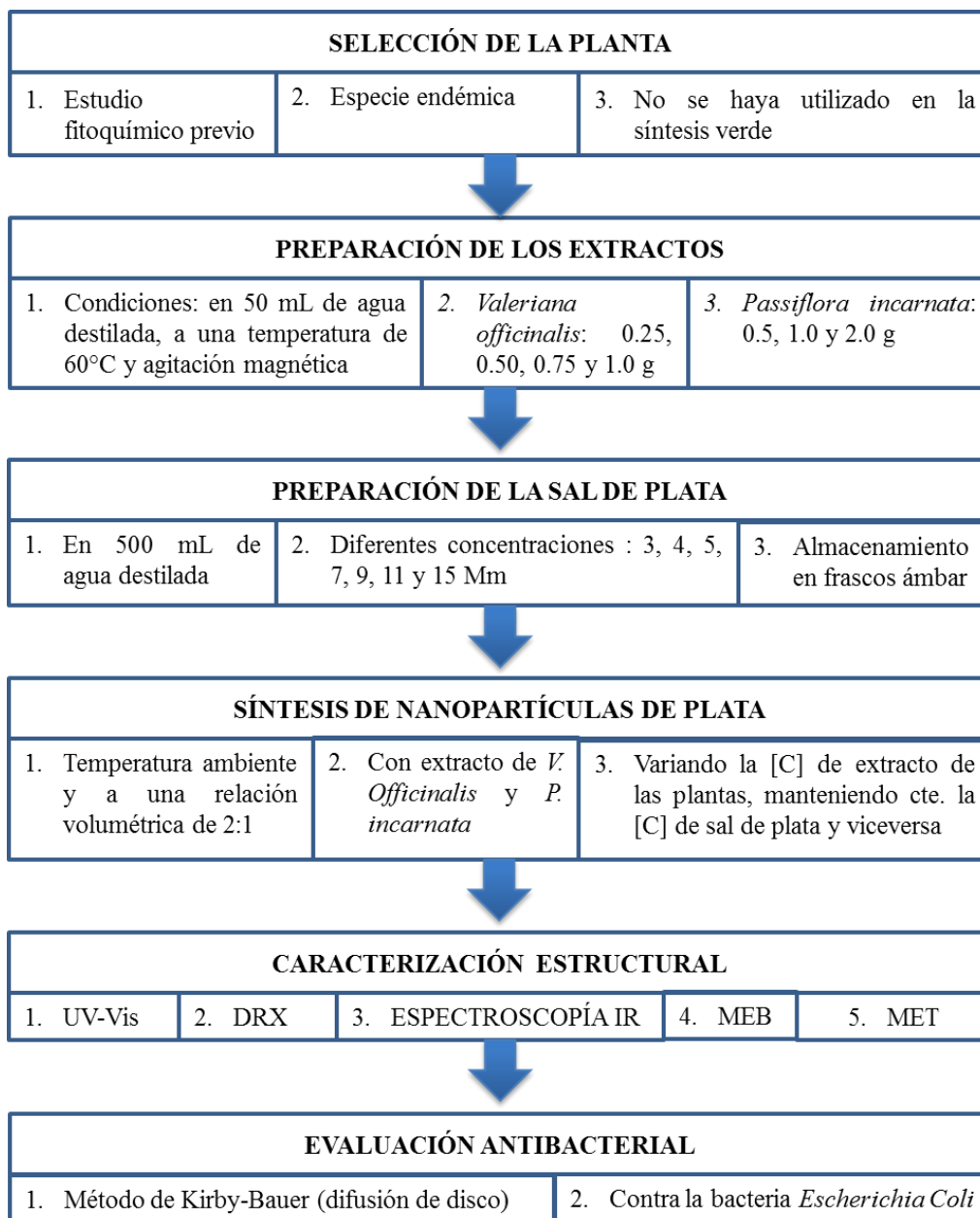


Figura 3. 1. Metodología experimental.

3.1 Selección de las plantas

La síntesis verde o biosíntesis requiere de un agente reductor de naturaleza biológica, ya que el principio de este método de síntesis es la reducción de sustancias tóxicas para optimizar sus aplicaciones potenciales en biomedicina. Debido a esto, el presente trabajo hace uso de extractos de plantas, las cuales se seleccionaron de acuerdo a los criterios que se enumeran a continuación:

- a. Estudio fitoquímico previo
- b. Que no se haya utilizado en síntesis verde en artículos publicados
- c. Origen mexicano

Una vez que se seleccionaron las plantas *V. officinalis* y *P. incarnata*, se adquirieron y se lavaron con agua destilada, se secaron y almacenaron. Posteriormente, se pulverizaron las hojas de Pasiflorina y la raíz de Valeriana con el propósito de obtener partículas finas para facilitar la lixiviación de las sustancias activas.

3.2 Elaboración de los extractos

Para la preparación de los extractos de *V. officinalis* y de *P. incarnata*, se utilizó la raíz de Valeriana y las hojas de Passiflora. Para Valeriana se tomaron 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 g de polvos de la raíz y para Passiflora se tomaron 0.5, 1.0 y 2.0 g de los polvos de las hojas, posteriormente, se añadieron por separado cada peso a un vaso de precipitados de 150 mL con 50 mL de agua destilada, en seguida cada vaso se colocó en una plancha con agitación magnética y se calentó a 60°C por 20 min, se dejó reposar hasta temperatura ambiente, se filtró en papel Whatman No. 1 y se almacenó a 4°C.

3.3 Preparación de la sal de plata (AgNO₃)

Para realizar la síntesis verde de nanopartículas de plata se prepararon soluciones de nitrato de plata en diferentes molaridades, como: 3, 5, 7, 9, 11 y 15 mM. Cada una de ellas se preparó en un frasco ámbar de 500 mL.

Para preparar una solución de AgNO₃ a 3 mM, se realizaron los siguientes cálculos:

Se partió de la fórmula de molaridad:

$$Molaridad = \frac{No.de\ moles}{litro\ de\ solución} = \frac{n}{L} \quad (3.1)$$

Donde,

$$n = \frac{masa}{peso\ molecular} \quad (3.2)$$

$$P.M_{AgNO_3} = 169.87\ g/mol$$

$$Volumen\ de\ la\ solución = 0.5\ L$$

$$M_{AgNO_3} = 3\ mM = 0.003\ M = 0.003\ \frac{moles}{L}$$

Se sustituyó n de la Ec. 3.2 en la Ec. 3.1, quedando de la siguiente manera:

$$M = \frac{masa}{PM \cdot L\ de\ soln.} \quad (3.3)$$

Posteriormente, se despejó la masa de la Ec. 3.3

$$m = M \cdot PM \cdot L \quad (3.4)$$

Finalmente se sustituyeron las cantidades conocidas en la ecuación anterior para obtener la masa de sal de plata necesaria para preparar una solución 3mM.

$$m = (0.003\ mol/L)(169.87\ g/mol)(0.50\ L) = 0.2548\ g$$

Bajo el mismo procedimiento se calcularon los pesos para las diferentes concentraciones de nitrato de plata requeridas. La Tabla III.1 muestra los pesos para cada concentración de solución de $AgNO_3$.

Tabla III. 1. Soluciones de nitrato de plata usadas en la síntesis.

[AgNO ₃], mM	3	5	7	9	11	15
Peso de AgNO ₃ , g	0.2548	0.4247	0.5945	0.7644	0.9343	1.274

3.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata

La síntesis verde de nanopartículas de plata se realizó variando la concentración de nitrato de plata, manteniendo constante la concentración del extracto acuoso de la planta, y viceversa, con la finalidad de observar el efecto que tienen sobre la síntesis la cantidad de agente reductor respecto al precursor y viceversa. Se realizaron experimentos con cada uno de los extractos que se preparó, en el caso de *V. officinalis* las concentraciones de extracto son: 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 g, cada una de las cuales se evaluó al reaccionar con solución de nitrato de plata (AgNO_3) en sus diferentes concentraciones (5, 7, 9, 11 y 15 mM), la relación volumétrica de extracto a sal de plata fue de 1:2, cabe destacar que los experimentos realizados con esta planta se realizaron a temperatura ambiente.

Las reacciones de bioreducción usando *Passiflora incarnata* se realizaron añadiendo 5 mL de cada uno de los extractos preparados en sus diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0) a 10 mL de las soluciones de AgNO_3 de cada concentración (3, 4, 5, 7 y 9 mM) por separado, también se evaluó la cinética de la reacción bajo diferentes radiaciones: luz solar, lámpara de ultravioleta, luz blanca y ultrasonido. La Tabla III.2 resume las condiciones bajo las cuales se realizó la bioreducción.

Tabla III. 2. Variables de las reacciones de síntesis de las NPs de Ag.

Planta seleccionada	Cantidad, g	[AgNO_3], mM	Condiciones de síntesis	Radiación usada
<i>Valeriana officinalis</i>	0.25, 0.5, 0.75 y 1.0	5, 7, 9, 11 y 15	Temperatura ambiente	Luz blanca
<i>Passiflora incarnata</i>	0.5, 1.0 y 2.0	3, 4, 5, 7 y 9	Temperatura ambiente	Luz blanca, luz solar, lámpara de UV y ultrasonido

3.5 Caracterización estructural de las NPs de Ag

3.5.1 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

A través de esta técnica se logró conocer en forma rápida los resultados después de la reacción de reducción de los iones Ag^+ y se confirmó la presencia de nanopartículas de plata en solución en un rango de 300-900 nm, también se evaluó la efectividad de los lavados. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis marca Ocean Optics USB 4000, el cual se encuentra ubicado en el Instituto de Investigaciones en Física, UMSNH. Se utilizaron celdas de cuarzo de 3 mL, en las cuales se agregó la solución diluida 1:10 que contiene las nanopartículas de plata.

3.5.2 Difracción de rayos-X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X se utilizó para confirmar la naturaleza cristalina (metálica) de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante el uso de los extractos de *V. officinalis* y *P. incarnata*; el análisis se llevó a cabo en un difractómetro marca BRUKER ADVANCE modelo D8, en un rango 2θ de 20 a 80 °. Las muestras se prepararon secando las soluciones que contienen las nanopartículas de plata, en una estufa a 40°C durante 12 horas, obteniendo polvos que posteriormente se colocaron en un portamuestras de vidrio, realizando finalmente el análisis de DRX.

3.5.3 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Con el fin de identificar los grupos funcionales presentes en el extracto, los posibles compuestos responsables de la bioreducción y las sustancias responsables del encapsulamiento de las nanopartículas de plata, se efectuó esta técnica por medio de un espectrómetro marca BRUKER tensor 27 (equipado con detector óptico de KBr), el equipo fue operado con una resolución de 4 cm^{-1} y un rango de barrido de 500-4000 cm^{-1} .

3.5.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Este tipo de caracterización se realizó usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo marca JEOL modelo JSM-7600F, para determinar el tamaño y forma de las partículas obtenidas bajo las diversas condiciones experimentales y para comparar con ello las características de los mismos con respecto a esas variables. Se colocó una gota de la solución que contiene las NPs de Ag sobre un cilindro de latón recubierto con una película delgada de pintura de carbón para evitar contaminación, y se dejó secar a temperatura ambiente. El equipo operó en un voltaje variable de 0-15 kV.

3.5.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

A través de esta técnica se llevó a cabo la exploración de los productos de la síntesis para conocer las características de las nanoestructuras, como: forma, composición, tamaño, etc. todo esto utilizando microscopía electrónica de transmisión, y el uso de sus técnicas como: campo claro, campo oscuro, patrón de difracción y alta resolución. Una gota de la muestra de nanopartículas de plata en solución se aplicó sobre una rejilla de cobre recubierta de carbón, y se dejó secar a temperatura ambiente. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca Phillips Tecnai F20 que opera a 200 kV.

3.6 Evaluación de la propiedad bactericida

Para la evaluación de la propiedad bactericida de las NPs de Ag se utilizó el método de Kirby – Bauer (difusión de disco) [42] que se describe a continuación:

Se prepararon 150 mL de medio de cultivo Mueller Hinton en agua, posteriormente se calentaron hasta disolver y hervir, las cajas petri se llevaron a esterilización por una hora en un autoclave a 121°C y 1.5 psi.

Se colocaron 15 mL de medio de cultivo anteriormente preparado, en 10 cajas previamente esterilizadas, se dejó enfriar y solidificar en una zona estéril. A continuación las cajas Petri se sellaron y se llevaron a la incubadora a una temperatura de 36°C.

Posteriormente se cultivaron las bacterias *Escherichia Coli* (proporcionadas por la facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) utilizando un asa bacteriológica, por medio de la técnica de estriado y luego se incubaron a las condiciones ya mencionadas durante 24 horas.

Posteriormente, fue seleccionada una colonia de las bacterias *E. coli* y nuevamente se cultivó en una caja Petri con agar, para obtener bacterias jóvenes y aisladas, se incubaron durante 24 horas.

Se realizó un césped por medio del hisopo estéril, después se colocaron los discos de papel filtro previamente esterilizado y en cada uno de ellos se adicionaron 6 μL de las NPs de Ag por triplicado, uno de agua, otro de AgNO_3 y por último uno de Antibiótico (cefatoxima 35.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), respectivamente. Luego se incubaron a 36°C por 24 horas.

Finalmente se analizaron los resultados obtenidos mediante la medición de los halos de inhibición.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados de la síntesis de nanopartículas de plata usando extractos de las plantas Valeriana y Passiflora, así como, el análisis y discusión de los mismos.

4.1 Caracterización estructural de las NPs de Ag

4.1.1 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía de UV-Vis es comúnmente empleada para confirmar la formación de nanopartículas metálicas mediante las propiedades ópticas, las cuales dependen particularmente del efecto del tamaño y presentan absorbancia en un rango de 400-550 nm. El primer indicativo de la formación de las nanopartículas de plata a partir de los extractos de las plantas es directo, a través de un cambio de color en la solución, al principio el nitrato de plata mezclado con el extracto de la planta es de color amarillo tenue, después de unos pocos minutos cambia a marrón, indicando la reducción de los iones de plata. En la literatura [43-44] se ha reportado que, cuando las NPs de plata se forman, a través de la reducción de los iones correspondientes mediante los extractos de las plantas, ocurre un cambio de color en la solución que va desde amarillo hasta rojizo, marrón, café oscuro, etc. Por lo tanto, el efecto de la cantidad de nitrato de plata y de extracto acuoso de las plantas en la formación de NP de Ag, se monitoreo a través de esta técnica.

Síntesis verde usando extracto de *Valeriana officinalis*.

En la Figura 4.1 se muestran los espectros de UV-Vis de las NPs de plata a diferentes concentraciones del extracto de *V. officinalis*: (a) 0.25, (b) 0.50, (c) 0.75 y (d) 1.0 g. En cada una de estas concentraciones de extracto se varió la cantidad la sal de plata en: 5, 7, 9, 11 y 15 mM. En la Figura 4.1 (a) se aprecia que a medida que se aumenta la concentración de la sal, se incrementa la intensidad del pico de la resonancia del plasmón superficial de Ag, indicando una mayor densidad de NPs formadas, también se observa que, en la misma medida ocurre un desplazamiento del máximo del pico hacia el rojo. Según la literatura, el último de estos comportamientos se debe a que el tamaño de las NPs se incrementa. Estos

resultados son consistentes con las teorías de formación de las NPs para cuando se utiliza un método convencional, en donde, a medida que la relación del agente reductor a la sal se incrementan el tamaño de las NPs disminuye, por otro lado, se aprecia que la cantidad de extracto es suficiente para reducir las NPs partiendo de una concentración molar alta (15 mM) dado el incremento del pico del plasmón, no obstante, la velocidad de crecimiento de las NPs se eleva ocasionando un mayor tamaño de las mismas.

También se observa de estas figuras que a mayor concentración del extracto (ver Figura 4.1 d) con el incremento en la molaridad de la sal, se aprecia una disminución en la intensidad del espectro, manteniéndose la posición del pico del plasmón en la misma longitud de onda, resultados que indican, que la cantidad de NPs disminuye. Este resultado contrario al observado en la Figura 4.1 (a) podría ser atribuido a que, a mayor concentración del extracto, más cantidad de compuestos orgánicos están presentes en el medio, por lo tanto, una mayor cantidad de núcleos se forman durante el proceso de reducción, conllevando a que la velocidad de crecimiento sea mayor y ocasionando el incremento del tamaño de las NPs más allá del rango nanométrico, en donde la técnica de UV-Vis no puede detectar.

Estos resultados van en contra de los mecanismos establecidos a través de la síntesis por reducción química convencional, cuya ventaja radica en el manejo independiente del agente reductor y del agente estabilizante. En el caso de la síntesis por reducción química empleando sustancias orgánicas (extractos de plantas) el proceso se realiza en un solo paso, ya que en el mismo momento de la bio-reducción se tiene la estabilización, lo que impide de cierta manera, el control de los pasos de nucleación y crecimiento de la reacción. Otra posible causa a la que se puede atribuir la reducción de la cantidad de NPs de Ag formadas con el incremento del agente reductor (extracto), se puede deber a que con el incremento del extracto se modifica la química que favorece la bio-reducción de las NPs, por ejemplo, la presencia de cloruros provenientes del extracto con el incremento del mismo podrían desviar la química formando cloruro de plata, lo que reduciría la intensidad del pico del plasmón. En este sentido los resultados obtenidos por DRX confirmarían estas aseveraciones.

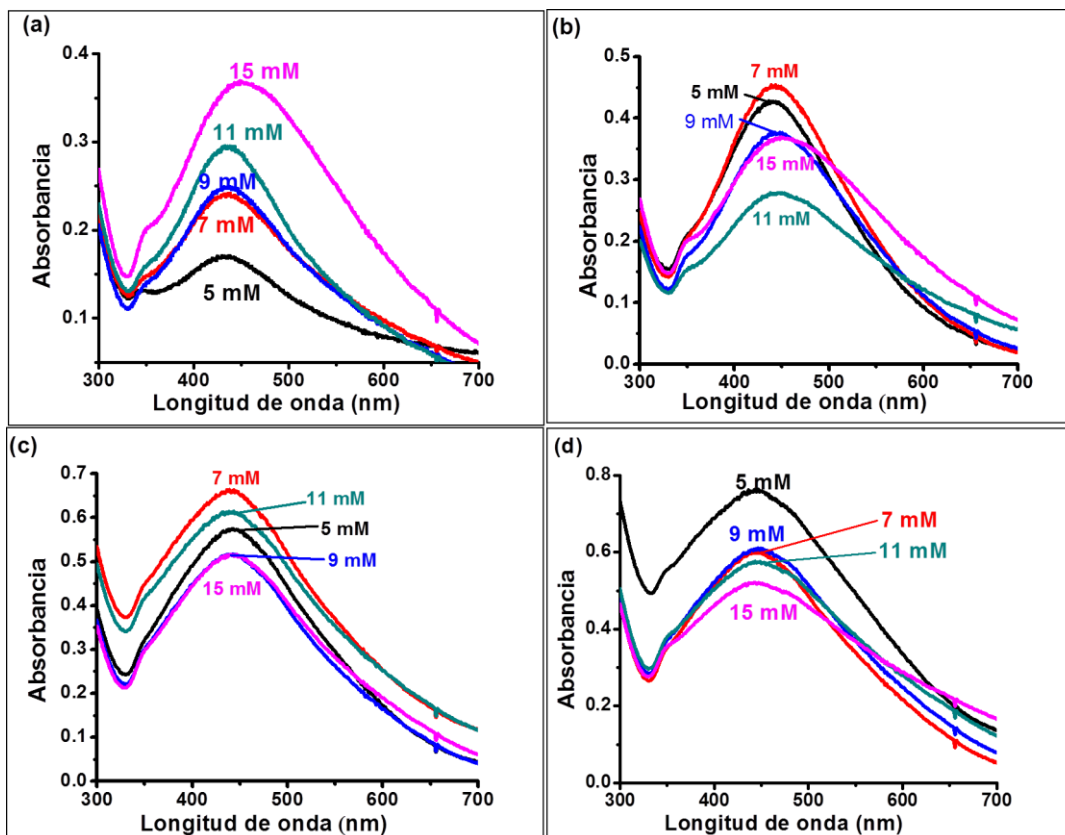


Figura 4. 1. Espectros de UV-Vis de las NPs de plata a diferentes concentraciones del extracto: (a) 0.25, (b) 0.50, (c) 0.75 y (d) 1.0 g. En cada una de estas concentraciones de extracto se varió la cantidad de sal de plata en: 5, 7, 9, 11 y 15 mM.

En la Figura 4.2 se muestran las gráficas de los espectros de UV-Vis de las reacciones de síntesis de NPs usando extracto acuoso de *V. officinalis*, en las cuales se mantuvo constante la concentración de la solución de nitrato de plata en: (a) 5 mM, (b) 7 mM, (c) 9 mM y (d) 15 mM, variando la concentración del extracto en cada una de éstas en: 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 g. En cada una se observó, de manera general, que a medida que se aumentó la concentración del extracto, se incrementó la absorbancia debido a la mayor resonancia del plasmón superficial (RPS) y por lo tanto, la densidad de las NPs se incrementó. Se encontró que la concentración de extracto óptima para la síntesis de las NPs en los incisos (a, c y d) fue de 1.0 g y para el inciso (b) fue de 0.75 g, en donde se aprecia que al aumentar la concentración del extracto de 0.75 a 1.0 g, la intensidad de la absorción óptica de las NPs tiene una ligera disminución. La teoría dice que la concentración del extracto de las plantas,

tiene un efecto sobre la síntesis en el tamaño, forma y distribución de las mismas, cuando se aumenta la concentración, mayores contenidos de las biomoléculas implicadas en el proceso de bioreducción del metal están presentes, lo cual resulta en un color más intenso en la solución (de color rojizo marrón a marrón intenso), de tal manera que se produce una mayor densidad de NPs y con una distribución de tamaño estrecha cuando más extracto de la planta es añadido en el medio de reacción [43].

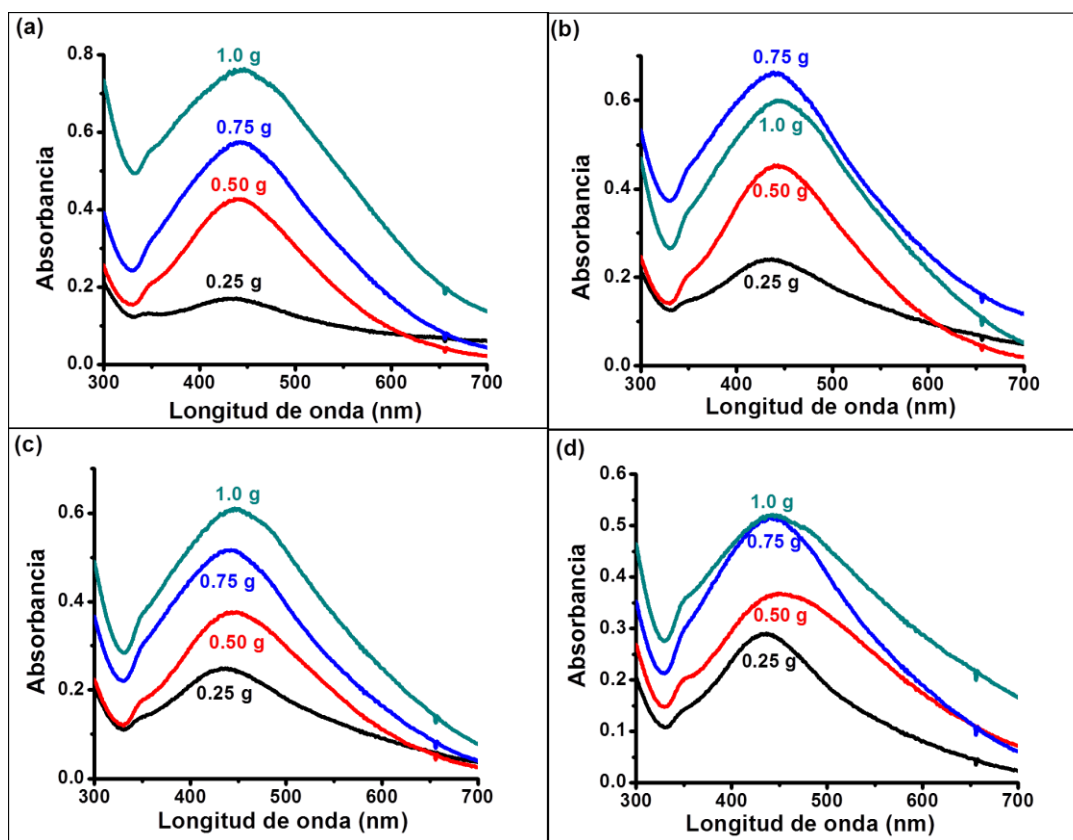


Figura 4. 2. Gráficas de los espectros de UV-Vis de las NPs sintetizadas usando solución de nitrato de plata en: (a) 5 mM, (b) 7 mM, (c) 9 mM y (d) 15 mM, variando la concentración del extracto en cada una de éstas en: 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 g.

Estos resultados indican que en todas las concentraciones de AgNO₃ con el incremento en el extracto, las NPs son de mayor tamaño, lo cual es consistente con la teoría de nucleación y crecimiento, en donde a medida que las condiciones de sobresaturación se incrementan

una mayor cantidad de núcleos se forma permitiendo contar con tamaños de partículas menores.

Los datos obtenidos en el actual trabajo, presentan un comportamiento similar al de Ashokkumar y col. [29] que estudiaron el efecto en el tamaño, al variar la concentración del extracto de la planta, distribución y rendimiento de las NPs de Ag, observaron que a medida que se aumenta la concentración del extracto, aumenta la formación de NPs de Ag. De igual forma, Bindhu y col. [45], observaron un aumento en la densidad de NPs, a medida que se incrementó la cantidad del extracto.

En el presente estudio, el rango de longitudes de onda en el cual se presentó un máximo en la resonancia del plasmón de NPs de Ag fue de 430-450 nm (Figura 4.2), Ajiyha y col. [46], observaron que la posición del pico de RPS varía en el rango 400-436 nm, como es el caso de las muestras sintetizadas biológicamente a partir de extracto de *Lantana cámara*, comúnmente conocida como camará, lantana y bandera española, en el cual los picos se presentaron en 436, 421, 413 y 400 nm; en el caso de la síntesis usando Haritaki (*Terminalia chebula*) [47], el espectro de absorción presentó un pico en 452 nm, lo que indicó la formación de NPs anisotrópicas. A través del uso de Orégano francés (*Plectranthus amboinicus*) [46] la biosíntesis exhibió una banda de absorción máxima a 428 nm. Como se ha señalado en la literatura la posición del pico del plasmón varía de acuerdo a las constantes dieléctricas del medio, en este caso representadas por las diferentes proporciones y tipos de sustancias lixiviadas durante la preparación del té.

En esta misma figura se observa que, a medida que las concentraciones de sal de plata aumentan, los picos del plasmón se desvían ligeramente hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo). Según la literatura [28], se ha mencionado que cuando los picos se desvían hacia el rojo el tamaño de las nanopartículas aumenta y viceversa.

Síntesis verde de NPs de plata usando extracto de *Passiflora incarnata*.

En las Figuras 4.3 (a)-(c), se muestran los espectros de UV-Vis de las reacciones de síntesis de las nanopartículas de plata usando *P. incarnata*, en las cuales se mantuvo constante la

concentración del extracto acuoso de la planta en (a) 0.50, (b) 1.0 y (c) 2.0 g variando en cada una la concentración de la sal de plata en: 3, 4, 5, 7 y 9 mM.

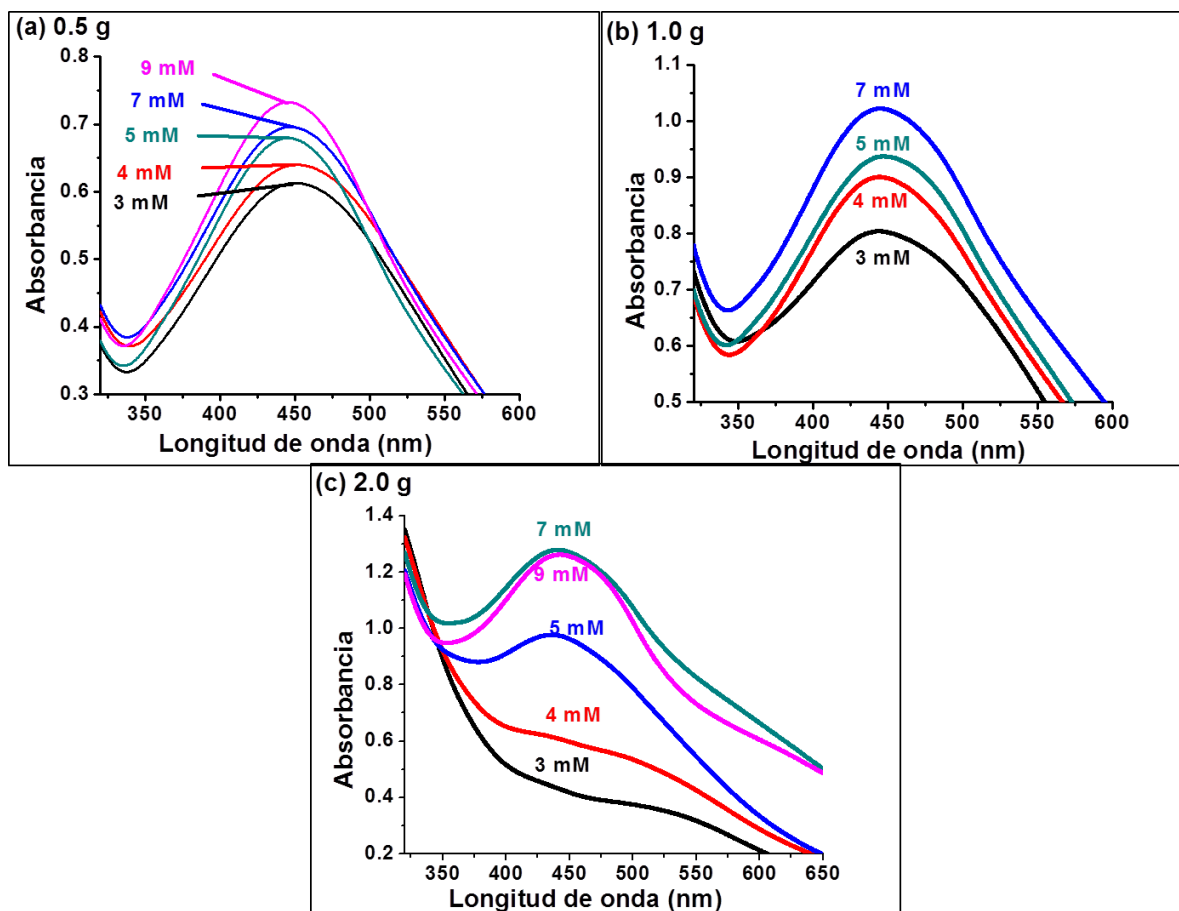


Figura 4. 3. Espectros de UV-Vis de las NPs de plata sintetizadas variando la concentración del extracto de *P. incarnata* en: (a) 0.5, (b) 1.0 y (c) 2.0 g. En cada una de éstas se varió la molaridad de la sal de plata en: 3, 4, 5, 7 y 9 mM.

De cada gráfica se puede aseverar de manera general que, a medida que se aumentó la concentración del extracto acuoso, se incrementó la absorbancia debido a la mayor resonancia del plasmón superficial de plata y, causando por lo tanto, el aumento en la cantidad de NPs formadas en solución. De igual manera, podemos notar un cambio en el ancho del pico, aumentando la distribución de tamaños cuando la cantidad de extracto es mayor. Por lo tanto, las variables más adecuadas para realizar la bioreducción de manera óptima que presenta un pico esbelto e intenso, bien formado y desviado hacia el azul como señal de pequeños tamaños de NPs fue la concentración de extracto de 0.5 g y una

concentración de sal de plata de 9 mM. En cambio se aprecia que para mayores concentraciones de extracto (1 y 2 g) aunque el comportamiento en cuanto a la intensidad del plasmón y por lo tanto presencia de las NPs de Ag fue mayor, el pico se ensancha con respecto a la muestra anterior, lo que indica que existe una mayor distribución de tamaños, además el pico se mantiene en longitudes de onda mayores lo que indica NPs formadas con mayor tamaño. Puede notarse que para la concentración de 1 g de extracto todas las gráficas de UV-Vis presentan una pequeña desviación a la derecha del pico principal lo que puede referirse a un segundo pequeño pico apenas perceptible y que, de acuerdo a la literatura, sugiere un cambio en la forma de las NPs sintetizadas lo que será estudiado posteriormente mediante MEB.

Con la finalidad de conocer el comportamiento de la reacción de bioreducción respecto al tiempo, se evaluaron los tiempos de reacción a una concentración de sal de 5 mM y 1.0 g del extracto, en un rango de 0 a 60 min con un intervalo de 5 min como se puede apreciar en la Figura 4.4.

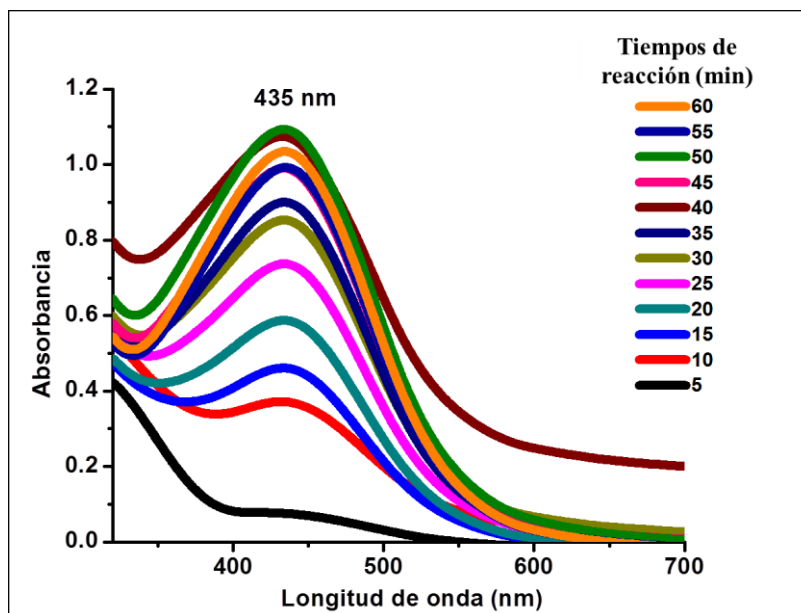


Figura 4. 4. Tiempos de reacción de NPs sintetizadas a una concentración de sal de 5 mM y 1.0 g del extracto, en un rango de 0 a 60 min con un intervalo de 5 min.

Como se podrá notar, después de 10 minutos de reacción se denota la presencia del pico del plasmón referente a las NPs de Ag, lo que indica una velocidad de bioreducción elevada. Estos resultados son mejores comparados con los que obtuvieron Ibrahim y col. [28] quienes determinaron el pico del plasmón de NPs de Ag en 45 min. También se puede mencionar que la velocidad de bioreducción de la planta *P. incarnata* fue mayor que *V. officinalis*.

En las Figuras 4.5 y 4.6 se presentan los resultados de la irradiación mediante luz ultravioleta y a diferentes tiempos sobre la concentración mM de la sal de Ag. Como se podrá notar, la luz ultravioleta impulsa la cinética de formación de las NPs.

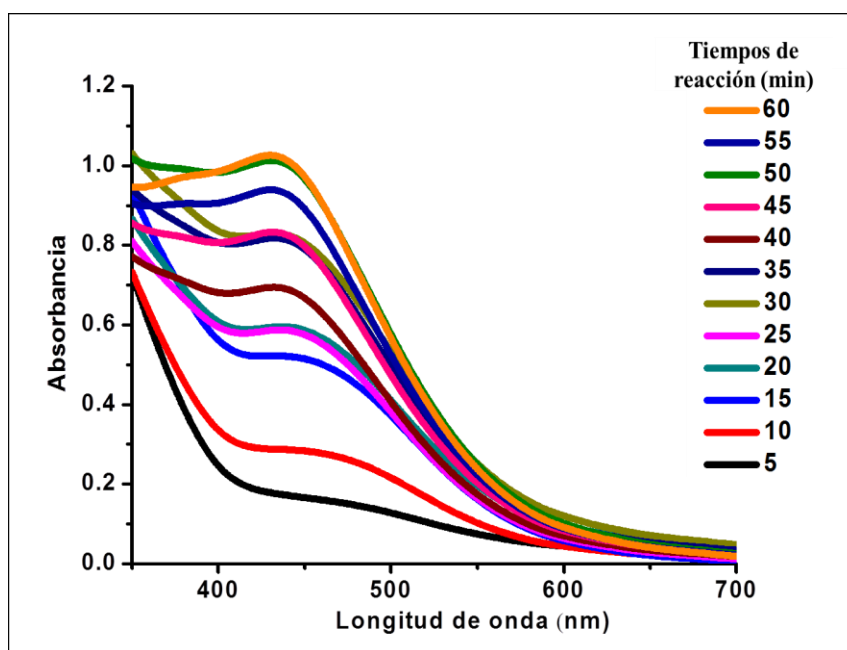


Figura 4. 5. Efecto de la concentración de la sal a 4 mM en los tiempos de reacción de NPs sintetizadas bajo irradiación ultravioleta, en un rango de 0 a 60 min en intervalos de 5 min.

Estos experimentos fueron realizados en una cámara oscura, únicamente irradiando mediante energía UV. A medida que la concentración de la sal se incrementó una mayor cantidad de NPs se forman, lo que es consistente cuando se utiliza luz blanca o de múltiple radiación. Por otro lado, las intensidades disminuyen con respecto a aquellas obtenidas

cuando se utiliza luz blanca y para los mismos tiempos, lo que razonablemente indica que bajo aquellas condiciones la energía suministrada al proceso es mayor, lo cual es benéfico para la cinética de la reacción.

Otra característica observada de esos espectros en la misma figura, está relacionada con la posición del pico del plasmón, el cual a medida que el tiempo de la irradiación fue mayor se desplazó hacia el azul, lo que indica una cantidad de NPs mayor y tamaños menores.

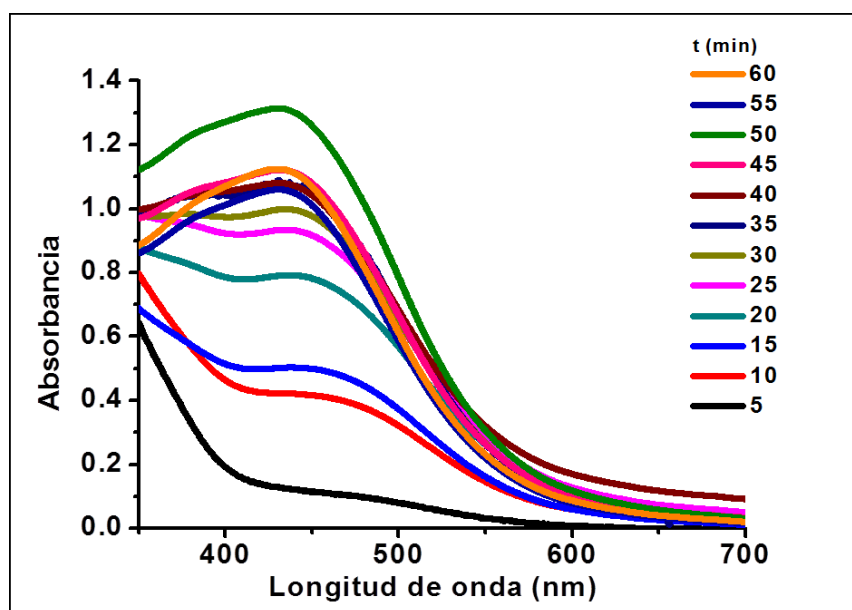


Figura 4. 6. Efecto de la concentración de la sal a 5 mM en los tiempos de reacción de NPs sintetizadas bajo irradiación ultravioleta, en un rango de 0 a 60 min en intervalos de 5 min.

Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran los experimentos realizados para una concentración de 5 mM de sal de plata y con respecto al tiempo de la biosíntesis de NPs empleando luz solar y ultrasonido, respectivamente. Cabe mencionar, que los experimentos bajo irradiación solar se realizaron directamente a las 12:00 horas del día, donde la temperatura de reacción alcanzó los 35 °C. En la primera de estas figuras se observa claramente que, a medida que el tiempo de la reacción fue incrementando, la intensidad del pico que representa la cantidad de NPs formadas también se incrementó, lo que indica evidentemente que el contacto directo de la luz solar con los extractos de las plantas responde biológicamente a

una función natural de acción bio-reductora. La velocidad de reducción es la mayor obtenida con respecto a todos los experimentos realizados en este trabajo en donde se puede notar que, para 5 minutos de exposición, el pico del plasmón de las NPs de Ag tiene la mayor intensidad y la mejor forma, indicando partículas bio reducidas rápidamente y de menor tamaño.

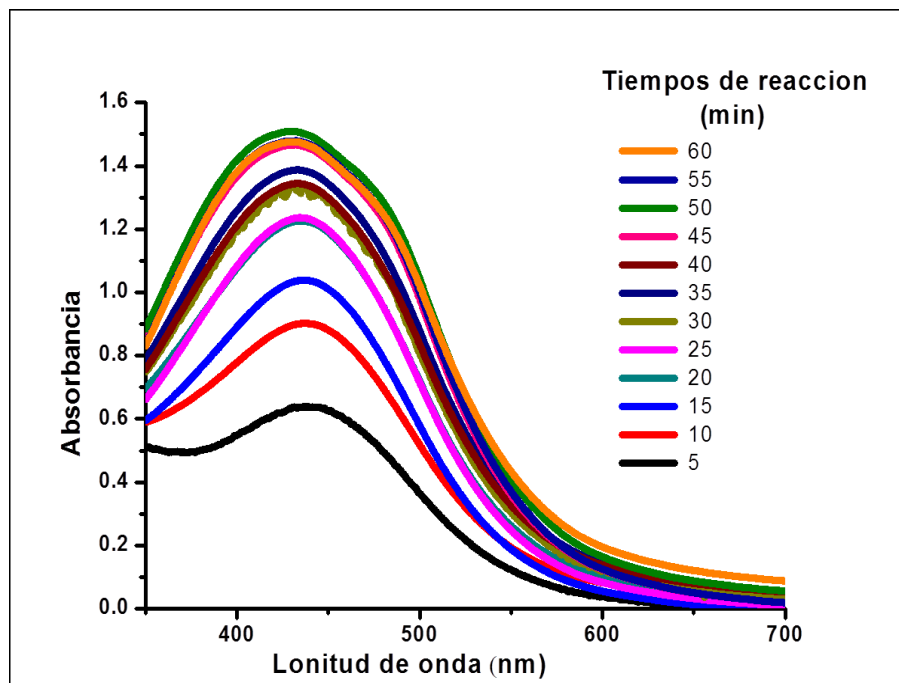


Figura 4. 7. Tiempos de reacción de nanopartículas de plata sintetizadas bajo irradiación solar y a una concentración de sal de plata de 5 mM, en un rango de 0 a 60 min con un intervalo de 5 min.

Por otro lado, en la Figura 4.8, se muestran los resultados obtenidos de la bioreducción de las NPs de Ag asistida por ultrasonido a diferentes tiempos de reacción. Como se podrá observar el ultrasonido genera una influencia negativa en el proceso de reacción. Estos resultados podrían explicar que la energía local generada por el ultrasonido, específicamente por la implosión de las gotas de la solución, distrae al extracto generando reacciones de descomposición del mismo, lo que implica una pérdida de los agentes reductores y estabilizadores.

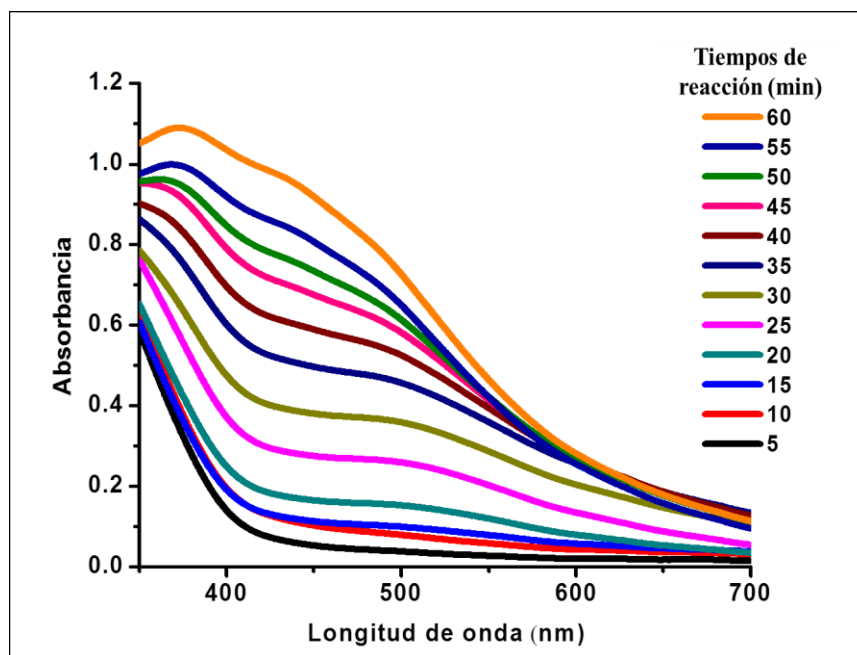


Figura 4. 8. Tiempos de reacción de NPs sintetizadas en condiciones de ultrasonido, en un rango de 0 a 60 min en intervalos de 5 min.

4.1.2 Difracción de rayos X

A través del análisis por difracción de rayos X (DRX) se confirmó la naturaleza cristalina de las nanopartículas de plata. En la Figura 4.9 se muestra el patrón de DRX de las nanopartículas sintetizadas con (a) *Valeriana officinalis* y (b) *Passiflora incarnata*, en cada uno de ellos se identificaron cuatro picos a valores 2θ de: 38.1° , 44.3° , 64.4° y 77.4° que se atribuyeron a los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cristalina FCC de la plata metálica, los datos fueron consistentes con la tarjeta de difracción JCPDS (por sus siglas en inglés: Joint Committee on Powder Diffraction Standards) [99-101-3078]. En el mismo difractograma de la Figura 4.8 se observan ocho picos de difracción a valores 2θ de: 27.68° , 32.13° , 46.02° , 54.9° , 57.23° , 67.15° , 74.11° y 76.38° , los cuales corresponden a los planos (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331) y (420) respectivamente, correspondientes a la estructura cristalina del cloruro de plata. Estos datos fueron consistentes con los obtenidos por Nezamdoost y col. [48] y con los resultados de Gopinath y col. [49].

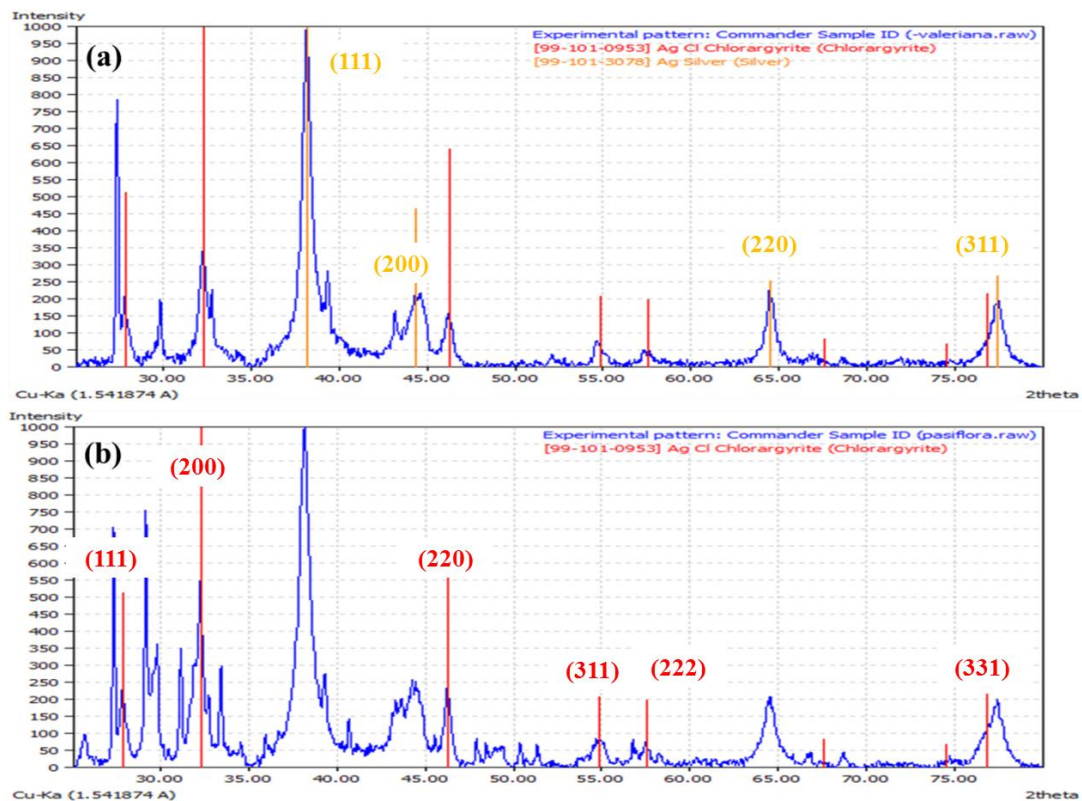


Figura 4. 9. Patrón de difracción de las nanopartículas de plata sintetizadas con: (a) *V. officinalis* y (b) *P. incarnata*.

Esto se debe a la presencia de halogenuros de alquilo en el extracto de la planta que al disolverse reaccionan con los iones de plata para formar esta sal, que se conoce ampliamente es insoluble en la solución, lo cual podría convertirse en la explicación del por qué las bandas del espectro de UV-Vis se amplían cuando son utilizadas grandes concentraciones de extracto, la mayor cantidad de cloruros en solución favorece termodinámicamente la formación de AgCl.

4.1.3 Espectroscopía de infrarrojo

El análisis realizado mediante espectroscopía de IR se llevó a cabo para identificar los principales grupos funcionales en las plantas y sus posibles implicaciones en la síntesis y estabilización de las nanopartículas de plata.

Valeriana officinalis

Los espectros IR de la planta antes y después de la reacción con nitrato de plata están representados en la Figura 4.10. El espectro de control (*V. officinalis* antes de la reacción con AgNO_3) mostró varias bandas que indican la naturaleza compleja del material biológico.

Las picos a las bandas correspondientes de: 3411, 2929, 1735, 1635, 1515, 1504, 1427, 1373, 1253, 1033, 771 y 600 cm^{-1} pertenecen al control (extracto), y los picos a: 3387, 2927, 1624, 1382, 1061, 820, 776 y 615 cm^{-1} corresponden a las NPs sintetizadas, esta serie de picos es observada en las Figuras 4.9 (a) y (b), respectivamente. Las bandas determinadas en: 3411, 1504 y 1033 cm^{-1} se deben a los modos de vibración del enlace O–H del grupo fenol. En la banda 2929 cm^{-1} se localizan los modos de vibración del grupo alquilo C–H (específicamente metileno).

Las bandas en 1735 y 1427 cm^{-1} se deben a estiramientos del enlace C=O de los derivados de los ácidos carboxílicos (ésteres y lactonas). Las vibraciones del enlace C=C conjugado de los grupos dienos y polienos, presenta una banda en 1635 cm^{-1} . La banda que se presenta a 771 cm^{-1} se debe a vibraciones del enlace C–H de los compuestos aromáticos, específicamente de benceno monosustituido. De igual manera, se observaron picos entre 600 y 400 cm^{-1} , los cuales pueden ser atribuidos a enlaces del tipo C–X de los fluoroalcanos (cloroalcanos, bromoalcanos, iodoalcanos, etc.). El espectro IR de las NPs de Ag inmersas en el extracto de la planta, presentó ligeros cambios en algunas de sus bandas, quedando de la siguiente manera: de 3411 a 3387, 2929 a 2927, 1635 a 1624, 1427 a 1382, 1033 a 1061, 771 a 776 y de 605 a 615 cm^{-1} , por lo cual se puede concluir que estos compuestos son los responsables del encapsulamiento de las NPs. Los compuestos orgánicos a los cuales se puede atribuir la reducción de los iones de plata son los siguientes: 1735 , 1515 , 1504 , 1253 y 1149 cm^{-1} , ya que desaparecen en el espectro de las NPs. Los resultados anteriores se resumen en la Tabla IV.1.

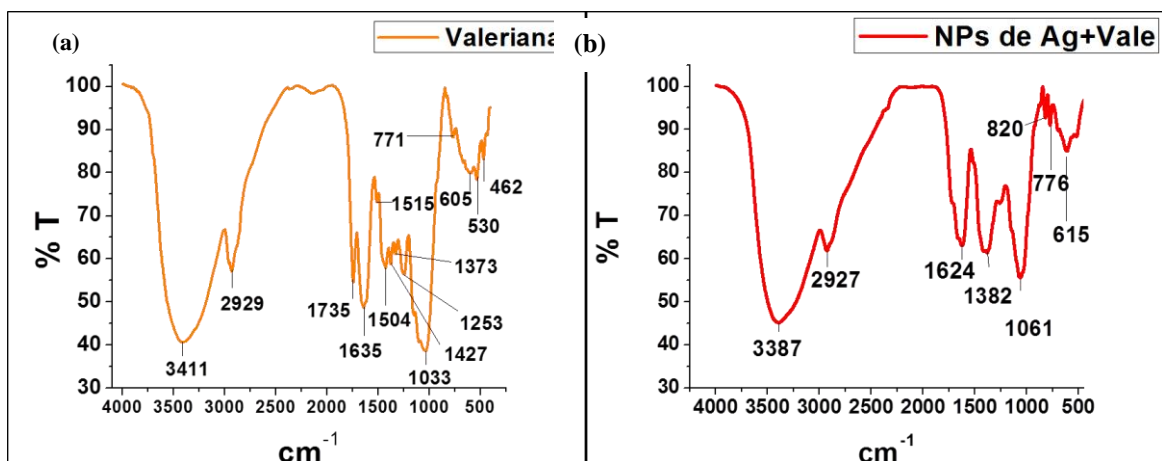


Figura 4. 10. Espectros IR de *Valeriana officinalis* (a) antes de la reacción y (b) después de la reacción con AgNO_3 .

Passiflora incarnata

En la Figura 4.11 se muestran los resultados obtenidos por espectroscopia de IR en donde se presentan varios picos en diferentes posiciones como: 3423, 2918, 2852, 1625, 1438, 1384, 1319, 1242, 1110, 781, 671 y 518 cm^{-1} , las cuales corresponden a la planta y los picos ubicados en 3411, 1625, 1373, 1122, 825, 671 y 595 cm^{-1} pertenecen a las NPs de Ag sintetizadas.

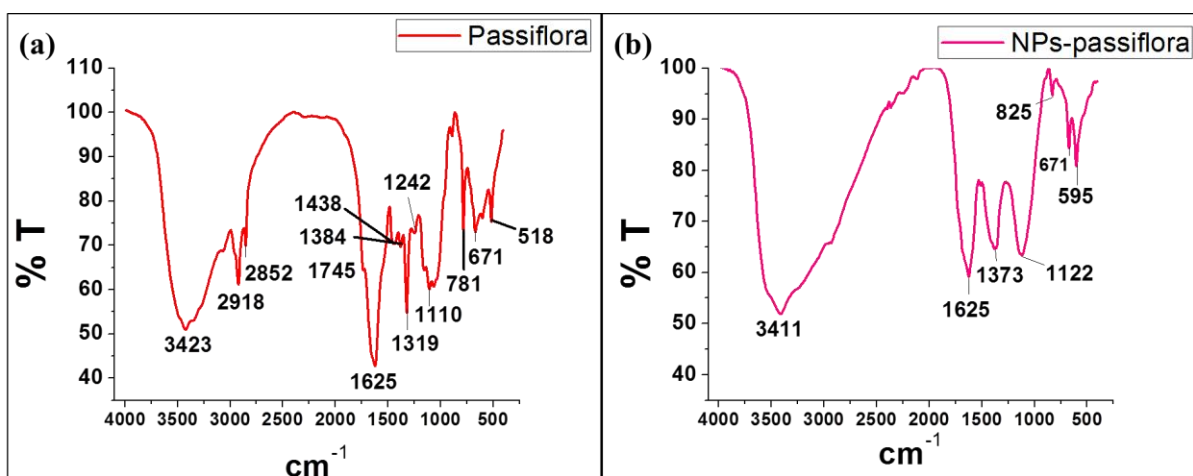


Figura 4. 11. Espectros IR de: (a) *Passiflora incarnata* y (b) NPs de Ag sintetizadas.

Tabla IV. 1. Grupos funcionales del extracto antes y después de reaccionar con AgNO₃.

(a) Grupos funcionales presentes en el extracto de <i>V. officinalis</i>				(b) Grupos funcionales en NPs de Ag con <i>V. officinalis</i>			
No. de onda (cm ⁻¹)	Enlace	Tipo de enlace	Enlace específico	No. de onda (cm ⁻¹)	Enlace	Tipo de enlace	Enlace específico
3411	O-H	ALCOHOLES, FENOLES		3387	O-H	ALCOHOLES, FENOLES	
2929	C-H	ALQUILO	Metileno	2927	C-H	ALQUILO	Metileno
1735	C=O	DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	Ésteres y lactonas	DESAPARECIO			
1635	C=C	C=C CONJUGADO	Dienos, polienos	1624	C=C	C=C CONJUGADO	Dienos, polienos
1515	N-O		Aromático	DESAPARECIO			
1504	O-H	ALCOHOLES, FENOLES		DESAPARECIO			
1427	C-H	ÁCIDOS CARBOXÍLICOS		1382	C-H	ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	
1253 y 1149	C-O	Ésteres		DESAPARECIO			
1033	C-O	ALCOHOLES	Primarios	1061	C-O	ALCOHOLES	Primarios
	C-N C=N	AMINAS ALIFÁTICAS			C-N C=N	AMINAS ALIFÁTICAS	
	C≡C				C≡C		
771	C-H	AROMÁTICO	benceno monosustituido benceno orto-di sustituido	880- 776	C-H	AROMÁTICO	benceno monosustituido benceno orto-di sustituido
605, 530 y 432	C-X	FLUOROALCANOS	Cloroalcanos, bromoalcanos y iodoalcanos	615	C-X	FLUOROALCANOS	Cloroalcanos, bromoalcanos y iodoalcanos

La banda de absorción en 3423 cm⁻¹ es característica del estiramiento del enlace O–H de los alcoholes, presentándose de forma amplia e intensa por polimerización. Bandas de absorción menos intensas ubicadas en 2918 y 2852 cm⁻¹ se deben a vibraciones del enlace C–H del grupo alquilo (metileno). De igual forma, las bandas en 1745, 1625, 1319 y 1110 cm⁻¹ son debidas a los modos de estiramiento del enlace C=O del grupo carbonilo como aldehídos, cetonas, ácidos y éteres, respectivamente. El pico en 1438 cm⁻¹ es característico de las vibraciones del enlace –C–H de los alcanos. En el pico 1348 cm⁻¹ se presentan las vibraciones de estiramiento del enlace C–N de las aminas aromáticas. Las bandas localizadas en 781, 671 y 518 cm⁻¹ son modos de vibración del enlace C–X de los fluoroalcanos (C–Cl). El espectro IR de las NPs de Ag, inmersas en el extracto de la planta se muestra en la Figura 4.10 (b), en donde se aprecian ligeros desplazamientos en algunas bandas, de acuerdo a lo siguiente: de 3411 a 3387, 2929 a 2927, 1635 a 1624, 1427 a 1382, 1033 a 1061, 771 a 776 y de 605 a 615 cm⁻¹, estos compuestos podrían ser los responsables de la estabilización de las NPs y los compuestos orgánicos a los cuales es posible atribuir la

reducción de los iones de plata que son los que se presentan en las bandas: 1735, 1515, 1504, 1253 y 1149 cm^{-1} , ya que desaparecen en el espectro con las NPs. La Tabla IV.2 muestra de manera resumida los resultados obtenidos del análisis mediante espectroscopía de IR.

Se ha reportado en la literatura que los compuestos orgánicos solubles en agua presentes en el extracto acuoso de la planta pueden ser los responsables de la estabilización eficiente de nanopartículas y de la reducción de iones metálicos Ag^+ .

Prakash y col. [14], en su investigación con *Mimusops elengi*, L., encontraron que la banda a 3415 cm^{-1} es responsable del estiramiento del enlace O-H. La banda en 2928 cm^{-1} es debida a la presencia del estiramiento del enlace alcohólico C-H y se trasladó a una frecuencia más baja (2925 cm^{-1}) en NPs de Ag, en comparación con el polvo de la hoja. La banda en 1618 cm^{-1} en polvo de la hoja de *Mimusops elengi*, L. fue debida a la presencia de vibraciones del enlace de una amida I y esta banda se desplaza a 1623 cm^{-1} en NPs debido a las proteínas que posiblemente se unirán a las NPs de Ag a través de los grupos amina.

Tabla IV. 2. Grupos funcionales del extracto antes y después de la reacción.

(a) Grupos funcionales presentes en el extracto de <i>P. incarnata</i>				(b) Grupos funcionales en el extracto de <i>P. incarnata</i> con NPs de Ag			
No. de onda (cm^{-1})	Enlace	Tipo de enlace	Enlace específico	No. de onda (cm^{-1})	Enlace	Tipo de enlace	Enlace específico
3423	O-H	ALCOHOLES, FENOLES		3411	O-H	ALCOHOLES, FENOLES	
2918 y 2852	C-H	ALQUILO	Metileno	DESAPARECE			
1745	C=O	DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	Ésteres	DESAPARECE			
1625	C=C	ALQUENOS CONJUGADOS	Dienos, polienos	1625	C=C	ALQUENOS CONJUGADOS	Dienos, polienos
1438	- C-H	ALCANOS		DESAPARECE			
1384	N-O	NITRO		1373	N-O	NITRO	
1319	C-O	GRUPO CARBONILO	Ácido	DESAPARECE			
1110	C-O	GRUPO CARBONILO	Éter	1122	C-O	GRUPO CARBONILO	Éter
781, 671 y 518	C-X	FLUORO ALCANOS	Cloruros y bromuros	825, 671 y 595	C-Cl	FLUORO ALCANOS	Cloruros y bromuros

La banda en 1041 cm^{-1} es responsable del estiramiento en los enlaces C-O-C, que podría atribuirse a la reducción de Ag^+ , porque la banda se desplaza a 1038 cm^{-1} en presencia de nanopartículas de plata.

Kathiravan y col. [50], en su trabajo de síntesis de NPs de Ag usando extracto de *Croton sparsiflorus morong*, encontraron que bandas anchas y fuertes en $(3400-3404)\text{ cm}^{-1}$ se debieron a grupos hidroxilo ($-\text{HO}$) o amina ($-\text{NH}$). Los picos observados en 2927 cm^{-1} se asignaron al grupo C-H. Los picos en $(1641-1637)\text{ cm}^{-1}$ se atribuyeron a la vibración de estiramiento del grupo carboxilo ($-\text{C}=\text{O}$). La transmitancia alrededor de 1381 cm^{-1} mostró que existía el ion NO_3^- en cantidad residual. La banda ubicada en 1076 cm^{-1} se asignó a la vibración del enlace C-O-C. tales resultados indicaron que los grupos carboxilo ($-\text{C}=\text{O}$), hidroxilo ($-\text{HO}$) y amina ($-\text{NH}$) están involucrados principalmente en la estabilización de las NPs de Ag. Estos cambios estructurales indicaron que la reducción y estabilización de nanopartículas de plata proceden a través de la coordinación entre el N del grupo amida y los iones de plata. Además, las proteínas podrían posiblemente formar una capa que cubre las nanopartículas del metal (encapsulando las NPs de Ag) para evitar la aglomeración y con ello estabilizan el medio.

4.1.4 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Valeriana officinalis

Las NPs de Ag se observaron con la finalidad de conocer el tamaño, distribución y la morfología de las NPs de Ag, bajo la técnica de emisión de campo por microscopía electrónica de barrido (EC-MEB) a una amplificación de $100000\times$, como se muestra en las Figuras 4.12 – 4.14. En la Figura 4.12 se muestran las micrografías de MEB de NPs sintetizadas con AgNO_3 a 5 mM y con extracto de *V. officinalis* en diferente concentración de 0.5 y 1.0 g .

De forma general los resultados indican una distribución uniforme, lo cual demuestra la estabilización de las nanopartículas por los agentes de encapsulamiento provenientes de los

compuestos orgánicos presentes en el extracto. También se aprecia en la Figura 4.12 (a) que a menor concentración del extracto, la cantidad de NPs es menor y esto es consistente con los resultados mostrados en el análisis mediante espectroscopía de UV-Vis donde, a medida que se aumenta la concentración del extracto, la cantidad de NPs en solución es mayor. La morfología de las NPs es cuasiesférica y el tamaño disminuye a medida que se aumenta la concentración del extracto.

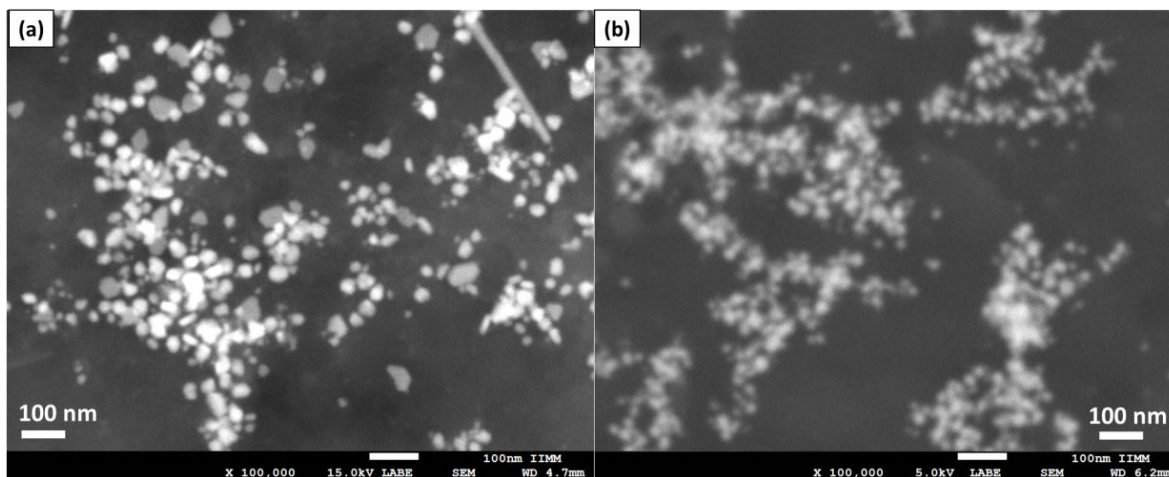


Figura 4. 12. Imágenes de MEB de NPs de plata sintetizadas con AgNO_3 a 5 mM y con extracto de *V. officinalis* en una concentración de: (a) 0.5 g y (b) 1.0 g.

En la Figura 4.13 se presentan las imágenes de MEB de las NPs de plata sintetizadas con AgNO_3 a 7 mM y con extracto de *V. officinalis* en concentraciones diferentes de 0.5 g y 1.0 g. Las micrografías confirman la tendencia que se observó en los resultados de los análisis de UV-Vis, reafirmando que a medida que se aumenta la concentración del extracto, la densidad de las NPs formadas es mayor, como se aprecia claramente en la Figura 4.13 (b). Además, el tamaño de las mismas disminuye muy por debajo de los 20 nm. En ambos casos la distribución es uniforme, lo que indica que la cantidad de compuestos orgánicos en el extracto cumple con la función de estabilizador, encapsulando las NPs.

En la literatura se han reportado trabajos [50-51] en los cuales la cantidad de extracto no contiene las moléculas encargadas de encapsular a las NPs o no son suficientes para estabilizar la solución, ocasionando que las NPs se aglomeren y formen cúmulos por la

agregación de pequeñas partículas, como se observa en ciertas zonas de la micrografía en las Figuras 4.13 (a) y (b).

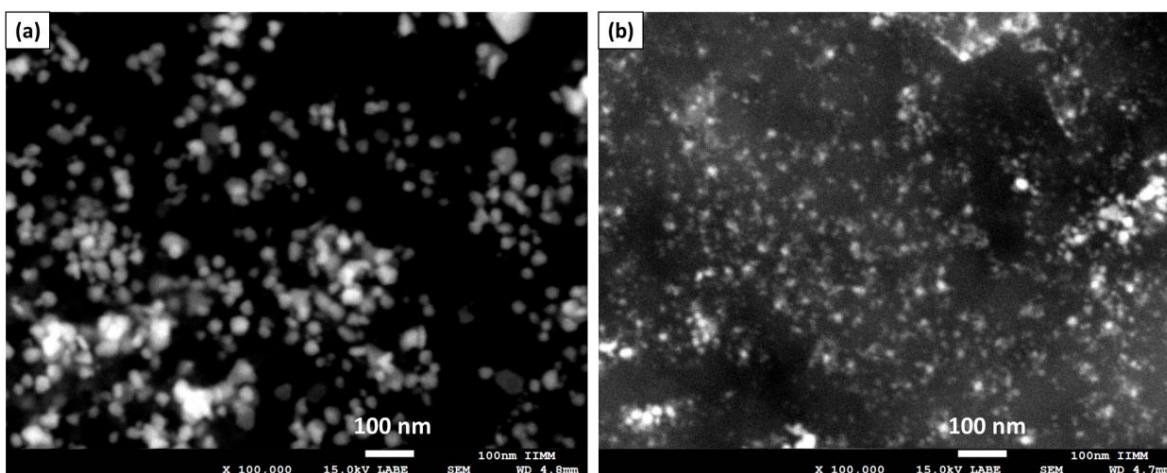


Figura 4. 13. Imágenes de MEB de NPs de plata sintetizadas con AgNO_3 a 7 mM y con extracto de *V. officinalis* en una concentración de: (a) 0.5 g y (b) 1.0 g.

Las imágenes de las NPs de plata sintetizadas con extracto de *V. officinalis* en una concentración de 0.5 g y AgNO_3 en diferente concentración como 5 y 7 mM, se observan en la Figura 4.14. En las micrografías se aprecia que a mayor concentración de sal de plata (7 mM) las NPs presentan una distribución uniforme, además el tamaño de las mismas es ligeramente más pequeño, por debajo de los 30 nm.

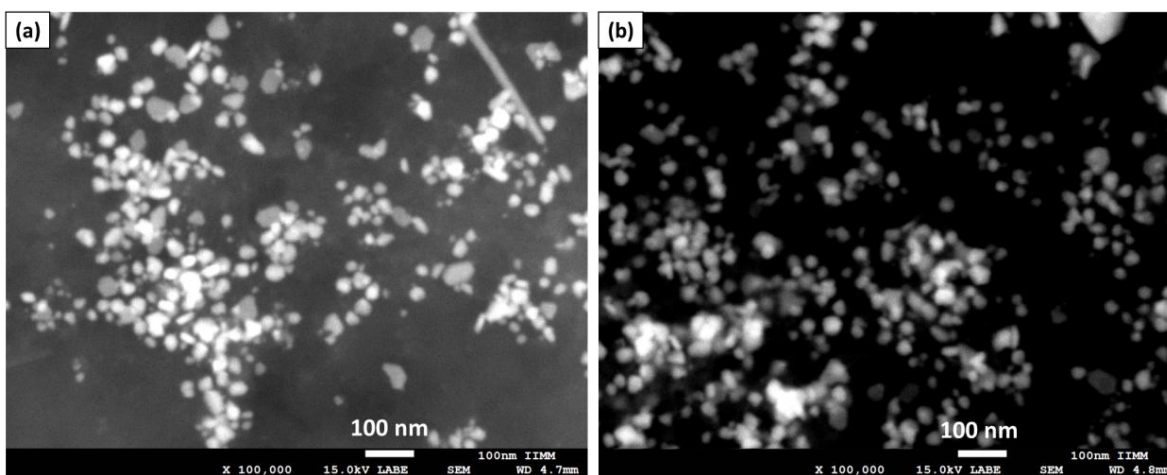


Figura 4. 14. Imágenes de MEB de NPs de plata sintetizadas con extracto de *V. officinalis* en una concentración de 0.5 g y AgNO_3 a una concentración de: (a) 5 mM y (b) 7 mM.

En la Figura 4.15 se muestra la información de la composición elemental de las NPs de Ag, obtenida del perfil EDS realizado en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, se muestran señales fuertes correspondientes a átomos de Ag (~3 keV) y de átomos de C, la primera confirmando la naturaleza metálica de las NPs y la segunda señal es causada por el recubrimiento de pintura de carbón que se le hace a la muestra en la preparación. Se observa además una señal en los átomos de Cl, la cual es debida al contenido del mismo en los compuestos orgánicos del extracto de la planta. Picos en Zn y Cu, son ocasionados por el latón del cilindro donde se monta la muestra. Generalmente, nanocristales de plata metálica muestran un pico típico aproximadamente a 2.983 keV [12].

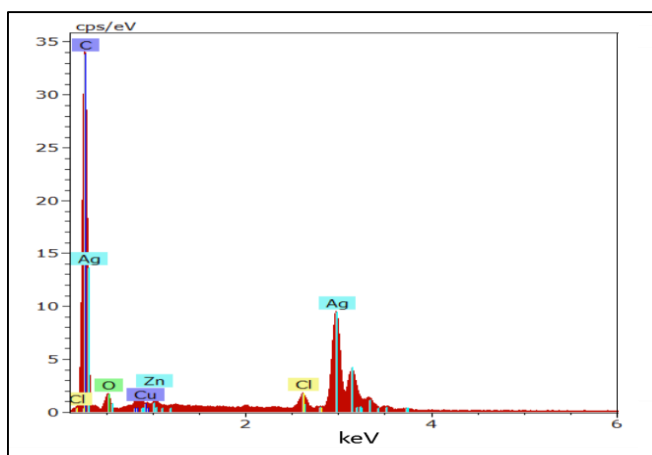


Figura 4. 15. Composición química realizada mediante EDS de las nanopartículas de plata sintetizadas con *V. officinalis*

Passiflora incarnata

De los resultados de UV-Vis fue notado que las variables más adecuadas para realizar la bioreducción de manera óptima mediante la bioreducción con extracto de *Passiflora incarnata* fue una concentración de extracto de 0.5 g y una concentración de sal de plata de 9 mM. Por tanto, la Figura 4.16 muestra las micrografías de MEB de las NPs sintetizadas con AgNO₃ y extracto de *Passiflora incarnata* a esas condiciones. Como se logra notar en general, las NPs presentan un tamaño relativamente homogéneo de 20 nm, aunque se

observan algunos aglomerados de NPs, posiblemente debidos a la falta de dispersión en la muestra. Se debe recordar que durante la experimentación de los resultados aquí obtenidos no hay agitación lo que puede influir en la segregación de las sustancias aglomerantes y como consecuencia de agregados de NPs.

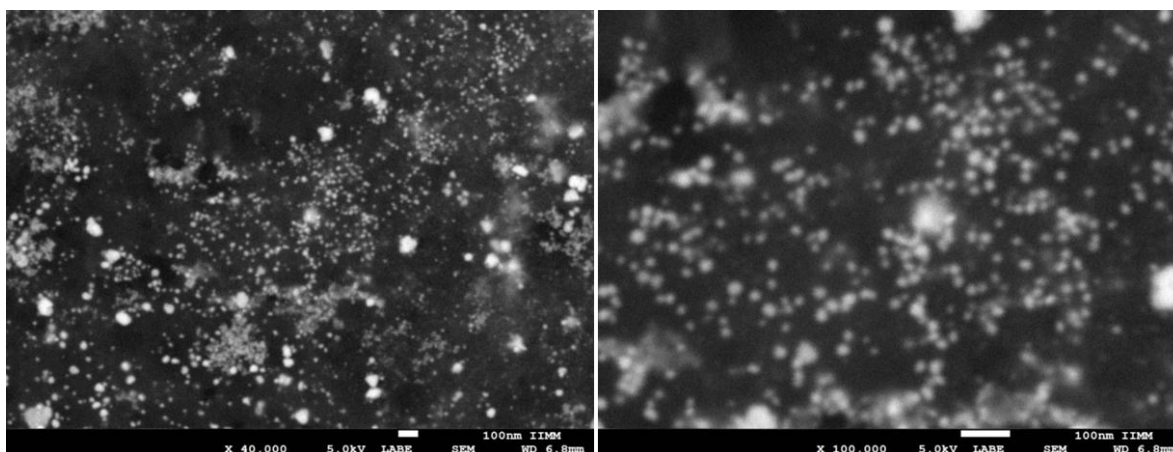


Figura 4. 16. Imágenes de MEB a diferentes ampliaciones de las NPs de plata sintetizadas con extracto de *Passiflora incarnata* en una concentración de 0.5 g y concentración 9 mM de AgNO_3 .

En cambio se apreció por la técnica de UV-Vis que a mayores concentraciones de extracto mayores tamaños de NPs de Ag se obtienen, de este modo, la Figura 4.17, muestra las imágenes de MEB de las NPs obtenidas mediante una concentración de extracto de 1 g y concentración de AgNO_3 de 7 mM, en donde se aprecia que efectivamente los tamaños de las nanopartículas fueron distintos y la forma de las mismas también cambian de semicircular a triangular y hexagonal, esto explica el porqué de la presencia del segundo pico en la gráfica de UV-Vis (Figura 4. 3 (b).)

Se debe recordar que también fue identificada, mediante la técnica de difracción de rayos X, la presencia de otro sólido siendo este el cloruro de plata (AgCl), que como se mencionó es debido a la existencia de compuestos de halogenuros de alquilo en la muestra. Este compuesto se forma de acuerdo a lo siguiente; se sabe ampliamente que el cloro en solución puede reaccionar con la Ag para formar AgCl , cuya solubilidad en agua es extremadamente baja, así, en la medida que hay más sal de plata mayor cantidad de este compuesto se forma.

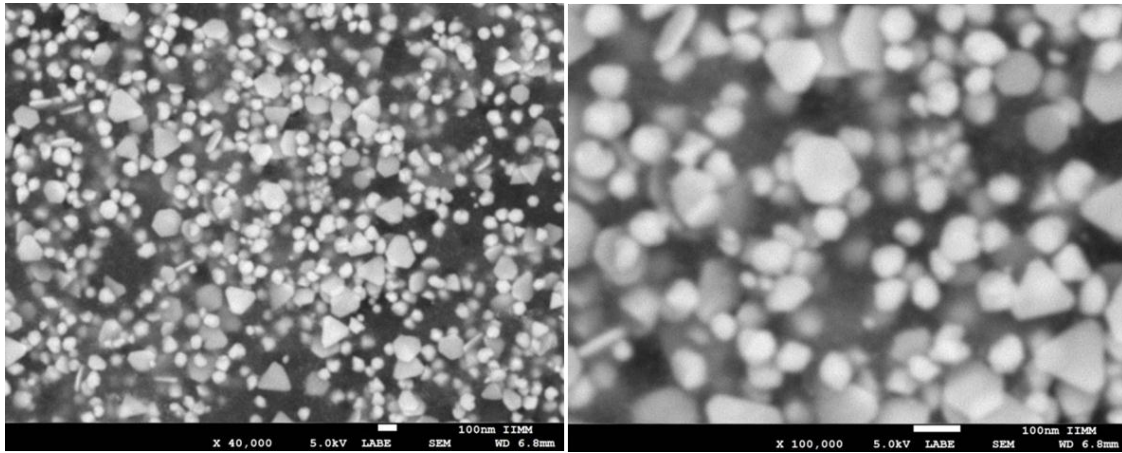


Figura 4. 17. Imágenes de MEB a diferentes ampliaciones de las NPs de plata sintetizadas con extracto de *Passiflora incarnata* en una concentración de 1 g y concentración 7 mM de AgNO_3 .

La Figura 4.18, muestra la morfología del sólido en donde una especie de crecimiento en forma de dendritas se aprecia, morfología que permite distinguir claramente a ambos sólidos presentes en la muestra. Aunque la cinética y la cantidad de nanopartículas reducida es buena a través de esta planta, desafortunadamente implantar este proceso de forma industrial no sería inmediata hasta tratar de eliminar o minimizar la presencia del elemento Cl en solución.

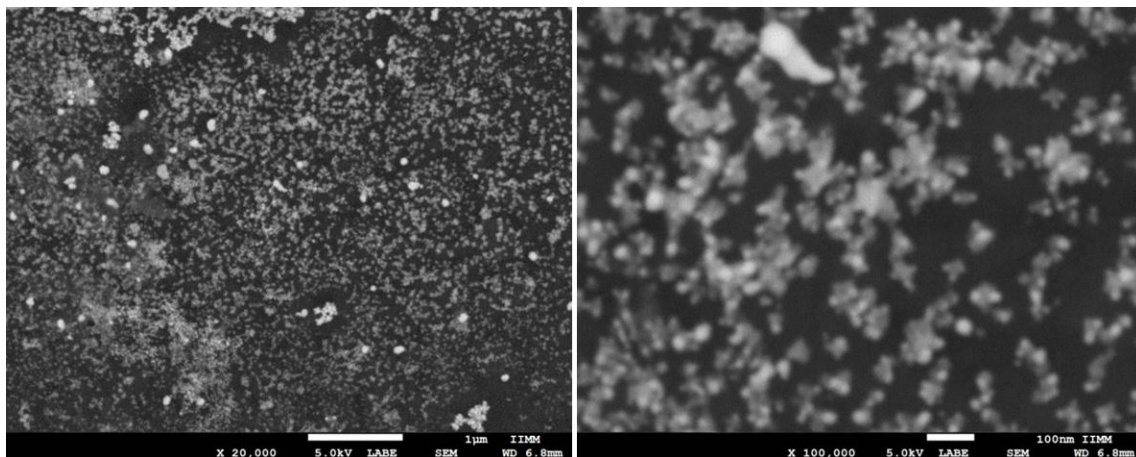


Figura 4. 18. Imágenes de MEB a diferentes ampliaciones del sólido AgCl presente en las NPs sintetizadas con extracto de *Passiflora incarnata* en una concentración de 1 g y concentración 7 mM de AgNO_3 .

4.1.5 Microscopía electrónica de transmisión

Valeriana officinalis y *Passiflora incarnata*

El tamaño y la morfología de las nanopartículas sintetizadas se determinó mediante imágenes de MET. En la Figura 4.19 se observa a través de las micrografías de TEM las NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO_3 a 5 mM y 1.0 g de extracto de la planta. Se puede apreciar que la forma de las NPs sintetizadas es esférica. El rango de tamaños de las nanopartículas se encuentra entre 60 nm con un tamaño promedio de 22 nm. Se confirma nuevamente la efectividad del agente estabilizante, ya que las NPs presentan una distribución uniforme.

En la Figura 4.20 se muestran micrografías de TEM de las NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO_3 a 3 mM y 1.0 g de extracto de la planta. Se puede apreciar que la forma general de las NPs es esférica. El rango de tamaños de las nanopartículas se encuentra entre 10-60 nm con un tamaño promedio de 22 nm, el cual se muestra en el histograma de la Figura 4.21. Se confirma que con el incremento en la cantidad de sal empleada el tamaño de las NPs es menor, lo cual queda en buen acuerdo con los resultados obtenidos mediante espectroscopía de UV-Vis.

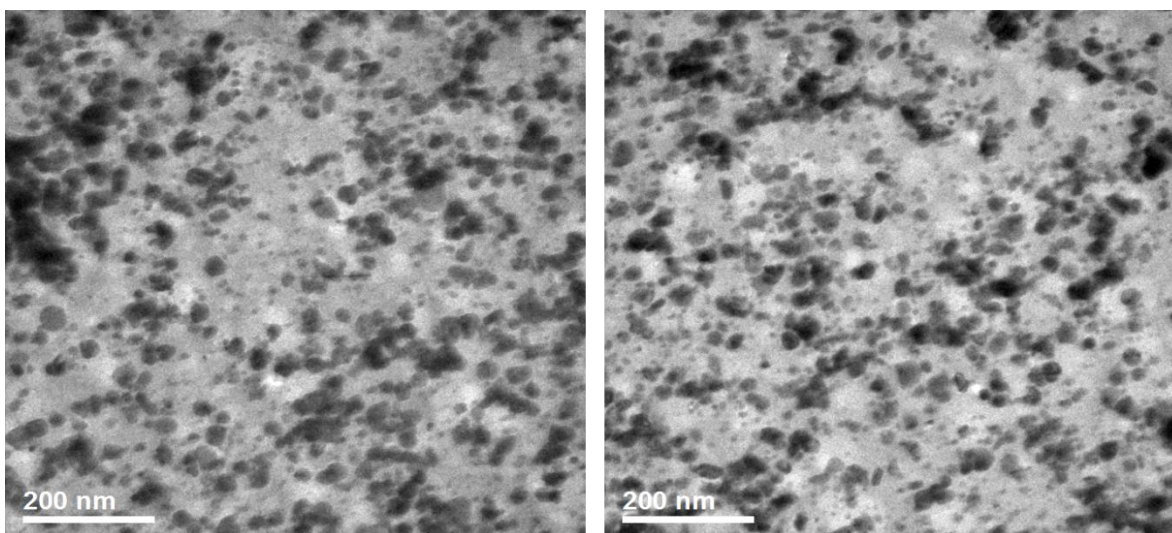


Figura 4. 19. Micrografía de TEM de campo claro de NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO_3 a 5 mM y 1.0 g de extracto de la planta.

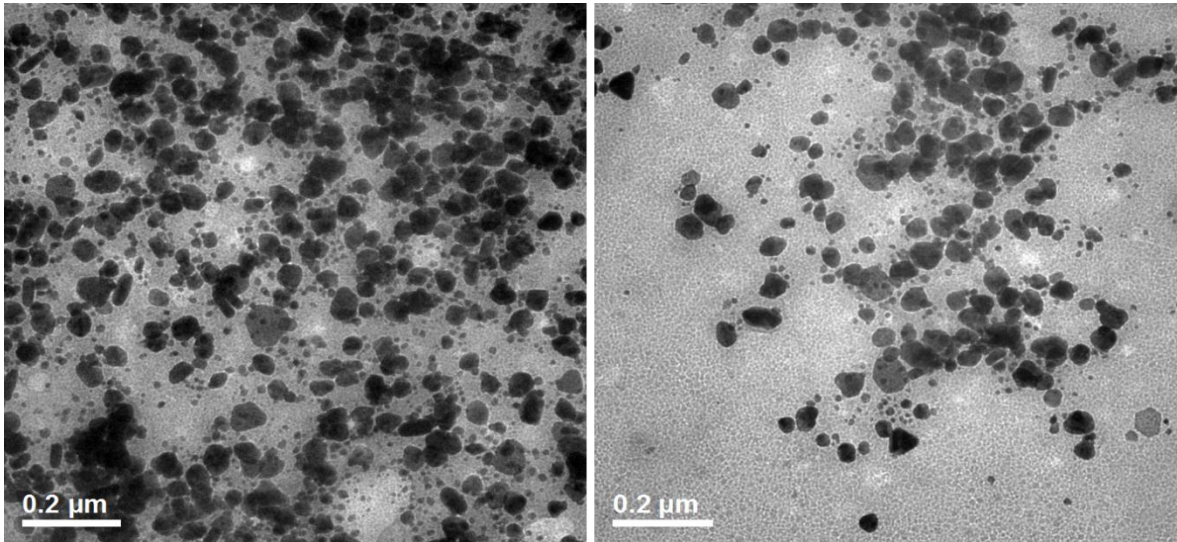


Figura 4. 20. Micrografía de TEM de campo claro de NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO_3 a 3 mM y 1.0 g de extracto de la planta.

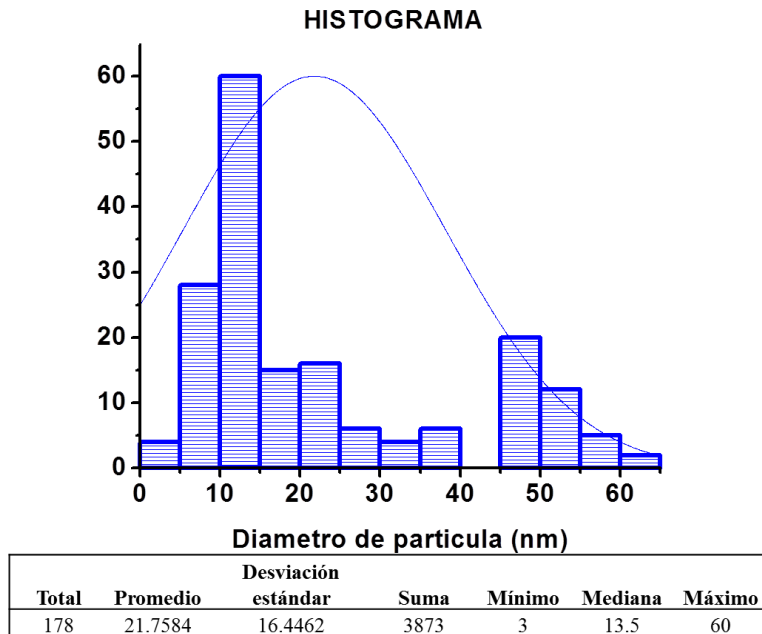


Figura 4. 21. Histograma del tamaño de las NPs de Ag.

La Figura 4.22, muestra una imagen de microscopia electrónica de transmisión de alta resolución de una nanopartícula de plata individual, en la cual se puede apreciar que el tamaño es aproximadamente de 20 nm, además, en el recuadro se observa un patrón de

difracción con una serie de puntos brillantes alrededor, lo que indica la naturaleza cristalina de la nanopartícula, comprobando de esta manera que efectivamente son de plata.

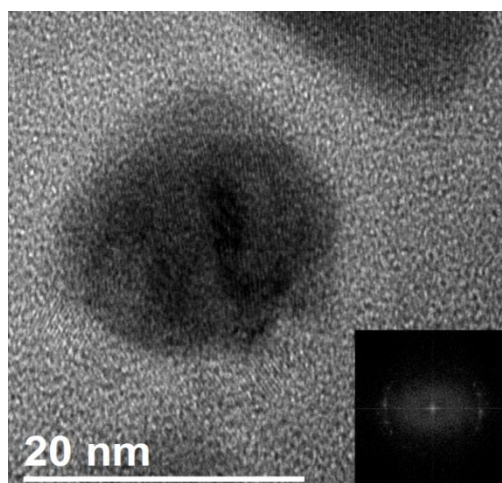


Figura 4. 22. Imagen de MET de alta resolución de una nanopartícula de plata. El recuadro es el patrón de difracción de la nanopartícula.

4.2 Evaluación de la propiedad bactericida contra *Escherichia coli*

De acuerdo con los resultados de caracterización estructural, las técnicas mostraron que las NPs de Ag sintetizadas con una solución de AgNO_3 (5 mM) y 1.0 g de extracto de la planta *Valeriana officinalis*, presentan buenas características en cuanto a: la cantidad formada, morfología y tamaño de las nanopartículas, por lo tanto, se seleccionó esta muestra para realizar el estudio antibacteriano de las NPs. La Figura 4.23 ilustra el efecto antibacteriano de las nanopartículas de Ag examinadas frente a la bacteria *E. Coli* gram-negativa.

A partir de la imagen se observan halos de inhibición en tres zonas distintas, además, se presenta el círculo correspondiente a la referencia que en este caso es el extracto de la planta *Valeriana officinalis*. Como se observa no hay inhibición en el círculo depositado del extracto de la planta. Sin embargo, se observa que con el incremento ligero en la cantidad de NPs de plata empleadas, se aprecia un ligero incremento en el halo de inhibición.

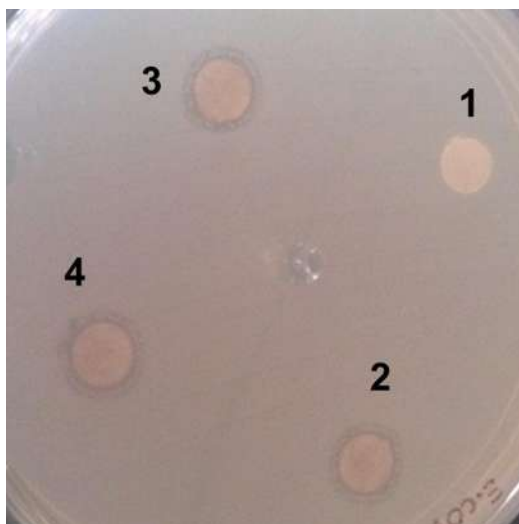


Figura 4. 23. Prueba antibacteriana de las NPs de Ag contra la bacteria *E. coli*.

La Tabla IV.3 muestra los resultados de las mediciones efectuadas a cada círculo, como se aprecia a medida que se incrementó la cantidad de la planta, un aumento ligero en la zona de inhibición de 9.25 a 10 mm se obtuvo. De esta manera, queda demostrada la eficacia antibacteriana de los NPs de Ag fabricadas con la planta *Valeriana officinalis*. Estos resultados están en buen acuerdo con los obtenidos previamente en la plata coloidal.

Tabla IV. 3. Resultados de las pruebas antibacteriales utilizando el método de difusión de disco.

# Disco	1	2	3
Cantidad de extracto utilizado (ml)	5	6	7
Distancia de inhibición mm.	9.25	9.75	10

Che y col. [52] realizaron un estudio que se basa en el análisis proteómico del modo de acción de nanopartículas de plata de 9.3 nm. Este estudio concluyó que las nanopartículas desestabilizan la membrana externa de las bacterias *E. coli*, colapsan el potencial de la

membrana plasmática y merman el nivel de ATP intracelular de un modo similar al de los iones de plata. También se observó que, mientras que los iones de plata procedentes de la sal AgNO_3 producen un efecto bactericida empleando concentraciones a nivel micromolar, las nanopartículas de plata mostraron un comportamiento bactericida a concentraciones a nivel nanomolar. De igual manera, se demostró que las NPs de Ag con una superficie parcialmente oxidada podrían ser transportadoras de iones de plata quimisorbidos en cantidades suficientes como para producir un efecto bactericida.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de las diferentes técnicas de caracterización (UV-Vis, DRX, IR, MEB y MET), los extractos de las plantas *Valeriana officinalis* y *Passiflora incarnata* cumplen efectivamente con la función de agente reductor y estabilizador para la síntesis de NPs de Ag.

A través de los espectros de UV-Vis se observó claramente la formación de las NPs de Ag, confirmada por la aparición de un pico de absorción en 430-450 nm, el cual es característico de las NPs de Ag.

Los resultados obtenidos a través de difracción de rayos X, corroboran la naturaleza cristalina de las muestras analizadas por medio de UV-Vis, los difractogramas presentan reflexiones correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cristalina FCC de la plata metálica.

En el caso de extracto acuoso de *Valeriana officinalis* las condiciones óptimas para la síntesis verde de nanopartículas de plata, resultó ser a una relación menor de concentración del extracto de la planta a concentración de la sal metálica, de tal manera que cuando se aumenta la cantidad del extracto, la densidad de NPs en solución se incrementa.

A medida que la concentración del extracto *V. officinalis* se incrementó de 0.25 a 1.0 g, para una concentración de 5 mM de AgNO₃ se observó lo siguiente:

- a) La cantidad de NPs de Ag se incrementó
- b) El tamaño de las NPs se incrementó
- c) La distribución de tamaño ligeramente sufre un incremento, plasmado en el ancho del pico de los espectros.
- d) A través de MEB y MET se observó que las NPs de Ag formadas presentaron una morfología cuasiesférica, el rango de tamaños se encuentra entre 20 y 60 nm con un tamaño promedio de 22 nm y una distribución uniforme.

Se observó que, progresivamente la cantidad de NPs disminuye con el incremento en la concentración de la sal utilizada (5–15 mM), cuando la concentración del extracto de *V.*

officinalis aumentó de 0.5 a 1.0 g, esto podría ser atribuido a que a mayor concentración del extracto, más cantidad de compuestos orgánicos están presentes en el medio, por lo tanto, mayor cantidad de núcleos se forman durante el proceso de reducción, conllevando a que la velocidad de crecimiento sea mayor, ocasionando el incremento del tamaño de las NPs más allá del rango nanométrico, en donde la técnica de UV-Vis no puede detectar.

En el caso la síntesis verde con extracto de *Passiflora incarnata*, se observó lo siguiente:

- a) A medida que se aumentó la concentración del extracto, se detectó una mayor formación de NPs de Ag. De igual manera, se observó un cambio en el ancho del pico, aumentando la distribución de tamaños.
- b) La cinética de reducción fue mejor, obteniéndose NPs de Ag a un tiempo de 10 minutos.
- c) Las variables adecuadas para realizar la bio-reducción de manera óptima fueron a una concentración de extracto de 1.0 g y una concentración de sal de plata de 9 mM.

La radiación UV también contribuye a la bio-reducción de las NPs de Ag en condiciones ambientales.

Se evaluó la efectividad bactericida de las NPs de Ag contra la bacteria *E. coli*, mediante el método de difusión de disco, indicando que a medida que se incrementó la concentración de las NPs, un mayor halo de inhibición se obtiene indicando mayor actividad antibacteriana.

REFERENCIAS

1. Takeuchi, Naoko. *Nanociencia y nanotecnología: La construcción de un nuevo mundo átomo por átomo*. 1ª ed. Fondo de cultura económica. México. 2009.
2. Schodek, Daniel L. y Col. *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design: An Introduction for Engineers and Architects*. Butterworth Heinemann. 2009.
3. Wing, Claudia E. Gutiérrez. "Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial." *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*. P : 24-29. 2006.
4. Brooke A. Fridly. *Phytoformations of Silver and Gold Nanoparticles*. West Virginia University. ProQuest, Pag 14. 2006.
5. Marcel van de Voorde, Christian Ngo. *Nanotechnology in a Nutshell. From Simple to Complex Systems*. Springer, 2014.
6. Panigrahi, S., Kundu, S., Ghosh, S., Nath, S., and Pal, T. General method of synthesis for metal nanoparticles. *Journal of nanoparticle Research*. 6(4): p. 411-414. 2004.
7. Tran, Q. H., and Le, A. T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 4(3): p. 033001. 2013.
8. Khan, Z., Al-Thabaiti, S. A., Obaid, A. Y. and Al-Youbi, A. O. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82(2): p. 513-517. 2011.
9. Ramya, M., and Subapriya, M. S. Green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal Pharma Medicine and Biological Science*, 1(1): p. 54-61. 2012.
10. Hongshui Wang, Qiao, X., Chen, J., and Ding, S. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 256 (2): p. 111–115. 2005.
11. Lukman, A. I., Gong, B., Marjo, C. E., Roessner, U., and Harris, A. T. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of colloid and interface science*. 353(2): p. 433-444. 2011.

12. Jagtap, Umesh B., & Bapat, V. A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. *Industrial crops and products*. 46: p. 132-137. 2013.
13. Kumar, D. A., Palanichamy, V., & Roopan, S. M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 127: p. 168-171. 2014.
14. Prakash, P., Gnanaprakasam, P., Emmanuel, R., Arokiyaraj, S., and Saravanan, M. Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 108: p. 255-259. 2013.
15. Otari, S. V., Patil, R. M., Ghosh, S. J., and Pawar, S. H. Green phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Manilkara zapota* (L.) seeds and its inhibitory action against *Candida* species. *Materials Letters*. 116: p. 367-369. 2014.
16. Kumar, P. V., Pammi, S. V. N., Kollu, P., Satyanarayana, K. V. V., and Shameem, U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Industrial Crops and Products*. 52: p. 562-566. 2014.
17. Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., and Sastry, M. (2004). Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of colloid and interface science*. 275(2): p. 496-502. 2004.
18. Prathna, T. C., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., and Mukherjee, A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82(1): p. 152-159. 2011
19. Kumar, P. V., Pammi, S. V. N., Kollu, P., Satyanarayana, K. V. V., and Shameem, U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Industrial Crops and Products*. 52: p. 562-566. 2014.
20. Chaudhary, S., and Paul, S. Antimicrobial studies of silver nanoparticles synthesized from *Vitis vinifera* extract. *Journal of Bionanoscience*. 6(2): p. 104-108. 2012.

21. Sulaiman, G. M., Mohammed, W. H., Marzoog, T. R., Al-Amiery, A. A. A., Kadhum, A. A. H., and Mohamad, A. B. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 3(1): p. 58-63. 2013.
22. Jain, D., Daima, H. K., Kachhwaha, S., and Kothari, S. L. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*. 4(3): p. 557-563. 2009.
23. Rajakumar, G., and Rahuman, A. A. Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. *Acta tropica*. 118(3): p. 196-203. 2011.
24. Sathishkumar, M., Sneha, K., and Yun, Y. S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource technology*. 101(20): p. 7958-7965. 2010.
25. Baghizadeh, A., Ranjbar, S., Gupta, V. K., Asif, M., Pourseyedi, S., Karimi, M. J., and Mohammadinejad, R. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. *Journal of Molecular Liquids*. 207: p. 159-163. 2015.
26. Ning Yang and Wei-Hong Li. Mango peel extract mediated novel route for synthesis of silver nanoparticles and antibacterial application of silver nanoparticles loaded onto non-woven fabrics. *Industrial Crops and Products*. 48: p. 81-88. 2013.
27. Lukman, A. I., Gong, B., Marjo, C. E., Roessner, U., and Harris, A. T. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of colloid and interface science*. 353(2): p. 433-444. 2011.
28. Ibrahim, H. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 30: p. 1-11. 2015.
29. Ashokkumar, S., Ravi, S., Kathiravan, V., and Velmurugan, S. Synthesis of silver nanoparticles using *A. indicum* leaf extract and their antibacterial activity.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134: p. 34-39. 2015.
30. Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., and Hong, J. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*. 18(10): p. 105104. 2007.
31. Baghizadeh, A., Ranjbar, S., Gupta, V. K., Asif, M., Pourseyedi, S., Karimi, M. J., and Mohammadinejad, R. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. *Journal of Molecular Liquids*. 207: p. 159-163. 2015.
32. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., and Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16(10): p. 2346. 2005.
33. Sharma, V. K., Yngard, R. A., and Lin, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*. 145(1): p. 83-96. 2009.
34. Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., and Yacaman, M. J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J nanobiotechnol*. 3(6): p. 1-10. 2005.
35. Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., and Mohan, N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 76(1): p. 50-56. 2010.
36. Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., and Srinivasan, K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus sinensis* peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 79(3): p. 594-598. 2011.
37. Saxena, A., Tripathi, R. M., and Singh, R. P. Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 5(2): p. 427-432. 2010.
38. Prasad, K. S., Pathak, D., Patel, A., Dalwadi, P., Prasad, R., Patel, P., and Selvaraj, K. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tobaccum* leaf extract and

- study of their antibacterial effect. *African Journal of Biotechnology*. 10(41): p. 8122-8130. 2011.
39. Miroddi, M., Calapai, G., Navarra, M., Minciullo, P. L., and Gangemi, S. *Passiflora incarnata L.*: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *Journal of ethnopharmacology*. 150(3): p. 791-804. 2013.
 40. Bos, R., Woerdenbag, H. J., and Pras, N. Determination of valepotriates. *Journal of chromatography A*. 967(1): p. 131-146. 2002.
 41. Torssell, K., and Wahlberg, K. Isolation, Structure and Synthesis of Alkaloids from *Valeriana officinalis*. *Acta Chemica Scandinavica*. 21(0): p. 53-62. 1967.
 42. Malbrán, C. Manual de procedimientos para la determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires: INEI-ANLIS, 39-66. 2001
 43. Ashokkumar, S., Ravi, S., Kathiravan, V., and Velmurugan, S. Synthesis of silver nanoparticles using *A. indicum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134: p. 34-39. 2015.
 44. Ibrahim, H. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 30: p. 1-11. 2015.
 45. Bindhu, M. R., and Umadevi, M. Antibacterial and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 13: p. 373-378. 2015.
 46. Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., and Reddy, P. S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 128: p. 257-262. 2014.
 47. Kumar, K. M., Sinha, M., Mandal, B. K., Ghosh, A. R., Kumar, K. S., and Reddy, P. S. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* extract at room temperature and their antimicrobial studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 91: p. 228-233. 2012.

48. Nezamdoost, T., Bagherieh-Najjar, M. B., and Aghdasi, M. Biogenic synthesis of stable bioactive silver chloride nanoparticles using *Onosma dichroantha* Boiss. root extract. *Materials Letters*. 137: p. 225-228. 2014.
49. Gopinath, V., Priyadarshini, S., Priyadharsshini, N. M., Pandian, K., and Velusamy, P. Biogenic synthesis of antibacterial silver chloride nanoparticles using leaf extracts of *Cissus quadrangularis* Linn. *Materials Letters*. 91: p. 224-227. 2013.
50. Kathiravan, V., Ravi, S., Ashokkumar, S., Velmurugan, S., Elumalai, K., and Khatiwada, C. P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Croton sparsiflorus morong* leaf extract and their antibacterial and antifungal activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 139: p. 200-205. 2015.
51. Sadeghi, B., Rostami, A., and Momeni, S. S. Facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Pistacia atlantica* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134: p. 326-332. 2015.
52. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., and Che, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome research*. 5(4): p. 916-924. 2006.