



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



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

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN  
METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES**

**TÍTULO DE LA TESIS:**

**“Síntesis verde de nanoestructuras de Ag para aplicaciones biológicas”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN METALURGIA Y CIENCIAS DE  
LOS**

**MATERIALES QUE PRESENTA:**

**IBQ. Mario Alejandro Villalpando Nieves**

**DIRECTOR DE LA TESIS:**

**Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo**

**Doctor en Ciencias e Ingeniería en Materiales**

**CO-ASESOR:**

**Dr. Francisco Alfredo Saavedra Molina**

**Doctor en Ciencias Biológicas**

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO**

**JUNIO 2018**

Of. Núm. IIM-ST-041-2018.

Morelia, Mich., Abril 30 del 2018.

**C. ING. MARIO ALEJANDRO VILLALPANDO NIEVES**  
**Presente**

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Maestría en Metalurgia y Ciencias de los Materiales, con la tesis titulada **"SINTESIS VERDE DE NANOESTRUCTURAS DE Ag PARA APLICACIONES BIOLÓGICAS"**, le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

9100252-4	DR. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO	(Presidente)
91002630	DR. FRANCISCO A. SAAVEDRA MOLINA	(Co-Presidente)
7600546-1	DRA. MA. EUGENIA CONTRERAS GARCIA	(Vocal)
15010077	DRA. DIANA FABIOLA CHÓLICO GONZALEZ	(Vocal)
8600380-1	DR. JUAN SERRATO RODRIGUEZ	(Vocal)
9700358-1	DR. JUAN ZARATE MEDINA	(Suplente)

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

U. M. S. N. H.



**Dr. Alberto Ruiz Marín**  
Director



**Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales**  
**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**  
Instituto de Investigación  
en Metalurgia y Materiales

ARM/yatc

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

### **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado gracias a la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, conocimiento, apoyo y recursos. A través de estas líneas me gustaría expresar mi más profundo y sincero sentimiento hacia las personas que con su aporte científico, dedicación y tiempo me brindaron las herramientas necesarias para lograr que este trabajo resultara de la mejor manera posible.

Primeramente, quiero agradecer a las instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. Por su patrocinio y apoyo económico para lograr que este proyecto terminara en tiempo y forma agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). De la misma manera agradezco al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales e Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por todo el conocimiento, herramientas y equipos de trabajo brindados para el desarrollo del proyecto de investigación.

Quedo especialmente agradecido con mis dos asesores de proyecto, el Dr. Alfredo Saavedra Molina que me ha apoyado en todo momento posible en el área de bioquímica, así como corrigiendo de una manera muy cuidadosa este trabajo con el fin de mejorarlo. De igual manera agradezco al Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo, que con su gran calidad humana y experiencia en el área de los nanociencia me integró a su grupo de trabajo. Además, me brindó las herramientas necesarias para aprender y desarrollarme profesionalmente en la investigación. También, tengo que agradecer sus comentarios, guía, sugerencias, correcciones y material de apoyo para elaborar un análisis adecuado durante este tiempo.

## **Dedicatorias**

Primeramente, dedico este trabajo con toda la humildad de mi corazón a Dios, que me ha dado fortaleza para continuar cuando he estado a punto de caer.

De igual forma, dedico esta tesis a mis padres Mario Villalpando Manríquez y María Alejandra Nieves Chapela que son los cimientos y pilares fundamentales en la construcción de mi vida a lo largo de los años, sin ellos nada sería posible.

Tampoco me olvido de mis hermanos Fernando Villalpando Nieves, Alondra Villalpando Nieves y mi pareja Amalia Inés del Moral Gómez que han creído en mí, me han apoyado en este periodo para permitirme avanzar día a día a mis objetivos.

Finalmente, dedico este trabajo a mis familiares y amigos que me han ayudado de una u otra forma en la realización de mis objetivos.

A todos ellos dedico este trabajo, porque siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, ahora me toca regresar un poco de todo lo inmenso que me han entregado.

Con todo mi cariño, este trabajo es para ustedes.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Objetivo general.....	2
<i>1.2.1 Objetivos específicos.....</i>	<i>3</i>
1.3 Hipótesis.....	3
CAPÍTULO II.....	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Nanociencia.....	4
<i>2.1.1 Nanopartículas metálicas.....</i>	<i>4</i>
<i>2.1.2 Nanoalambres.....</i>	<i>6</i>
<i>2.1.3 Métodos de síntesis de nanomateriales.....</i>	<i>6</i>
2.2 Características y constituyentes fitoquímicos de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	9
2.3 Mitocondrias.....	10
<i>2.3.1 Sistemas de transporte de la mitocondria.....</i>	<i>11</i>
2.4 Síntesis de nanopartículas de plata.....	12

2.5 Síntesis de nanoalambres de Ag.....	20
CAPÍTULO III .....	28
METODOLOGÍA.....	28
3.1 Adquisición y molienda de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	28
3.1.1 Preparación del extracto .....	29
3.2 Análisis de la capacidad antioxidante y medición de fenoles de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	29
3.2.1 Ensayo de potencial reductor DPPH*.....	29
3.2.2 Método de Folin-Ciocalteu.....	31
3.3 Síntesis de nanopartículas monometálicas de plata a partir del extracto acuoso de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	33
3.3.1 Eliminación del ion $Cl^-$ .....	33
3.4 Síntesis de nanoalambres de plata por medio del extracto acuoso de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	33
3.5 Estimación de la concentración de las AgNPs y AgNWs por medio de espectroscopía de absorción atómica.....	34
3.6 Caracterización de los nanomateriales .....	34
3.7 Ensayos biológicos de toxicidad.....	36
3.7.1 Extracción de la mitocondria.....	36
3.7.2 Determinación de proteínas por el método de Biuret .....	38

3.7.3 Mediciones del potencial de membrana mitocondrial .....	39
CAPÍTULO IV .....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
4.1 Determinación del potencial antioxidante por medio del ensayo DPPH* .....	41
4.2 Cuantificación de fenoles por medio del método de Folin-Ciocalteu .....	43
4.3 Síntesis de nanopartículas monometálicas de plata usando el extracto etanólico de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	46
4.4 Síntesis de nanopartículas monometálicas de plata empleando extracto acuoso de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	47
4.5 Síntesis de AgNWs a partir del extracto acuoso de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	61
4.6 Mediciones del potencial de membrana mitocondrial .....	73
CAPÍTULO V .....	80
CONCLUSIONES .....	80
5.1 Recomendaciones .....	82
5.2 Trabajo futuro .....	82
CAPÍTULO VI .....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Escala de tamaño de diferentes sistemas [11].	4
<b>Figura 2.2</b> Estabilización de coloides metálicos [16].	5
<b>Figura 2.3</b> Mecanismo de síntesis química de AgNps por medio de la oxidación de la anilina [24].	7
<b>Figura 2.4</b> Representación de la formación de AgNPs [29].	8
<b>Figura 2.5</b> Metabolitos presentes en la biosíntesis de AgNPs [29].	9
<b>Figura 2.6</b> Planta de lavanda en su hábitat natural [30].	10
<b>Figura 2.7</b> Estructura de la mitocondria.	11
<b>Figura 2.8</b> Mecanismos de transporte.	12
<b>Figura 2.9</b> Espectro de UV-Vis de nanopartículas de plata a) Efecto de concentración de la planta <i>Tamarix gallica</i> b) Efecto de la concentración de la sal precursora $\text{AgNO}_3$ [40].	13
<b>Figura 2.10</b> Espectros de UV-Vis de AgNPs derivados de extractos de cacao A) Espectros de las muestras S1L, S2L, S3L y S4L registradas a 30 min a 25°C (B y C) Muestra S3L y S4L a 30 min, 2 h, 4 h y 6 h desde el inicio de la síntesis de AgNPs a 25°C, (D) Espectros de las muestras S1H, S2H, S3H y S4H registrados a un tiempo de 30 minutos con una temperatura de 100°C; (E y F) Muestra S3H y S4H a 30 min, 2 h, 4 h y 6 h desde el inicio de la síntesis de AgNPs a 100°C [41].	15
<b>Figura 2.11</b> Análisis FT-IR del extracto de la planta <i>Aloysia triphylla</i> y AgNPs [42].	16
<b>Figura 2.12</b> Espectro Raman de AgNPs sintetizadas con extracto de planta <i>Aloysia triphylla</i> [42].	17
<b>Figura 2.13</b> Espectro de Difracción de rayos X de AgNPs sintetizadas mediante el extracto de la planta <i>Tagetes erecta</i> [43].	18

<b>Figura 2.14</b> Análisis de la microscopía electrónica de la síntesis de AgNPs mediante <i>Tamarix gálica</i> : a) Imagen de MEB, b) Análisis EDS, c) Micrografía de MET, d) Micrografía HRTEM, e) Análisis de la distribución de tamaño [40]. .....	19
<b>Figura 2.15</b> Efecto de citotoxicidad de las AgNPs a diferentes concentraciones a partir del extracto de cacao a diferentes tiempos de exposición [41]. .....	20
<b>Figura 2.16</b> Espectros de UV-Vis de los AgNWs purificados, obtenidos y el sobrenadante producto de la separación. ....	22
<b>Figura 2.17</b> Comparación de patrones de difracción AgNWs purificados, obtenidos sin separación y el archivo con número de tarjeta JCDPS NO. 04-0783.....	22
<b>Figura 2.18</b> Imágenes de MEB de los AgNWs a), b) Sin separación, c) Purificados y d) Perfil de longitud de AgNWs purificados. ....	23
<b>Figura 2.19</b> Espectros de absorción de UV-Vis de formación de AgNWs con el incremento de la temperatura de reacción.....	24
<b>Figura 2.20</b> Imágenes de AgNWs preparados a 210 °C a) Imagen de MEB, b) Patrón de DRX y c) Imagen de MEB magnificada. ....	25
<b>Figura 2.21</b> Imágenes de MET de los AgNWs producto de diferentes temperaturas de reacción a) 140° C, b) 170°C, c) 190°C, d) 210°C, e) morfología detallada de AgNWs y d) amplificación de la morfología detallada (recuadro: patrón de área selecta de una punta única del AgNW). ....	26
<b>Figura 2.22</b> Relación de supervivencia de <i>E-coli</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Staphylococcus</i> cultivados en presencia de nanoestructuras de plata con diversas formas.....	27
<b>Figura 3.1</b> Estrategia general del proceso de síntesis y evaluación de las propiedades biológicas de las nanopartículas y nanoalambres. ....	28
<b>Figura 3.2</b> Reacción química entre el radical DPPH y la especie reactiva.....	29
<b>Figura 3.3</b> Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu [51] .....	31

<b>Figura 4.1</b> Ensayo de potencial antioxidante de las distintas plantas estudiadas a) Concentración 0.02 g/ml, b) Concentración 0.04 g/ml, c) Concentración 0.06 g/ml y d) Comparativo de las diferentes concentraciones de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	43
<b>Figura 4.2</b> Curva patrón de ácido gálico para cálculo de la cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu. ....	44
<b>Figura 4.3</b> Síntesis de AgNPs empleando etanol como solvente a) Formación de precipitados, b) Adherencia a las paredes del tubo y c) Espectros de UV-Vis a diferentes concentraciones de extracto de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> .....	47
<b>Figura 4.4</b> Muestra 5 mM a) Cambio de color de las soluciones respecto al tiempo y b) Espectros de UV-Vis a diferentes concentraciones molares. ....	48
<b>Figura 4.5</b> Micrográficas de MEB de las AgNPs a medida que incrementa la concentración de sal precursora a) 1 mM, b) 2 mM, c) 3 mM d) 4 mM, e) 5 mM y f) Análisis químico EDS de la muestra 5 mM.....	49
<b>Figura 4.6</b> Difractograma de rayos X de la muestra de AgNPs a una concentración de 5 mM...	50
<b>Figura 4.7</b> Difractograma de rayos X de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> . ....	51
<b>Figura 4.8</b> Cambio de color del extracto de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> con los lavados a) Primer residuo del lavado b) Segundo residuo del lavado y c) Extracto preparado a 60°C. ....	52
<b>Figura 4.9</b> Síntesis de AgNPs de los diferentes lavados a) Disminución del cambio de color de formación a medida que se realizaron los lavados y b) Comparativo de los espectros de UV-Vis de las distintas soluciones.....	53
<b>Figura 4.10</b> Espectros de FT-IR a) Extracto de la planta <i>Lavandula angustifolia</i> y b) AgNPs...	54
<b>Figura 4.11</b> Imágenes de campo claro mostrando una distribución heterogénea de tamaños.....	55
<b>Figura 4.12</b> Histograma de la distribución de tamaño de las partículas.....	56

<b>Figura 4.13</b> Imágenes de MET de alta resolución (HRTEM) con anexos de la transformada de Fourier, planos del tipo (1 1 1), (2 0 0) y distancias interplanares que confirman la naturaleza cristalina de las AgNPs.....	57
<b>Figura 4.14</b> Formación de AgNPs a) 5 mM A, b) 5 mM B y c) Comparativo de los espectros de UV-Vis de los diferentes ensayos de síntesis a la misma concentración de sal precursora. ....	58
<b>Figura 4.15</b> Micrografías de barrido de la muestra 5 “A” a diferentes ampliaciones a) 5000 X, b) 10000 X, c) 40000 X y d) 100000 X.....	59
<b>Figura 4.16</b> Mapeo químico de la muestra 5 “A” a) Imagen en gris, b) Ag, c) Cl y d) Análisis químico.....	60
<b>Figura 4.17</b> Micrografías de MEB de la muestra 5 mM “B” a diferentes ampliaciones a) 5000 X, b) 10 000 X, c) 40 000 X y d) 100 000 X.....	61
<b>Figura 4.18</b> Síntesis de nanoalambres de plata a) Cambio de color de formación y b) Comparativo de los espectros de UV-Vis de los lavados y residuos de los AgNWs.....	63
<b>Figura 4.19</b> Micrografías de MEB de AgNWs sin lavar a diferentes ampliaciones a) 10 000 X, b) 40 000 X y c) Análisis químico EDS.....	64
<b>Figura 4.20</b> Micrografías de MEB a) AgNWs y b) Análisis químico EDS.....	65
<b>Figura 4.21</b> Mapeo químico de los AgNWs a) Imagen en gris, b) Plata, c) Cloro y d) Cobre. ...	66
<b>Figura 4.22</b> Mecanismo de crecimiento de los AgNWs a) Base formada por centrifugación, b) Adherencia de AgNPs en la punta, c) Adherencia de AgNPs en el cuerpo y d) Análisis químico EDS.....	67
<b>Figura 4.23</b> Mapeo químico de un nanoalambre a) Imagen en gris, b) Cobre, c) Plata y d) Cloro. ....	68
<b>Figura 4.24</b> Difractograma de rayos X de los AgNWs. ....	69
<b>Figura 4.25</b> Imagen de contraste de masa de MET de los AgNWs.....	70

<b>Figura 4.26</b> Imágenes de MET a) Patrón de difracción de los AgNWs, b) Campo claro c) Campo oscuro 1, d) Campo oscuro 2.....	71
<b>Figura 4.27</b> Imagen de alta resolución (HRTEM) de los AgNWs en donde a) Imagen original b) Zoom de la imagen indicando la naturaleza cristalina de éstos.....	71
<b>Figura 4.28</b> Imágenes de MET a) Campo claro, Campo oscuro y c) Análisis químico puntual. .	72
<b>Figura 4.29</b> Mapeo químico de AgNWs a) Campo oscuro (imagen original), b) Campo oscuro de la zona de análisis, c) Campo Claro de la zona de análisis y d) Zona del elemento plata mostrada en color rojo.....	73
<b>Figura 4.30</b> Curva patrón de iones de Ag para el cálculo de la concentración de las AgNPs y AgNWs sintetizados. ....	73
<b>Figura 4.31</b> Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (12.5 ppm), c) Expuestas a AgNPs (12.5 ppm) y d) Expuestas a AgNO <sub>3</sub> (12.5 pm). ....	75
<b>Figura 4.32</b> Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (25 ppm), c) Expuestas a AgNPs (25 ppm) y d) Expuestas a AgNO <sub>3</sub> (25 ppm). ....	76
<b>Figura 4.33</b> Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (50 ppm), c) Expuestas a AgNPs (50 ppm) y d) Expuestas a AgNO <sub>3</sub> (50 ppm). ....	77
<b>Figura 4.34</b> Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (100 ppm), c) Expuestas a AgNPs (100 ppm) y d) Expuestas a AgNO <sub>3</sub> (100 ppm). ....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Síntesis verde de AgNPs con diferente cantidad de cacao y AgNO <sub>3</sub> [41]. ....	14
<b>Tabla 2.2</b> Grupos funcionales involucrados en la síntesis de AgNPs [42].....	16
<b>Tabla 3.1</b> Plantas y parámetros empleados en el ensayo de potencial reductor DPPH* .....	30

<b>Tabla 3.2</b> Condiciones experimentales de los extractos de plantas preparados en solución acuosa en el ensayo de Folin-Ciocalteu. ....	32
<b>Tabla 3.3</b> Reactivos que integran el Medio 1. EGTA se disolvió previamente en NaOH y finalmente la solución se reguló a pH 7.4 [54]. ....	37
<b>Tabla 3.4</b> Reactivos que integran el Medio 2. La solución final se regula a pH 7.4 [54]. ....	37
<b>Tabla 3.5</b> Diseño de experimentos del método de Biuret [54]. ....	38
<b>Tabla 3.6</b> Reactivos de preparación del método de Biuret [54]. ....	39
<b>Tabla 4.1</b> Comparativo del contenido total de fenoles de las plantas <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Origanum vulgare</i> y <i>Sedum preaultum</i> . ....	45
<b>Tabla 4.2</b> Resultados del análisis de concentración de AgNPs y AgNWs. ....	74

## RESUMEN

La síntesis de nanopartículas metálicas ha atraído la atención de las investigaciones debido a la gran cantidad de aplicaciones potenciales en campos tecnológicos y médicos. Se ha demostrado que los nanomateriales compuestos de plata poseen propiedades antimicrobianas ante diversos patógenos. Sin embargo, los métodos de síntesis requieren de materiales costosos y dañinos para el medio ambiente, es por ello el interés de emplear un método de síntesis por medio de compuestos orgánicos presentes en los extractos de las plantas.

En el presente trabajo, se realizó la síntesis de nanopartículas y nanoalambres de Ag partir de la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor y estabilizador. Por medio del ensayo de potencial reductor (DPPH) se verificó que la planta posee una captación de radicales libres por encima del 93%. Como complemento, el método de Folin Ciocalteu demostró que la infusión de la planta *Lavandula angustifolia* a concentración de 0.02 g/ml presentó los valores en la cuantificación de fenoles más equilibrados, que indica que actúan de manera equitativa como agentes reductores y estabilizadores. Además, fue posible sintetizar por primera vez AgNWs a través de un método verde empleando el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. Se confirmó la presencia de los AgNWs y AgNPs sintetizados mediante la espectroscopia UV-Vis. Se determinó forma, tamaño, distribución y estructura cristalina de éstos por medio de la microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET) y difracción de rayos X (DRX). También, se optimizó el proceso de formación de AgNPs mediante la variación del tiempo de agitación obteniendo nanopartículas esféricas y homogéneas con un tamaño promedio de 18 nm.

Por otro lado, los ensayos en mitocondrias de hígado de rata Wistar arrojaron que la toxicidad de los iones Ag es mayor en comparación a los nanosólidos de plata reducida (AgNPs y AgNWs). Finalmente, se determinó que la toxicidad a una concentración inicial de daño es de 25 ppm, y depende la forma del nanomaterial (esferas y alambres).

**Palabras claves:** Nanopartículas de plata (AgNPs), Nanoalambres de plata (AgNWs), *Lavandula angustifolia*, Caracterización, Mitocondrias.

## ABSTRACT

The synthesis of metallic nanoparticles has attracted the attention of research due to a large number of potential applications in technological and medical fields. It has been demonstrated that nanomaterials composed of silver possess antimicrobial properties against various pathogens. However, the methods of synthesis require expensive and harmful materials for the environment, for this reason, the interest of using methods of synthesis using organic compounds present in the plant's extracts.

In the present work, the synthesis of silver nanoparticles and nanowires was achieved using the *Lavandula angustifolia* plant extract as a reducing and stabilizing agent. Through the potential reduction test (DPPH), it was verified that the plant has a free radicals scavenging greater than 93%. As a compliment, the Folin Ciocalteu method showed that the infusion of the *Lavandula angustifolia* plant extract with a concentration of 0.02 g / ml presented the values more balanced in the quantification of phenols, indicating that they act equitably as reducing and stabilizing agents. In addition, it was possible to synthesize AgNWs for the first time through a green method using the *Lavandula angustifolia* plant extract. UV-Vis spectroscopy confirmed the presence of AgNWs and AgNPs synthesized. The shape, size, distribution and crystalline structure of these nanomaterials were determined by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD). Also, it was optimized the AgNPs formation process by varying the agitation time, obtaining spherical and homogeneous nanoparticles with an average size of 18 nm.

On the other hand, the mitochondrial membrane potential assay in Wistar mouse liver showed that the toxicity of the silver ions was higher compared to the silver nanosolids (AgNPs and AgNWs). Finally, it was determined that the initial toxicity concentration of damage be 25 ppm and depends on the shape of the nanomaterial (spheres and nanowires).

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, los daños al ambiente han aumentado como consecuencia del crecimiento industrial y poblacional, principalmente por el alto uso de productos químicos sin un control normativo y la formación de residuos peligrosos que son liberados al entorno. Con el creciente desarrollo de la nanotecnología se ha mostrado un aumento significativo en los métodos químicos empleados en la síntesis de los diferentes tipos de nanomateriales. Existe una diversidad de técnicas físicas y químicas en la síntesis de nanopartículas (NPs) que permiten la obtención de las mismas con forma y tamaño controlado, pero que presentan desventajas tanto económicas como ambientales [1]; por lo tanto, la búsqueda de técnicas que sean económicas y permitan disminuir la toxicidad hacia el medio ambiente y la salud humana es de suma importancia.

El entorno natural posee una variedad de microorganismos y organismos terrestres y marinos que pueden ser empleados en la síntesis de diferentes nanomateriales. Se ha comprobado a través de diversos estudios, que estos organismos pueden ser usados en la síntesis de nanomateriales y como consecuencia de esto, existe una necesidad de explorar métodos de síntesis por medio de fuentes biológicas. Es importante destacar que el método de síntesis verde de plantas es el más usado debido a su simplicidad, efectividad y bajo costo [2].

Las propiedades físico-químicas de las nanopartículas metálicas dependen en gran medida de su distribución de tamaño, forma y estructura cristalina [3]. Es por ello, que éstas han sido utilizadas en diversas aplicaciones tales como adsorbentes, sensores y catalizadores debido a su superficie específica y alta reactividad. Se ha comprobado que las NPs metálicas poseen propiedades antimicrobianas [4], por eso generan interés en aplicaciones específicas tales como tratamiento de aguas residuales, medicina y el manejo de alimentos [5].

Por lo tanto, la idea central de esta investigación es sintetizar AgNPs y AgNWs a partir del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor y estabilizador. Además, se determinó el tamaño, forma y estructura por diversas técnicas de caracterización como son espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (DRX),

microscopía de barrido (MEB) y microscopía de transmisión (MET), para finalmente evaluar el efecto tóxico por medio de la medición del potencial de membrana en mitocondrias de hígado de rata.

### **1.1 Justificación**

Durante muchos años, el método más empleado en la síntesis de nanopartículas metálicas ha sido el método convencional por reducción química, éste emplea reactivos perjudiciales para el medio ambiente como es el caso de la polivinilpirrolidona (PVP), ya que al momento de la descomposición con calor puede producir sustancias como monóxido de carbono, dióxido de carbono y óxidos de nitrógeno. Además, este reactivo difícilmente se elimina del agua, lo que puede causar daños a la flora y fauna acuática por su manejo inadecuado [6]. Otros reactivos tóxicos para el ambiente y la salud humana empleados en la síntesis convencional son el borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) y la anilina ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ ), ya que causan irritación, náuseas y vómitos, si se tiene continua exposición. Es importante mencionar, que la anilina presenta mayor potencial de toxicidad hacia los humanos, ya que modifica perjudicialmente la hemoglobina y ocasiona daño oxidativo del ADN, causando numerosas condiciones patológicas incluyendo el cáncer [7].

Con el fin de minimizar las sustancias que afectan al medio ambiente y salud humana, la síntesis verde a partir de la planta *Lavandula angustifolia* se convierte en una alternativa viable en la producción de nanopartículas metálicas, esto se debe a que es una planta perenne que crece en terrenos secos y soleados, de fácil adquisición, costo accesible y principalmente porque es una planta que posee compuestos reductores como fenoles, flavonoides y antocianinas [8]. Por otro lado, se ha estudiado la actividad antibacteriana de las nanopartículas monometálicas de plata (AgNPs, por sus siglas en inglés), pero pocas investigaciones han sido enfocadas al estudio de su toxicidad [9].

### **1.2 Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo es realizar la síntesis verde de nanoestructuras de plata, mediante el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* y efectuar su caracterización estructural, además de su evaluación en aplicaciones biológicas.

### **1.2.1 Objetivos Específicos**

- Determinar el potencial antioxidante de la planta *Lavandula angustifolia* por el ensayo reductor DPPH\*.
- Realizar la cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu en los extractos de las plantas *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare* y *Sedum prealtum*.
- Sintetizar AgNPs y AgNWs por medio de un método verde a partir del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* variando las condiciones experimentales como: agitación, concentración de la sal precursora, concentración del extracto de la planta, entre otras.
- Estimar la concentración de las AgNPs y AgNWs obtenidos mediante espectroscopía de absorción atómica.
- Caracterizar morfológica y estructuralmente los nanomateriales mediante las técnicas estructurales espectroscopía UV-Vis, espectroscopía FT-IR, DRX, MEB y MET.
- Evaluar la toxicidad de las AgNPs y AgNWs en mitocondrias de hígado de rata de laboratorio.

### **1.3 Hipótesis**

Por medio de las sustancias presentes en el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* se logrará la síntesis a temperatura ambiente de nanopartículas y nanoalambres de Ag. Además, los nanomateriales sintetizados no mostrarán toxicidad a concentraciones menores de 500 ng/ml en mitocondrias de hígado de rata en periodos cortos de exposición.

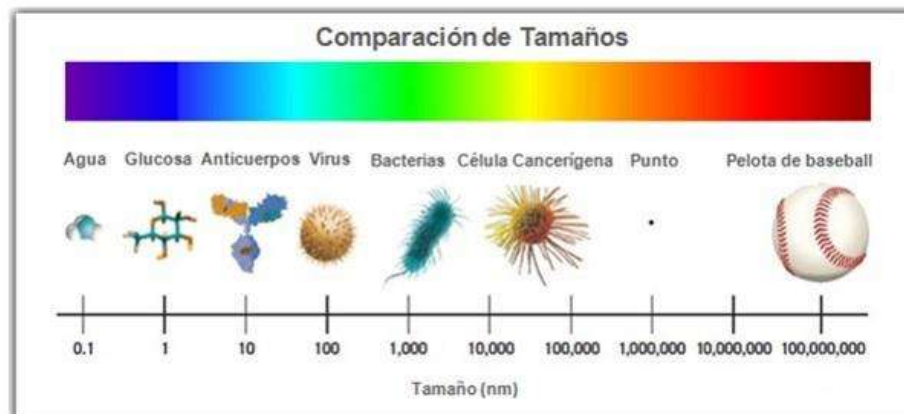
## CAPÍTULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

#### 2.1 Nanociencia

La nanociencia, proviene del prefijo nano en griego *νάνος* que significa enano, y corresponde a una mil millonésima parte del metro (un factor de  $10^{-9}$  m). La nanociencia puede ser definida como el estudio, diseño, creación y síntesis de los materiales a nanoescala [10]. Estos materiales poseen distintas propiedades en comparación a las del material en bulk, no solo por su pequeño tamaño, sino también, a que por ser individuos que se encuentran cerca de las dimensiones atómicas, las leyes que los gobiernan son las de mecánica cuántica. Es por ello que, a este nivel de tamaño se observan propiedades y fenómenos totalmente nuevos.

En la actualidad, la manipulación de la materia en la nano escala promete un enorme potencial para diversas aplicaciones e innovaciones involucrando nuevos materiales en distintas áreas como la industria textil, alimentaria, química, en la medicina, tecnologías de la información y energía [10]. La Figura 2.1 muestra la unidad de medida de diversos sistemas, y la escala a la que pertenecen (Nano o Micro) [11].



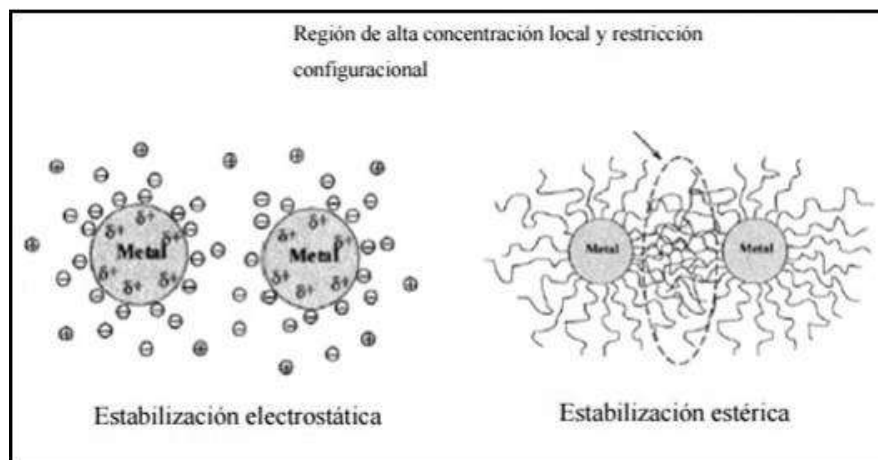
**Figura 2.1** Escala de tamaño de diferentes sistemas [11].

#### 2.1.1 Nanopartículas metálicas

Los nanomateriales son materiales con propiedades morfológicas más pequeñas en al menos una dimensión, generalmente restringiéndose su tamaño de (1-100) nm [12]. La idea de manejar un material a escala nano es muy sencilla, ya que muchas de las propiedades de los materiales

dependen de cómo se comporten los electrones, siendo en un material nanométrico un movimiento de electrones más limitado por las dimensiones del propio material; además, la proporción de átomos en la superficie con respecto al interior es más alta que en materiales de mayor tamaño [10]. Tal es el caso de las nanopartículas metálicas, ya que son agrupaciones de átomos o moléculas medidas en la escala nanométrica (1-100) nm [13]. Los metales a escala nano poseen propiedades ópticas, electrónicas, catalíticas y magnéticas que difieren de aquellas presentes a mayor escala. Dichas propiedades están fuertemente relacionadas con el tamaño, forma, composición y estructura cristalina de la partícula [14]. Es importante señalar que los materiales a nanoescala muestran comportamientos intermedios entre los sólidos microscópicos y un nanosistema agregado con unos cuantos átomos o moléculas, de ésta manera, hay propiedades que solo pueden ser explicadas por la mecánica cuántica [15]. Las nanopartículas metálicas tienen una fuerte tendencia a aglomerarse debido a las interacciones de Van der Waals (ver Figura 2.2), por esta razón deben ser estabilizadas, con el fin de evitar la coalescencia o agregación. Los dos tipos de estabilización generalmente utilizados son [16]:

1. **Estabilización electrostática:** involucra la creación de una doble capa de iones absorbidos en la superficie y asociados alrededor de la partícula. De esta manera, cuando el potencial eléctrico de la doble capa es alto, la repulsión coulombica entre las partículas previene su agregación.
2. **Estabilización estérica:** es debida a la absorción de moléculas grandes como los polímeros en la superficie de la partícula.



**Figura 2.2** Estabilización de coloides metálicos [16].

### ***2.1.2 Nanoalambres***

Las nanoestructuras unidimensionales han sido llamadas por una variedad de nombres que incluyen: whiskers, fibras, nanohilos, nanovarillas, nanotubos y nanoalambres. Generalmente, se considera que los whiskers y nanorodillos tienen una relación de aspecto menor en comparación a las nanofibras y nanoalambres [17]. Por esta razón, un nanoalambre es definido como un material de aspecto unidimensional, en el cual la relación de aspecto del largo es por lo menos 10 veces mayor en comparación al ancho [18]. Además, el ancho debe tener un tamaño inferior a los 100 nm. Es importante mencionar que la definición anterior se ha extendido a alambres atómicos y moleculares, ya que, aunque no poseen las características geométricas, si poseen propiedades físicas diferentes a las del material a granel [19].

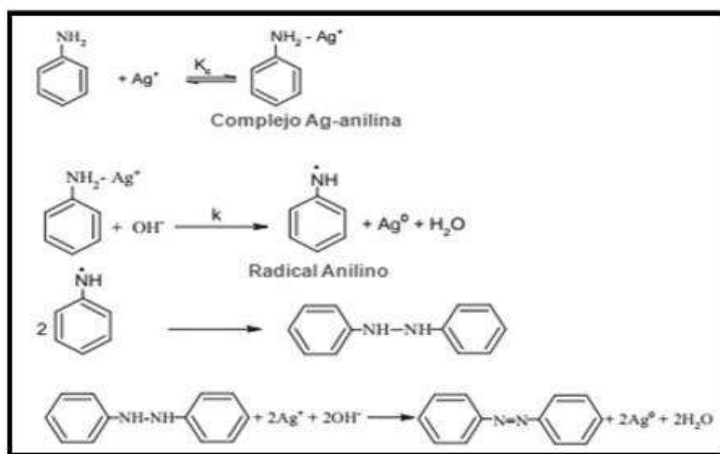
Se han desarrollado muchas técnicas en la síntesis de nanoestructuras unidimensionales por medio de métodos convencionales los cuales son: crecimiento espontáneo, síntesis basada en templates, electrospinning y litografía [17]. Por otro lado, los nanoalambres metálicos han sido un modelo interesante de estudio, esto se debe a la potencialización de sus propiedades físicas como conductividad eléctrica, conductividad térmica, propiedades ópticas y magnéticas; por lo cual presentan una amplia gama de aplicaciones en componentes electrónicos, optoelectrónicos y magnéticos [20].

### ***2.1.3 Métodos de síntesis de nanomateriales***

Los procesos de síntesis de nanopartículas pueden ser establecidos por medio de dos criterios como son los métodos de arriba-abajo y abajo-arriba (Top- down y bottom-up, por sus siglas en inglés). En los primeros se reestructura un material a granel (parcialmente desmantelado, procesado o depositado) ya sea por medio de molienda, métodos químicos y la volatilización de un sólido seguido de la condensación del componente evaporado con el fin de formar los nanomateriales. En el caso de los bottom-up, los nanomateriales se ensamblan a partir de bloques de construcción básicos como moléculas o nanoclusters. Estos bloques de construcción, son objetos nanoescala con propiedades adecuadas, que pueden crecer a partir de precursores elementales [21]. Ejemplo de ello son los métodos de síntesis de nanopartículas por diferentes técnicas, siendo la más común la reducción química convencional. Los métodos de síntesis por medio del proceso bottom-up, también pueden ser clasificados en físicos, químicos y biológicos, siendo los últimos dos los más importantes para el enfoque de este trabajo.

Los métodos químicos son los más utilizados debido a su capacidad para ser escalados, en donde la reducción química de sales metálicas en solución es el más empleado. La reducción química permite controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas. En sistemas acuosos, el agente reductor es adicionado *in situ*, mientras que, en los sistemas no acuosos, el solvente puede actuar como agente reductor. Los agentes reductores más utilizados son la anilina, el borohidruro de sodio, hidracina y dimetilformamida [22]. La síntesis de las partículas en solución se produce por reacciones químicas que dan lugar a la formación de núcleos de partículas estables y su subsiguiente crecimiento. Otros ejemplos de métodos químicos son la radiólisis, fotólisis y el método para óxidos sol-gel. La Figura 2.3 muestra el mecanismo por reducción química de AgNPs usando como agente reductor la anilina.

Por otro lado, los métodos de biorreducción y bioestabilización de sales orgánicas por medio de organismos y microorganismos han aumentado en tiempos recientes. Estos métodos consisten en emplear bacterias, levaduras, hongos o extractos de plantas como agentes reductores-estabilizadores, para que por medio de un solo paso se obtengan nanopartículas metálicas[23].

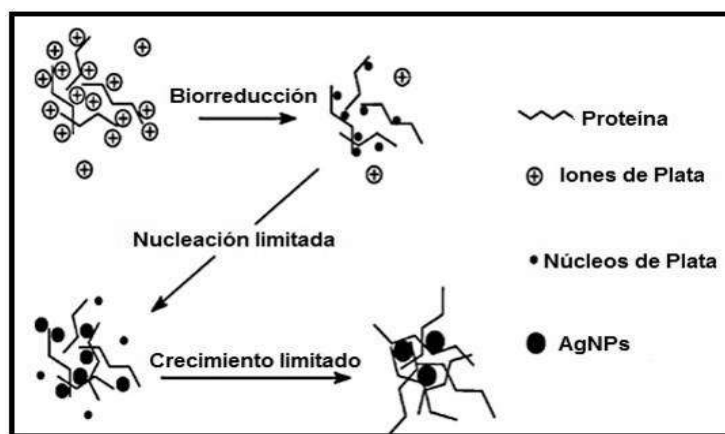


**Figura 2.3** Mecanismo de síntesis química de AgNps por medio de la oxidación de la anilina [24].

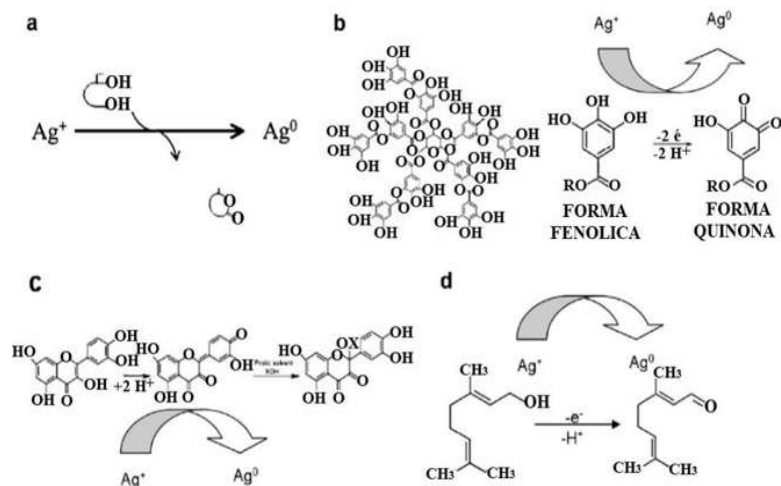
Estos organismos pueden producir nanopartículas de manera intracelular o extracelular, siendo esta última técnica, más utilizada en la investigación debido a su menor costo y adaptabilidad [25]. Los tiempos de reacción empleando microorganismos son largos comparados con los métodos de reducción química convencional y la lograda por extracto de plantas, ya que pueden variar desde 24 hasta 120 horas en el caso de los microorganismos. Empleando extractos de plantas como agentes reductores, la vía de biorreducción de las nanopartículas puede ser más rápida, siendo de

hasta 20 minutos para el caso de las nanopartículas de oro por medio del extracto de *Capsicum annuum* [26]. A pesar de ser una técnica que reduce los contaminantes al entorno, este tipo de síntesis presenta desventajas como bajas escalas de producción [27].

La síntesis de nanopartículas metálicas por medio de extractos de plantas cumple con la mayoría de los principios que engloba la química verde [28], de ahí su nombre “síntesis verde”. Este proceso de síntesis es similar al método de reducción química convencional de sales metálicas, debido a que en ambos métodos se parte de una sal precursora en solución, que, por medio de la adición de agentes reductores y estabilizadores, se consigue la obtención de diferentes nanopartículas metálicas. Una de las diferencias entre el método convencional y verde es que el primero es realizado en dos pasos, mientras que el segundo solo en uno, esto causado por la doble función del extracto (agente reductor-estabilizador). Pocos mecanismos de síntesis de NPs por medio de plantas han sido propuestos, pero se ha observado que puede ser lograda por dos vías, siendo éstas extracelular o intracelular. Para el caso de la vía extracelular, son las biomoléculas tales como carbohidratos, proteínas, polioles y cetonas las que actúan como agentes reductores, mientras que los compuestos heterocíclicos actúan como agentes de recubrimiento de las nanopartículas. La Figura 2.4 muestra un mecanismo general de la formación de AgNPs. Además, la Figura 2.5 ejemplifica los posibles metabolitos involucrados en la síntesis de AgNPs con plantas donde el apartado (a) muestra la reducción de iones de plata por medio de polioles, (b) reducción de iones de plata por medio de ácido tánico, (c) reducción de iones de plata por la quercetina y finalmente (d) reducción de los iones de plata por medio de la oxidación del geraniol [29].



**Figura 2.4** Representación de la formación de AgNPs [29].



**Figura 2.5** Metabolitos presentes en la biosíntesis de AgNPs [29].

## 2.2 Características y constituyentes fitoquímicos de la planta *Lavandula angustifolia*

La planta de lavanda es cultivada en muchos países, pero tiene su origen en las zonas de Europa meridional, Europa occidental y del Norte de África. Su nombre proviene del latín “lavare” debido a que los romanos utilizaban esta planta para tomar baños [30]. La lavanda es un arbusto perenne, de tamaño medio e intenso perfume, que pertenece a la familia de las Labiadas y que alcanza una altura generalmente de 50 a 80 cm [31]. Su follaje es gris y sus flores de color púrpura en el cual ubican espigas terminales, en grupos de 6 a 10 flores que son las encargadas de concentrar la mayor cantidad del aroma, en el caso de la especie *Lavandula Angustifolia*. Este tipo de planta prefiere la plena exposición solar y tolera los terrenos secos. Puede encontrarse en lugares de alto tránsito debido a que su color, su forma esférica, fragancia, duración de sus hojas y su follaje verde grisáceo permanecen durante todo el invierno [30]. En su hábitat natural el crecimiento de esta planta se da en terrenos secos, soleados, llenos de piedras junto a otros arbustos y plantas como el romero, abrotano y tomillo; prefiere los suelos pobres de naturaleza calcárea [32]. Se puede apreciar en la Figura 2.6 la planta de lavanda en su hábitat natural. Los componentes químicos de las plantas se concentran generalmente en las semillas, flores y hojas de cada planta [33]. En el caso de la planta de lavanda, sus constituyentes principales son los compuestos fenólicos, ya que está compuesta aproximadamente 19 flavonas y 8 antocianinas [8]. Se han caracterizado ciertos pigmentos en la planta de lavanda como son la delphinidina y la malvidina, además de dos ácidos hidroxicinámicos como el ácido rosmarínico y el ácido clorogénico. Además, la planta de lavanda posee fracciones de aceites volátiles como son la cumarina y 7-metoxicumarina, se cree que estos

constituyentes son los principales compuestos encargados de la reducción y estabilización de las NPs.



**Figura 2.6** Planta de lavanda en su hábitat natural [30].

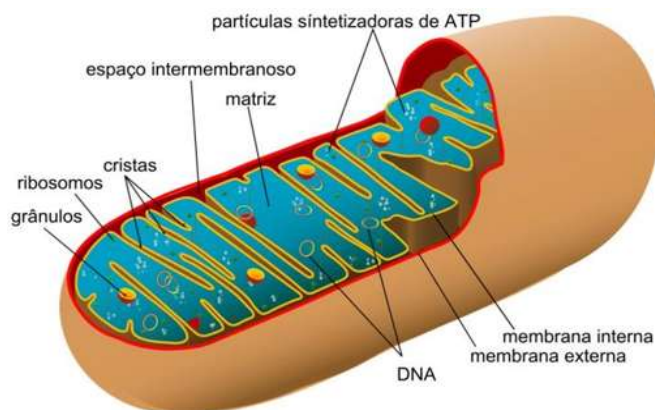
### **2.3 Mitocondrias**

Las mitocondrias son orgánulos que existen en gran cantidad de células eucariotas, y tienen un tamaño similar al de las bacterias, siendo éste de  $1 \times 2 \mu\text{m}$ . Generalmente, existen unas 2000 mitocondrias por célula y juntas ocupan hasta un 25% del volumen celular [34]. Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas, una externa lisa y una interna fuertemente plegada, invaginada o tubular que tiene una gran superficie y encierra la matriz mitocondrial. Las invaginaciones de la membrana interna se llaman crestas y las evaginaciones tubulares son los túbulos. El espacio entre la membrana externa y membrana interna se conoce como espacio intermembranal [35] (ver Figura 2.7).

El número y forma de las mitocondrias, así como el número de crestas varían entre tipos celulares. Los tejidos con metabolismo más intenso, tienen mitocondrias con muchas crestas variando de acuerdo a su estado funcional.

Las mitocondrias son consideradas la fábrica de la célula, esto se contempla así ya que por medio de la fosforilación oxidativa producen la mayor parte del Adenosín trifosfato (ATP) que ésta requiere. En la matriz mitocondrial se localizan la piruvato deshidrogenasa, el ciclo del ácido cítrico y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y una parte del ciclo de la urea, siendo partes fundamentales de la producción energética de la mitocondria. Con la membrana interna se asocian la cadena respiratoria, la ATP-sintasa y también las enzimas con grupo hemo.

La membrana interna desarrolla un papel importante en la fosforilación, al ser impermeable a los protones de la cadena respiratoria, siendo estos bombeados a través de los complejos I, III y IV desde la matriz hacia el espacio intermembranoso formando un gradiente protónico, que la atraviesa y por medio del cual puede conservar la energía química liberada por la oxidación del NADH y el FADH<sub>2</sub>. Luego la enzima ATP-sintasa utiliza la energía almacenada en ese gradiente para formar ATP a partir de Adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) [34].



**Figura 2.7** Estructura de la mitocondria [34].

### ***2.3.1 Sistemas de transporte de la mitocondria***

Como se mencionó con anterioridad, las mitocondrias están rodeadas de una membrana interna y otra externa. La membrana externa contiene porinas que permiten el paso de moléculas, siendo éstas de hasta 10 kDa. Por el contrario, la membrana interna es impermeable hasta para las moléculas pequeñas a excepción de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Por esta razón, todos los sustratos restantes del metabolismo mitocondrial, así como sus productos, deben de atravesar esta membrana con ayuda de transportadores específicos. Estos sistemas de transporte se basan en diferentes mecanismos (ver Figura 2.8). Los metabolitos y los iones pueden ser transportados aisladamente, junto con una segunda sustancia o mediante el intercambio con una molécula [34].

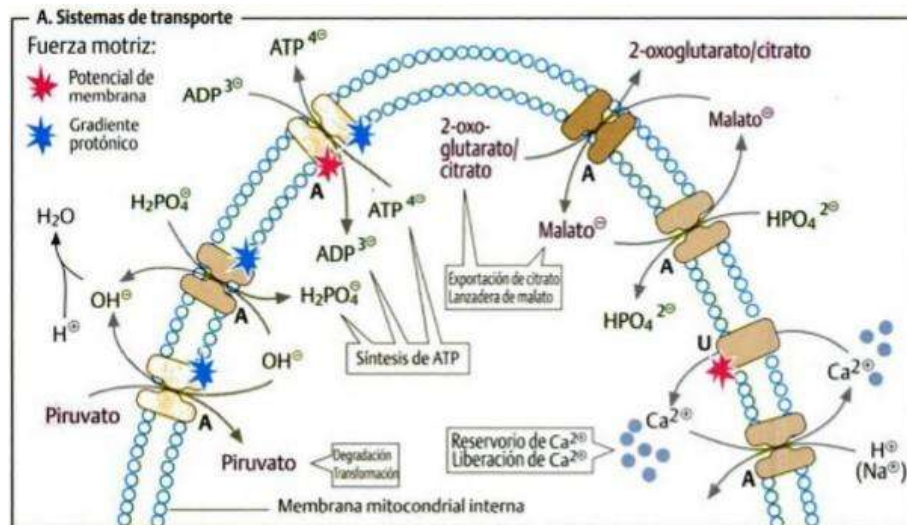


Figura 2.8 Mecanismos de transporte [34].

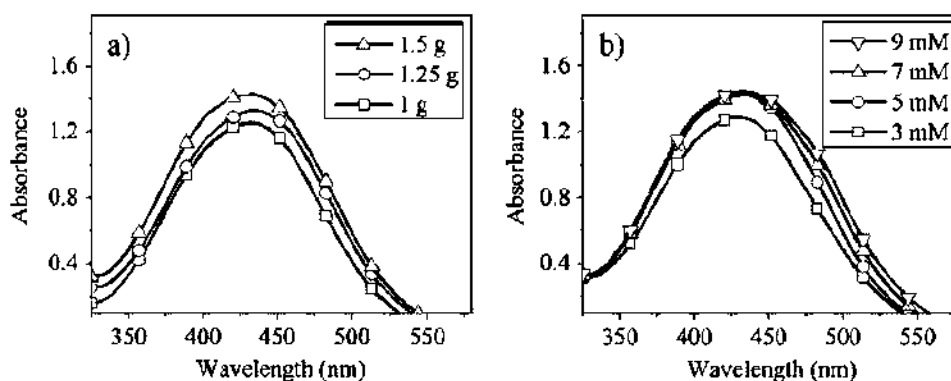
## 2.4 Síntesis de nanopartículas de plata

En la actualidad han aumentado los métodos de síntesis verde por reducción química de nanopartículas metálicas, esto se debe, a que además de ser un método ecológico, también ha permitido la disminución de costos, dado que las materias primas empleadas son más económicas en comparación con la síntesis convencional [36].

Diversos métodos verdes han sido empleados en la síntesis de nanopartículas de plata, estos métodos consisten en la variación del agente reductor-estabilizador por medio microorganismos como levaduras [37], bacterias [38], hongos [39] y extractos de plantas [5], siendo éste último el más empleado por su fácil adquisición y manejo [5].

Diferentes trabajos de síntesis verde de nanopartículas de plata empleando extractos de plantas como agente reductor-estabilizador han sido publicados con la obtención de diferentes resultados en cuanto al tamaño, forma y distribución de las nanopartículas. Un ejemplo de ello es el trabajo que realizaron López-Miranda y col. [40] en el cual la síntesis de nanopartículas de plata se logró mediante la reacción de la sal de plata ( $AgNO_3$ ) y el extracto de planta *Tamarix gallica* a temperatura ambiente, obteniendo así partículas en un rango entre 5-40 nm. Posteriormente, las nanopartículas fueron caracterizadas por medio de diferentes técnicas como son: espectroscopía UV-Vis, espectroscopía FT-IR, MEB, MET y DRX. La Figura 2.9 muestra las bandas de absorción características de UV- Vis de las AgNPs a una longitud de onda de 425 nm. En el panel (a) se observan las variaciones correspondientes a la concentración del extracto de la planta, es apreciable

que a medida que se incrementa la cantidad de extracto, hay un aumento en la absorbancia en el máximo de la banda de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), esto es debe que, a mayor concentración de extracto de la planta, existe una mayor cantidad de compuestos reductores-estabilizadores que actúan en la formación de las AgNPs. En el caso del panel (b) se muestra la variación con respecto a la molaridad de la sal precursora, observando que a 7 mM se obtuvo la mayor intensidad del SPR, que indica que a esa molaridad se obtiene la mayor concentración de AgNPs.



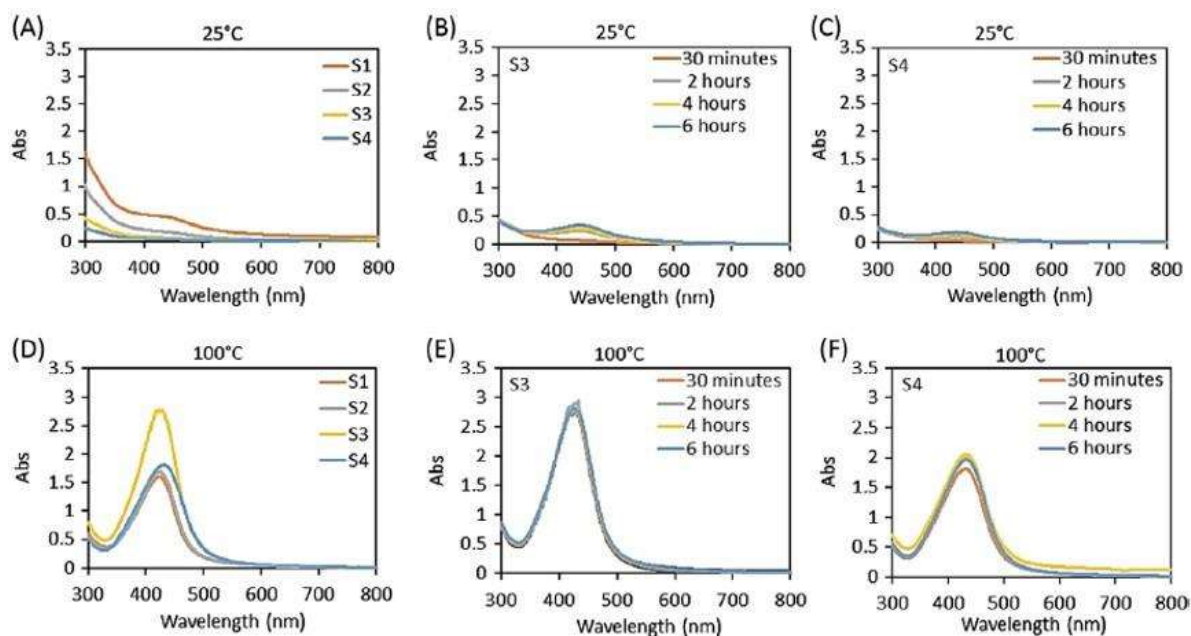
**Figura 2.9** Espectro de UV-Vis de nanopartículas de plata a) Efecto de concentración de la planta *Tamarix gallica* b) Efecto de la concentración de la sal precursora  $\text{AgNO}_3$  [40].

Por otro lado Chowdury y col. [41] utilizaron el extracto de la planta de cacao para la síntesis de nanopartículas de plata, esto se debe a que contiene una sustancia llamada ácido oxálico que es a la que se atribuye la reducción de la sal de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). La variación en las condiciones del proceso de esta síntesis fue por medio de la temperatura (25°C y 100°C), los tiempos de reacción (30 min-6 h) y una variación en la concentración de la sal  $\text{AgNO}_3$  con el extracto de cacao y viceversa. La Tabla 2.1 presenta las variaciones de sal y extracto de planta que se realizaron en el estudio mencionado, en el cual la letra L (Low temperature) significa las variaciones de la temperatura más baja (25°C) y H (High temperature) las variaciones de la temperatura más alta (100°C).

**Tabla 2.1** Síntesis verde de AgNPs con diferente cantidad de cacao y AgNO<sub>3</sub> [41].

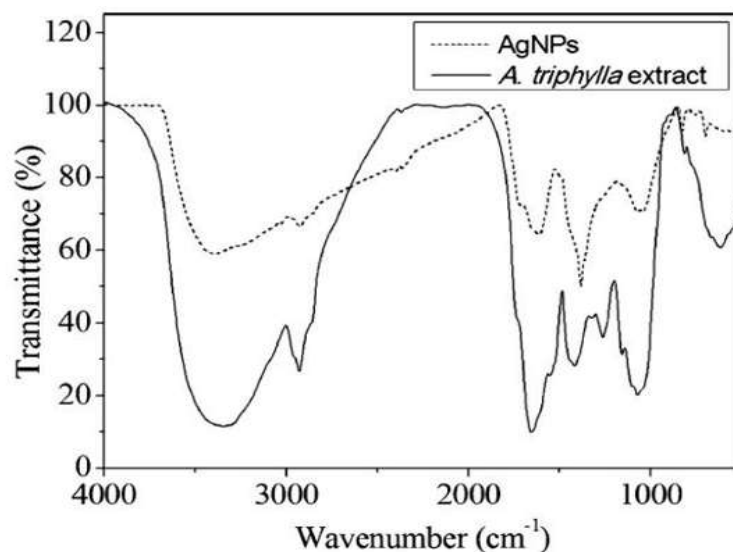
Muestra de AgNPs	Extracto de cacao (mg/ml)	Nitrato de plata (mg/ml)
S1H, S1L	50	0.25
S2H, S2L	25	0.25
S3H, S3L	50	0.5
S4H, S4L	25	0.5

En dicho estudio la caracterización de las AgNPs fue realizada por medio de espectroscopía UV-Vis, MET y dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), obteniendo partículas esféricas en un rango de tamaño comprendido entre (35- 42.5 nm). La Figura 2.10 muestra las bandas de absorción de UV-Vis correspondientes a las AgNPs de las condiciones mencionadas con anterioridad, observando que ninguno de los ensayos a temperatura de 25 °C y un tiempo de 30 minutos muestra un SPR significativo (Figura 2.10(a)). Por el contrario, para el caso de las muestras a una temperatura de 100 °C y un tiempo de 30 min (Figura 2.10(d)), se aprecia que todas las muestras presentan un SPR definido, lo que indica que la reacción es dependiente de la temperatura. A partir de los resultados arrojados se puede concluir que este factor favorece al proceso de nucleación y por lo tanto al número de NPs que se formaron. Con el fin de conocer el tiempo que dura la reacción de síntesis, la Figura 2.10 en los apartados (b, c, e y f) expone los espectros UV-Vis obtenidos a diferentes intervalos de tiempo de las muestras S3L, S4L, S3H y S4H. Los espectros de las NPs muestran picos desde los 30 min hasta 6 h después del inicio de la reacción, en donde los picos máximos de absorción de las soluciones no cambiaron con las horas extras a 25°C o 100°C, lo que indica que la reacción es completada en 30 minutos. Sin embargo, la reducción de la sal AgNO<sub>3</sub> aumentó con el incremento de la temperatura. El motivo de analizar las muestras S3 y S4 en sus respectivas condiciones fue que éstas dieron un mayor número de AgNPs acorde a la Ley de Beer-Lambert, en donde la máxima absorbancia es directamente proporcional a la concentración molar de las NPs en solución.



**Figura 2.10** Espectros de UV-Vis de AgNPs derivados de extractos de cacao A) Espectros de las muestras S1L, S2L, S3L y S4L registradas a 30 min a 25°C (B y C) Muestra S3L y S4L a 30 min, 2 h, 4 h y 6 h desde el inicio de la síntesis de AgNPs a 25°C, (D) Espectros de las muestras S1H, S2H, S3H y S4H registrados a un tiempo de 30 minutos con una temperatura de 100°C; (E y F) Muestra S3H y S4H a 30 min, 2 h, 4 h y 6 h desde el inicio de la síntesis de AgNPs a 100°C [41].

Una de las problemáticas del método verde es determinar los componentes presentes en la reducción-estabilización de las AgNPs. Por esta razón, diversos estudios se han encargado de demostrar que los principales compuestos que actúan en la reacción de síntesis de las NPs son los compuestos aromáticos, fenoles, flavonoides y terpenos. En un estudio López-Miranda y col. [42] realizaron el análisis de estos compuestos por medio de la espectroscopía de FT-IR y Raman. La Figura 2.11 muestra el análisis de FT-IR de la planta *Aloysia triphylla* y de la solución acuosa de nanopartículas de plata con el fin de determinar los compuestos involucrados en la síntesis. Se aprecia que hay un cambio en la intensidad, posición y formas de los picos en el extracto de la planta posterior a la reacción de síntesis, efecto que se atribuye a los compuestos directamente involucrados en la reducción y estabilización de las AgNPs. La Tabla 2.2 presenta la interpretación del espectro de acuerdo al número de bandas, grupos funcionales y compuestos involucrados. Se aprecia que los compuestos aromáticos, fenoles y carbohidratos actúan como agentes reductores. Para el caso de las amidas, éstas actúan como estabilizantes. Por otra parte, el decremento del pico correspondiente al C-Cl puede ser atribuido a la formación de AgCl.



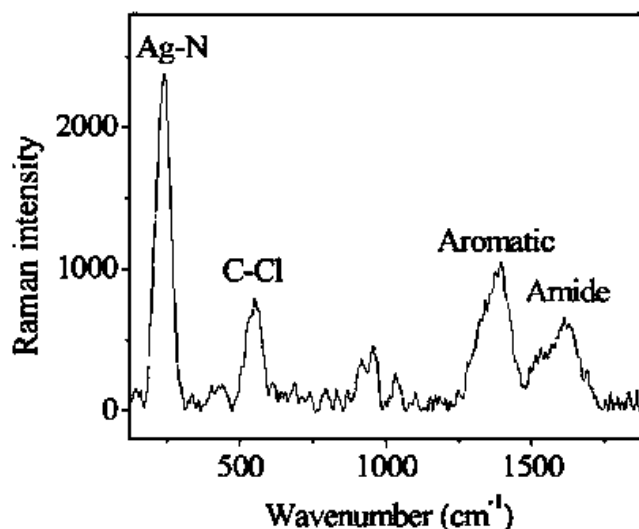
**Figura 2.11** Análisis FT-IR del extracto de la planta *Aloysia triphylla* y AgNPs [42].

**Tabla 2.2** Grupos funcionales involucrados en la síntesis de AgNPs [42]

Número de banda	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Compuestos
1	3343	O-H	Fenólicos
2	2924	C-H	Carbohidratos
3	1651	C=O	Amidas
4	1410	C=C	Compuestos aromáticos
5	1255	N-H	Amidas
6	1073	C-OH	Compuestos aromáticos
7	615	C-Cl	Halógenos

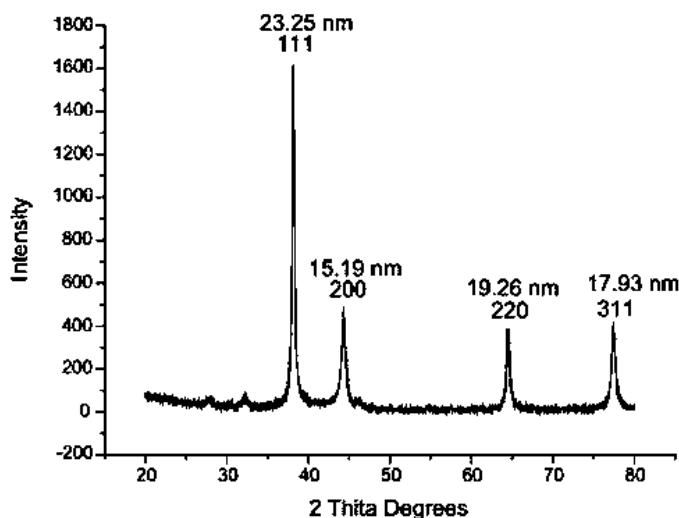
Otra técnica para el estudio de los compuestos involucrados en la síntesis es la espectroscopía Raman. Se debe tener en cuenta que Raman es una técnica complementaria muy importante con

FT-IR. De hecho, Raman es una técnica que da mejores resultados en el caso de soluciones acuosas. La Figura 2.12 muestra el espectro de Raman de las AgNPs sintetizadas con 5 ml del extracto de la planta *Aloysia triphylla*. Se puede apreciar una banda intensa a  $240\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a los enlaces Ag-N, en donde el nitrógeno puede provenir de las amidas presentes en el extracto asociadas al proceso de estabilización. Otra banda ubicada a  $550\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los enlaces C-Cl. Mientras que la banda a  $1380$  y  $1610\text{ cm}^{-1}$  representa los compuestos aromáticos y amidas, respectivamente. Las dos técnicas anteriores demuestran la implicación de amidas y compuestos aromáticos en el proceso de síntesis de nanopartículas.



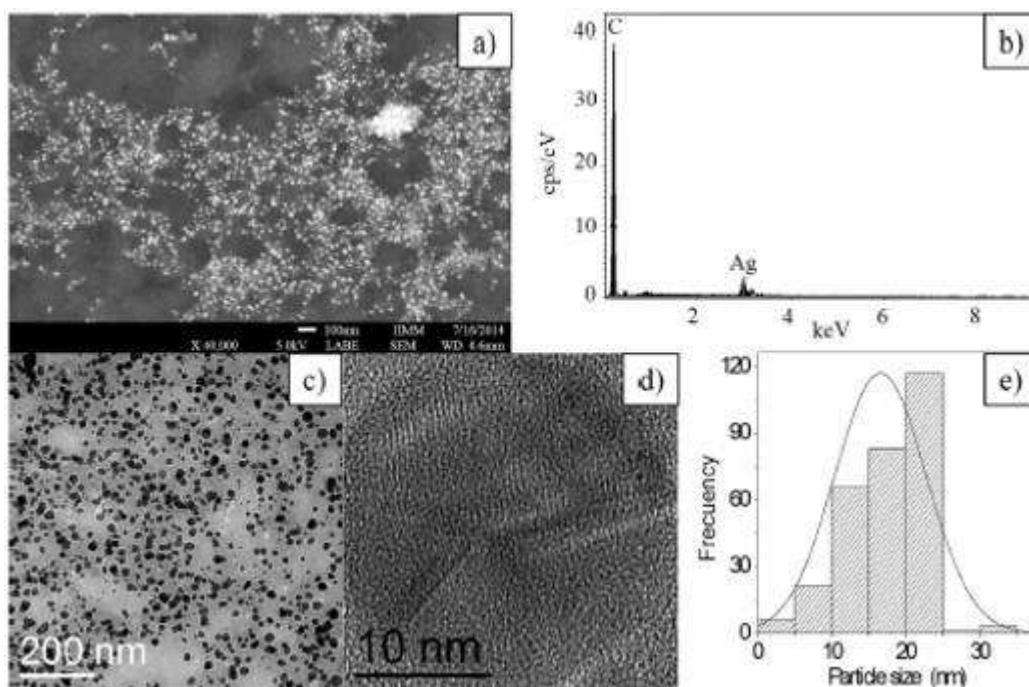
**Figura 2.12** Espectro Raman de AgNPs sintetizadas con extracto de planta *Aloysia triphylla* [42].

Las principales técnicas envueltas en la caracterización de las AgNPs son DRX, MEB y MET. Por medio de estas técnicas se puede conocer la distribución, forma, tamaño y composición de las nanopartículas. Un ejemplo de ello es el trabajo de Padalia y col. [43] en el cual caracterizan AgNPs a partir de la planta *Tagetes erecta* mejor conocida como cempasúchil. Con el fin de conocer la estructura y composición, se realizó la técnica de difracción de rayos X. La Figura 2.13 muestra 4 patrones correspondientes a las AgNPs que indican que su estructura cristalina es cúbica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés). Además, los valores de los picos de difracción a  $2\theta$  son:  $23.25$ ,  $15.19$ ,  $19.20$  y  $17.93^\circ$ , atribuidos a los índices (111), (200), (220), (311). Los valores fueron obtenidos de acuerdo al expediente No. 04-0783 del comité conjunto sobre normas de difracción de polvos (JCPDS).



**Figura 2.13** Espectro de Difracción de rayos X de AgNPs sintetizadas mediante el extracto de la planta *Tagetes erecta* [43].

Por otro lado, López-Miranda y col.[40] emplearon las microscopías electrónicas MEB y MET para analizar la morfología, el tamaño y la estructura de las nanopartículas. La Figura 2.14 en el panel (a) muestra una micrografía de MEB de las AgNPs sintetizadas por medio de la planta *Tamarix gálica* observando así una población densa de nanopartículas. Para el caso del panel (b) se observa la dispersión dada por el espectro de energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés) con una fluorescencia alrededor de 3.0 KeV que pertenece al elemento plata. El caso del panel (c) muestra la micrografía de MET en la cual se aprecia que las AgNPs tienen forma esférica, se encuentran bien dispersadas y no muestran señales de agregación, esto se debe a que la planta *Tamarix gálica* contiene sustancias estabilizantes que evitan la coalescencia de las nanopartículas. El panel (d) muestra una imagen de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés) de las nanopartículas obtenidas. La presencia de un plano de la red indica que las AgNPs son de naturaleza cristalina con estructura del tipo múltiple maclado (MTP, por sus siglas en inglés). De igual modo, se midieron las distancias interplanares y se encontró una distancia interplanar de 0.28 nm, la cual corresponde a los planos (200) de la estructura (FCC) cúbica centrada en las caras. Finalmente, el panel (e) ilustra la distribución de tamaños por medio de un histograma, analizando alrededor de 300 partículas para las cuales se obtuvo un rango de tamaño que va desde 4 a 40 nm con un diámetro promedio de 12 nm.



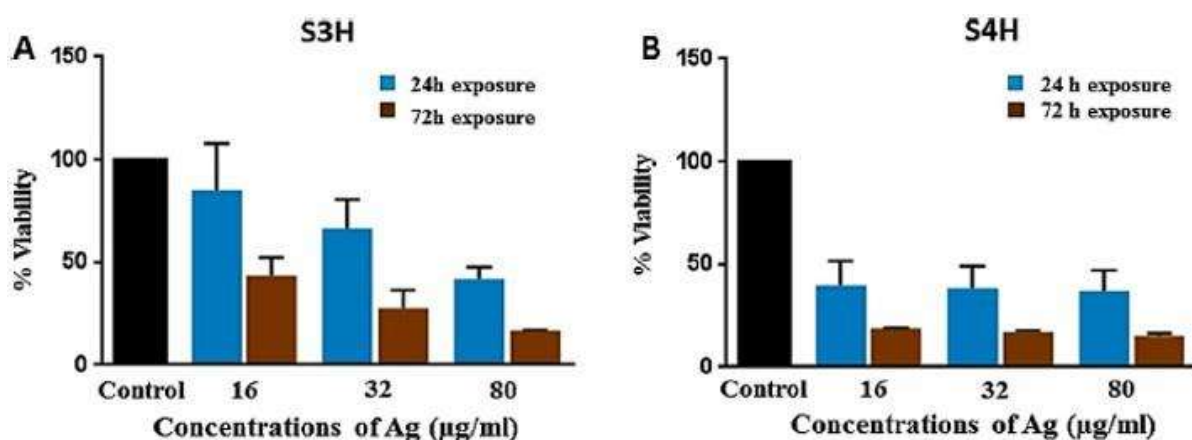
**Figura 2.14** Análisis de la microscopía electrónica de la síntesis de AgNPs mediante *Tamarix gálica*: a) Imagen de MEB, b) Análisis EDS, c) Micrografía de MET, d) Micrografía HRTEM, e) Análisis de la distribución de tamaño [40].

Es importante destacar que se han encontrado una gran variedad de aplicaciones en las AgNPs, por ejemplo, en áreas como la medicina, tratamiento de aguas residuales y área de alimentos. Esto se debe a que diversos estudios han sido enfocados a la actividad antibacterial de las nanopartículas. Además, debido a las aplicaciones médicas y al contacto diario con los seres humanos, ha sido importante evaluar su citotoxicidad.

Con el fin de evaluar la funcionalidad de las AgNPs Chowdhury y col. [41] realizaron ambos ensayos. El ensayo antimicrobiano fue por el método de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) y mínima concentración bactericida (MBC, por sus siglas en inglés), en el cual se usaron las bacterias *S. aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* y *P. aeruginosa*. Se reportó que el intervalo de MIC fue de 1-32  $\mu\text{g/ml}$ , lo que indica que se necesita por lo menos una concentración de 32  $\mu\text{g/ml}$  para limitar el crecimiento de las cepas anteriormente mencionadas, lo cual coincidió con la cantidad de nanopartículas reportadas por otros métodos.

Otro de los métodos importantes para medir la actividad antimicrobiana es el de difusión de disco, en el cual, lo que se evalúa es el diámetro de la zona de inhibición como en el caso de Taruna y col. [44] en el cual evaluaron las AgNps contra *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* obteniendo

diámetros de inhibición de hasta 11 mm. Finalmente, para evaluar la citotoxicidad Chowdhury y col. [41] utilizan el método de viabilidad celular en células primarias humanas. La Figura 2.15 muestra el porcentaje de disminución del metabolismo celular a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de las AgNPs para las muestras S3H y S4H. De manera contrastante, se aprecia que S4H inhibe el metabolismo celular de mejor manera a una concentración de 16  $\mu\text{g/ml}$  en comparación con S3H, esto puede ser atribuido a que la muestra S3H tiene mayor cantidad de extracto (ver Tabla 2.1) y puede favorecer a la resistencia de las células por los azúcares provenientes del extracto. Sin embargo, se necesitan estudios más específicos para determinar si daña o no a las células humanas.



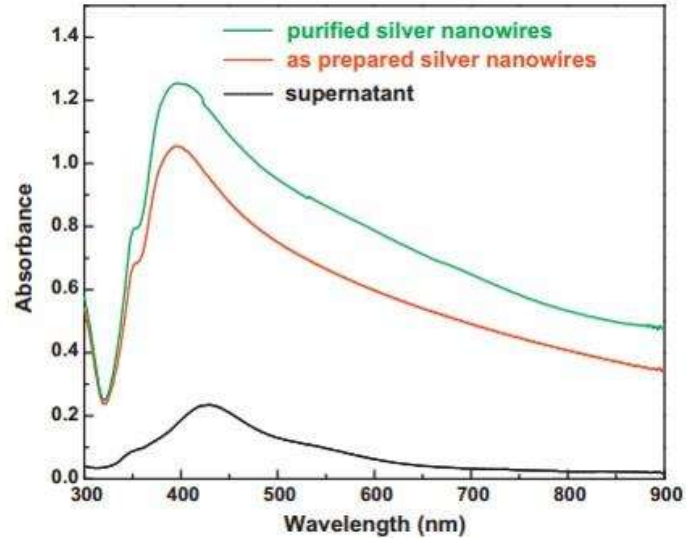
**Figura 2.15** Efecto de citotoxicidad de las AgNPs a diferentes concentraciones a partir del extracto de cacao a diferentes tiempos de exposición [41].

## 2.5 Síntesis de nanoalambres de Ag

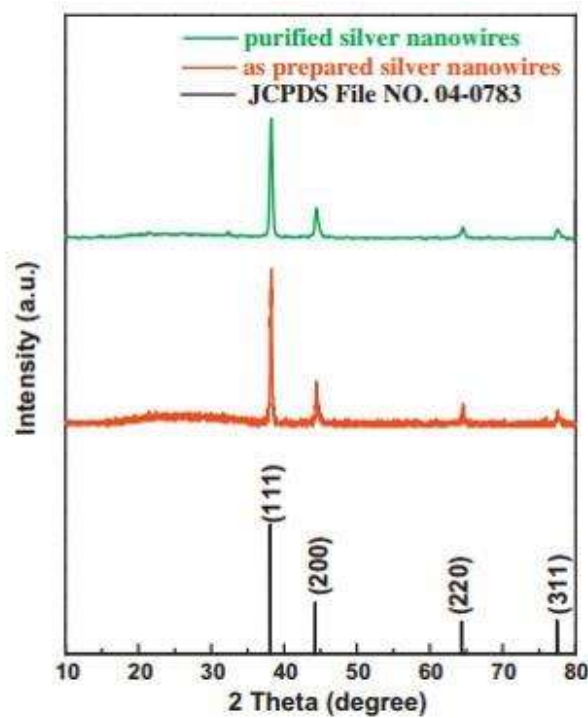
Los AgNWs han atraído el interés de investigadores en los ámbitos académicos e industriales debido a sus múltiples aplicaciones en aparatos electrónicos [18]. Hay diversas técnicas empleadas en la síntesis de los nanoalambres, incluyendo los métodos por medio de una vía química, siendo los más empleados [17]. Un ejemplo de lo mencionado con anterioridad es el trabajo realizado por Shobin y col., [45] en el cual sintetizan nanoalambres de plata mediante un método conocido como poliol, asistido por glicerol con ayuda de polivinilpirrolidona. El método consiste en preparar una solución transparente que tendrá la función de actuar como agente reductor y estabilizante compuesto por glicerol, PVP y NaCl a 80°C. Posteriormente, a la solución reductora-estabilizadora se le adiciona la sal precursora  $\text{AgNO}_3$ , empleando agitación y temperatura para la formación de los AgNWs. Finalmente, separan los nanoalambres mediante una bomba de vacío con una

membrana con poros de 300 nm para posteriormente conservarlos en etanol. Los nanoalambres fueron caracterizados por medio de diferentes técnicas como son: espectroscopía UV-Vis, MEB, MET y DRX. La Figura 2.16 muestra las bandas de absorción de los AgNWs preparados sin separación, con purificación y el sobrenadante del lavado. Se aprecia que el máximo en la banda de absorción de los AgNWs se encuentra aproximadamente a una longitud de onda de 400 nm coincidiendo con el rango de la plata comprendido entre (400-550) nm. En el caso del ancho de la banda se observa que éste incrementa en comparación a otros materiales nanoestructurados como el caso de las AgNPs, esto coincide con la teoría, ya que las nanoestructuras con mayor distribución de tamaños reflejan una banda más amplia. Por otro lado, la intensidad de la banda de los nanoalambres de plata purificados son los que presentan mayor intensidad, esto se debe a una mayor concentración de nanoalambres presentes en la solución. Además, la banda con menor intensidad corresponde al sobrenadante, que se interpreta como la disminución de los AgNWs causada por el método de separación; es importante mencionar que el método de separación que ellos emplean no es adecuado, ya que el sobrenadante contiene de manera significativa este nanomaterial. Otro de los aspectos a destacar son las pequeñas bandas mostradas a una longitud de onda de 352 nm, en donde los autores mencionan que corresponde a la formación de plata a granel, pero posiblemente pueda ser causado por productos residuales presentes en la reacción.

Otra de las técnicas de caracterización que emplearon fue difracción de rayos X. La Figura 2.17 presenta el difractograma de rayos X, en el cual se compara los AgNWs obtenidos sin separación, los nanoalambres purificados y los picos del archivo JCPDS estándar No. 04-0783. Se puede apreciar que los picos de las muestras obtenidas coinciden con aquellos mostrados en la tarjeta, confirmando así que los nanoalambres están formados por el elemento plata con un crecimiento preferencial en el plano cristalino (1 1 1).



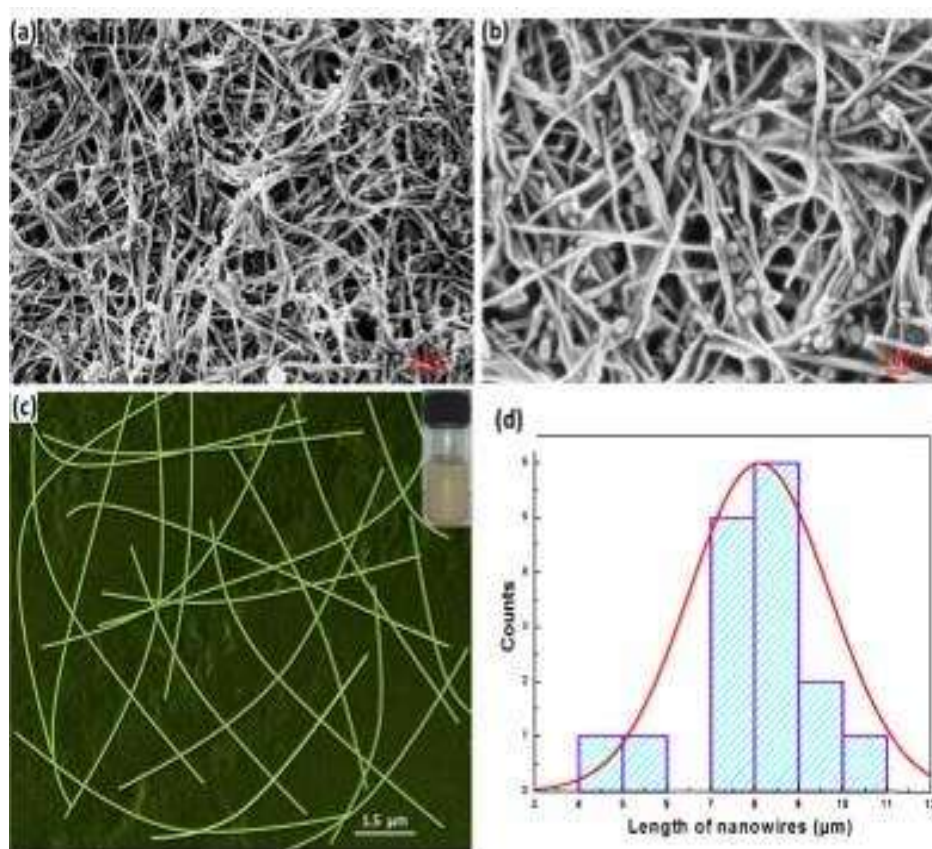
**Figura 2.16** Espectros de UV-Vis de los AgNWs purificados, obtenidos y el sobrenadante producto de la separación [45].



**Figura 2.17** Comparación de patrones de difracción AgNWs purificados, obtenidos sin separación y el archivo con número de tarjeta JCDPS NO. 04-0783 [45].

Posteriormente, emplearon MEB con la finalidad de observar de manera directa los AgNWs. La Figura 2.18 presenta 4 incisos en los cuales los paneles (a) y (b) corresponden a la muestra que obtuvieron sin proceso de separación, apreciando que obtuvieron una mezcla de AgNPs, AgNWs,

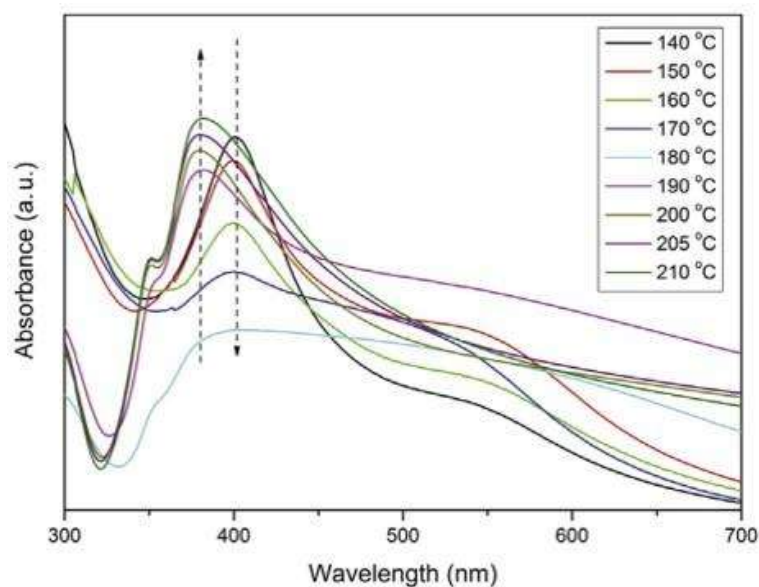
nanorodillos y estructuras de plata esféricas superiores a los 100 nm. Por otro lado, en el panel (c) se observan los AgNWs los cuales ya pasaron por el proceso de separación, cabe destacar que los nanoalambres fueron dispersados por medio de etanol y por esta razón se distinguen mayormente separados en comparación con las micrografías (a) y (b). Además, se analizó que el ancho promedio de los alambres fue de 70 nm y la longitud varío entre 7 y 12  $\mu\text{m}$ ; esto coincide perfectamente con la teoría que menciona que el largo en la relación de aspecto debe ser por lo menos 10 veces superior al ancho. Para corroborar lo mencionado con anterioridad, el panel (d) ejemplifica el perfil de longitud de los AgNWs purificados, apreciando que la mayor cantidad posee un tamaño comprendido entre 7-9  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.18** Imágenes de MEB de los AgNWs a), b) Sin separación, c) Purificados y d) Perfil de longitud de AgNWs purificados [45].

Otra de las investigaciones enfocadas en la síntesis de AgNWs es el trabajo realizado por Yang y col. [46] en el cual sintetizan los nanoalambres por medio del método del poliol con modificaciones que ellos denominan una vía verde. Una de las alternativas del método empleado fue por medio de la variación de la temperatura. La Figura 2.19, muestra los espectros de UV-Vis de los

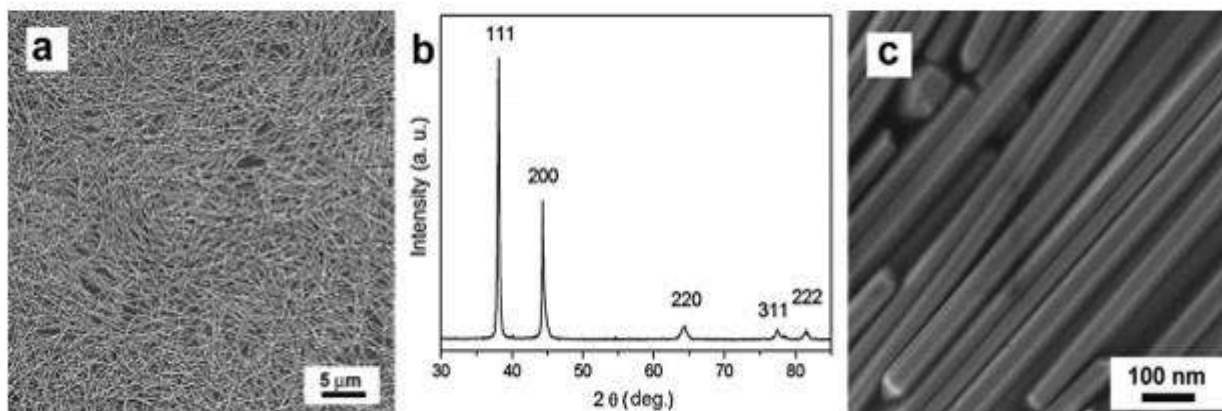
nanomateriales de plata sintetizados con variaciones de temperatura en un rango comprendido entre 140-210 °C. Cuando la temperatura es inferior a 180 °C, el máximo en la banda de absorción a una longitud de onda de 410 nm disminuye gradualmente con el incremento de la temperatura; este decremento en la resonancia de plasmón de superficie se relaciona con la formación de nanopartículas y nanoestructuras con relación de aspecto menor a 10, como es el caso de los nanorodillos. Cuando la temperatura de 180° C es incrementada, se produce una banda a una longitud de onda de 500 nm que puede ser interpretado como el crecimiento de los nanorodillos. Posteriormente, a una temperatura de 190 °C aparecen bandas a una longitud de onda de 350 nm, las cuales los autores lo atribuyen a la formación de los AgNWs, esto se contradice con lo presentado por Shobin y col. [45] en donde las bandas de absorción de los AgNWs son más anchas. Por esta razón, Yang y col. [46] comentan que los nanoalambres comienzan a crecer a 190 °C y terminan su crecimiento a una temperatura de 210 °C.



**Figura 2.19** Espectros de absorción de UV-Vis de formación de AgNWs con el incremento de la temperatura de reacción [46].

Posterior a la comprobación de la síntesis por medio de la espectroscopía UV-Vis, los nanoalambres sintetizados a una temperatura de 210 °C fueron observados por medio de MEB. La Figura 2.20 (a), presenta la micrografía de barrido de los nanoalambres preparados en la cual se observa una población densa y una distribución homogénea en la solución. Además, la Figura 2.20 (c), exhibe que los AgNWs sintetizados presentan un ancho con tamaño inferior a los 100 nm con

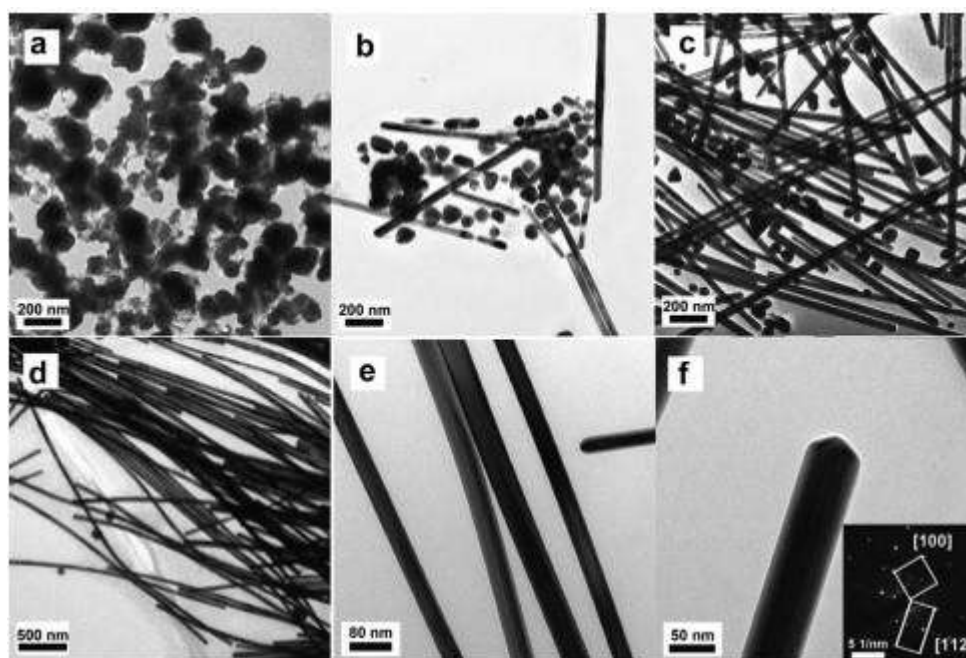
formas homogéneas y crecimiento en una sola dirección. Por otro lado, la Figura 2.20 (b), expone el difractograma de rayos X de la muestra preparada a una temperatura de 210 °C, en donde los picos de difracción a ángulos de 38.2, 44.3 y 64. 4° se les asignan los planos (1 1 1), (2 2 0) y (2 0 0) del cristal de Ag con número de tarjeta JCPDS 87-0717.



**Figura 2.20** Imágenes de AgNWs preparados a 210 °C a) Imagen de MEB, b) Patrón de DRX y c) Imagen de MEB magnificada [46].

La Figura 2.21 presenta las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la formación y crecimiento de los nanoalambres en diferentes etapas del proceso mediante el incremento de la temperatura. El apartado 2.21 (a) muestra el producto sólido que obtuvieron Yang y col. [46] a una temperatura de 140 °C; es notorio que presentan estructuras amorfas de plata superiores al rango nanométrico. Además, parte de la materia nubosa que se aprecia en la imagen anterior está relacionado con la formación de sólidos insolubles como es el AgCl, esto resulta indeseable debido a que los nanoalambres que presentan pueden ser una combinación de nanoalambres de plata y AgCl. El caso del apartado 2.21 (b) exhibe la imagen correspondiente a la reacción asistida a una temperatura de 170 °C, en donde se da el inicio de formación de nanopartículas y nanorodillos, en este caso los autores los denominan de plata, aunque como se mencionó con anterioridad podría ser una combinación de estructuras compuestas de Ag y AgCl. Además, el apartado 2.21 (c), expone la muestra a una temperatura de 190 °C en donde se observa un incremento notorio de los nanoalambres y un decremento de las nanopartículas denominadas de plata. Finalmente, el apartado 2.21 (d) muestra la etapa final de formación de los nanoalambres de plata a una temperatura de 210 °C, en el cual se aprecia un incremento en la cantidad de nanoalambres y un decremento en de las nanopartículas, siendo casi nula la cantidad que presentan los autores. Como complemento, el apartado 2.21 (e), muestra que efectivamente el ancho de las nanoestructuras que obtuvieron a una

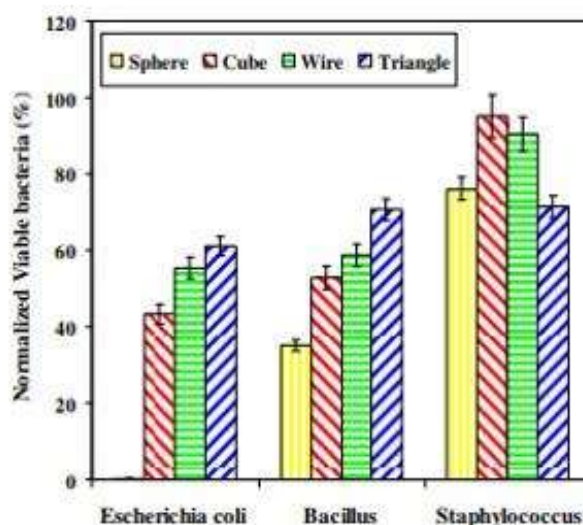
temperatura de 210 °C es inferior a los 100 nm, por lo cual se les puede denominar nanoalambres, ya que corresponden a las nanoestructuras 1D; por otro lado, la Figura 2.21 (f), exhibe el patrón de área selecta, el cual es indexado y comparado con DRX (Figura 2.20(b)), arrojando una estructura FCC del cristal de plata. Por lo tanto, el método de síntesis empleado por Yang y col. [46] proporciona la síntesis de nanoalambres sobre la dirección [1 1 1] del monocristal. Uno de los puntos a resaltar en éste trabajo es que a pesar de que Yang y col. [46] mencionan la presencia de estructuras con AgCl en alguna de las etapas de formación de los nanoalambres, éstas no fueron comprobadas por medio el patrón de difracción de rayos X, ni por medio del patrón de área selecta (SAED, por sus siglas en inglés); esto puede ser atribuido a que solo se analizó una punta única de un AgNWs.



**Figura 2.21** Imágenes de MET de los AgNWs producto de diferentes temperaturas de reacción a) 140° C, b) 170°C, c) 190°C, d) 210°C, e) morfología detallada de AgNWs y d) amplificación de la morfología detallada (recuadro: patrón de área selecta de una punta única del AgNW) [46].

Pocos son los estudios enfocados en las propiedades biológicas de los AgNWs, pero se ha demostrado que la actividad microbiana es dependiente de las formas de las nanoestructuras de plata. Ejemplo de lo anterior es el trabajo realizado por Ashkarran y col. [47], los cuales evalúan la actividad antibacteriana de cuatro formas distintas de plata en bacterias *E. coli*, *Bacillus* y *Staphylococcus*. La Figura 2.22, presenta la evaluación bactericida en los tres microorganismos mencionados con anterioridad de las distintas nanoestructuras de plata, siendo éstas: esferas, cubos,

alambres y triángulos. Se aprecia, que la plata con forma esférica exhibe la actividad antibacteriana más significativa en comparación con las otras estructuras presentadas en las bacterias *E. coli* y *Bacillus*. Esto se refleja en el gráfico como el valor más pequeño en el porcentaje de viabilidad, ya que cuando ésta disminuye, los procesos metabólicos no se llevan a cabo; por esta razón no se genera energía, lo que se traduce como muerte de la bacteria; esto es más notorio en el caso de la bacteria *E. coli* donde la viabilidad es nula, demostrando una gran eficacia de la plata en forma de esferas. En el caso de las estructuras cúbicas, triangulares y en forma de alambres, el comportamiento antimicrobiano fue más alto en bacterias *E. coli* y *Bacillus*, pero siendo inferior a la plata en forma de esferas. A manera de resumen es importante destacar que las bacterias del género *Staphylococcus* son las que presentaron mayor resistencia contra la plata en sus distintas formas. Por el contrario, la bacteria más susceptible fue *E. coli* cuando fue expuesta a plata en forma de esferas comprobando que la actividad antibacteriana si es dependiente de la forma.



**Figura 2.22** Relación de supervivencia de *E-coli*, *Bacillus* y *Staphylococcus* cultivados en presencia de nanoestructuras de plata con diversas formas [47].

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

La Figura 3.1 muestra un esquema general de la experimentación de la presente investigación. Primeramente, se adquirió la planta en un mercado local de la ciudad. Posteriormente, se prepararon los extractos y las soluciones molares de la sal de plata. Después, se evaluó el potencial antioxidante de la planta *Lavandula angustifolia* por medio del ensayo reductor DPPH\*. Además, se realizó la cuantificación total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu. Una vez preparadas las soluciones, se realizó la síntesis con el fin de obtener AgNPs y AgNWs. También, se caracterizaron por diversas técnicas para conocer el tamaño, forma y distribución de las nanopartículas. Finalmente, se evaluó la toxicidad de los nanomateriales obtenidos en mitocondrias de hígado de rata Wistar.



**Figura 3.1** Estrategia general del proceso de síntesis y evaluación de las propiedades biológicas de las nanopartículas y nanoalambres.

#### 3.1 Adquisición y molienda de la planta *Lavandula angustifolia*

La recolección de la hoja y tallo de la planta de lavanda se realizó en un mercado local de la ciudad de Morelia, Michoacán. Posteriormente, se sometió la planta a molienda mecánica en un molino de bolas de la marca SPEX 8000M Mixer/mil por un periodo de 7 minutos para finalmente, ser almacenado en un contenedor hermético. El propósito de la molienda fue incrementar el área superficial de la planta al momento de contacto con el líquido para permitir una mejor extracción de las sustancias presentes en la misma. Otra de las alternativas que se empleó fue la preparación del extracto a temperatura ambiente por un periodo de 10 minutos.

### 3.1.1 Preparación del extracto

Se tomaron 0.25, 0.5, 1, 2, 4 gr de la planta molida con anterioridad para ser colocados en vasos de precipitados con 100 ml de agua destilada o etanol absoluto de la marca Meyer, posteriormente, se extrajeron los compuestos provenientes de la planta elaborando una infusión. La finalidad de usar ambos solventes fue para realizar un comparativo de la síntesis e identificar cual presentó mejores resultados. Las soluciones fueron cubiertas con papel aluminio y se colocaron en un termoagitador de la marca Termo Scientific; programándose a una temperatura de 60 °C y temperatura ambiente con agitación de 10 STIR en un periodo de tiempo de 20 min. Finalmente, el extracto preparado fue filtrado mediante un papel filtro Whatman No.4 con tamaño de poro comprendido entre 20-25  $\mu\text{m}$ . Una alternativa en la preparación del extracto se realizó mediante la variación de la temperatura, la cual cambió de 60 °C a temperatura ambiente con un tiempo y velocidad de agitación de 10 min y 10 STIR respectivamente.

## 3.2 Análisis de la capacidad antioxidante y medición de fenoles de la planta *Lavandula angustifolia*

### 3.2.1 Ensayo de potencial reductor DPPH\*

El método de radical libre DPPH\* consiste en evaluar la actividad antioxidante de extractos vegetales y compuestos específicos con capacidad reductora usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de la marca Sigma-Aldrich con pureza del 97 % en solución etanólica [48]. La reducción del radical libre es monitoreada a través de la disminución de absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. La Figura 3.2 muestra la reacción de reducción que sufre el DPPH\* cuando entra en contacto con una sustancia que presenta capacidad antioxidante, causando un cambio de color en la solución que va del violeta al amarillo.

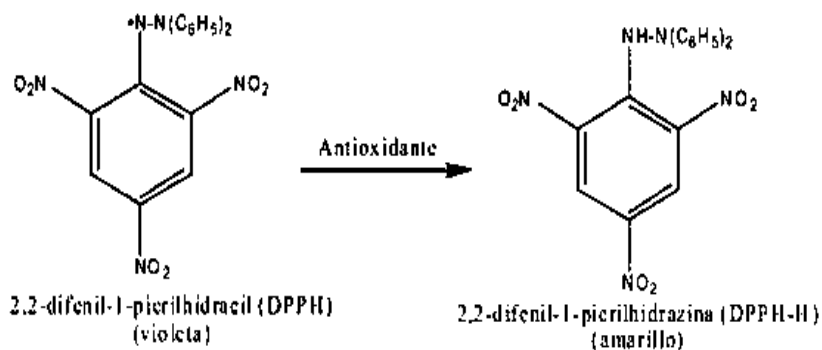


Figura 3.2 Reacción química entre el radical DPPH y la especie reactiva.

Se preparó una solución de DPPH\* en etanol a una concentración de 0.2 mM. Posteriormente, se mezcló 1 ml de la solución anterior con 100 µl de los extractos de plantas a las diferentes concentraciones (descritas en la Tabla 3.1) y 900 µl de agua desionizada. La mezcla se incubó por 30 minutos en ausencia de luz para finalmente ser analizada a la longitud de onda correspondiente. Es importante mencionar que se emplearon 100 µl del reactivo comercial butil-hidroxitolueno (BHT) de la marca Sigma-Aldrich con pureza del 99 % a una concentración de 10 mM con 900 µl de agua y 1 ml de DPPH\* como control positivo, de acuerdo al método realizado por Palomino y col. [49]. Por otro lado, se emplearon 100 µl de etanol, 900 µl de agua desionizada y 1 ml de DPPH\* como control negativo y 1 ml de agua desionizada con 1 ml de DPPH\* como sustancia de referencia. La captación de radical libre fue calculada mediante la (Ec. 1), en donde “A blanco” representa la absorbancia de la sustancia de referencia y “A muestra” corresponde la absorbancia de los diferentes extractos de planta.

$$\text{Captación de radical libre (\%)} = \frac{(A \text{ blanco}) - (A \text{ muestra})}{(A \text{ blanco})} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

**Tabla 3.1** Plantas y parámetros empleados en el ensayo de potencial reductor DPPH\*

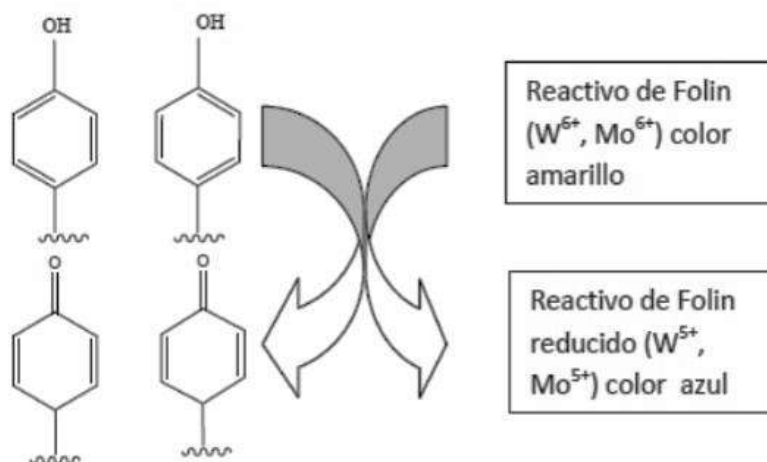
Nombre de la muestra	MUESTRA	Concentración (mg/l)	Temperatura (°C)
L1A	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.02	24
L1	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.02	60
L2	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.04	60
L3	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.06	60
SV1	<i>Sedum praealtum</i>	0.02	60
SV2	<i>Sedum praealtum</i>	0.04	60
SV3	<i>Sedum praealtum</i>	0.06	60

<b><i>O1</i></b>	<b><i>Origanum vulgare</i></b>	0.02	60
<b><i>O2</i></b>	<b><i>Origanum vulgare</i></b>	0.04	60
<b><i>O3</i></b>	<b><i>Origanum vulgare</i></b>	0.06	60

### 3.2.2 Método de Folin-Ciocalteu

Los fenoles son especies aromáticas constituidas principalmente por un anillo de benceno. Existen varios tipos de fenoles, los cuales son flavonas, taninos y antocianinas, pero si una sustancia posee más de un fenol, se denomina polifenol [50].

El ensayo de Folin-Ciocalteu es un método espectrofotométrico utilizado para la medida de compuestos fenólicos totales en productos vegetales usando el ácido gálico como material de referencia. La técnica se basa en la reacción de compuestos fenólicos con agentes oxidantes como es el caso del reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul que es determinada a una longitud de onda de 765 nm [51]. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico [52]. La Figura 3.3, muestra el mecanismo de acción del ensayo que consiste en un cambio de coloración de la solución que va del amarillo al azul, debido a la reacción de óxido-reducción de las sales contenidas en el reactivo hasta la formación de los complejos anteriormente mencionados [51].



**Figura 3.3** Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu [51]

Se prepararon soluciones de ácido gálico (marca Sigma-Aldrich con pureza 97.5 %) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (marca Caledon con pureza grado reactivo) a una concentración de 0.1 mg/ml y 0.7 M respectivamente de acuerdo a la metodología descrita por Ainsworth & Gillespie [53]. Primeramente, se realizó la curva de calibración de ácido gálico con el objetivo de obtener un patrón de referencia para la medida de los compuestos fenólicos. Para la curva patrón del ensayo de Folin-Ciocalteu, los volúmenes de ácido gálico empleados fueron 0, 25, 50, 100, 200 y 400 µl a una concentración de 0.1 mg/ml, aforándolos con agua desionizada hasta un volumen final de 500 µl, además se adicionaron 300 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (marca Sigma-Aldrich con pureza grado reactivo) y 1200 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a concentraciones de 10 % v/v y 0.7 M respectivamente. Las distintas soluciones fueron mezcladas en Vortex por 10 s, e incubadas en ausencia de luz por 2 h a temperatura ambiente, para, finalmente, ser analizadas por medio de espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 765 nm.

Por otro lado, se evaluaron 3 extractos de plantas a diferentes condiciones (ver Tabla 3.2). Para la preparación de las soluciones se mezclaron 100 µl del extracto de la planta sujeta a estudio, 400 µl de agua desionizada y 300 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu a una concentración 10% v/v en agua desionizada, por medio de Vortex durante un periodo de 10 s, posteriormente, se adicionó 1200 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se agitó nuevamente por 10 s en Vortex, para finalmente ser incubadas en ausencia de luz a temperatura ambiente por un periodo de 2 h. Las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 765 nm.

**Tabla 3.2** Condiciones experimentales de los extractos de plantas preparados en solución acuosa en el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Nombre de la planta	Concentración (mg/l)	Temperatura (°C)
<i>Lavandula angustifolia</i>	0.02	24
<i>Lavandula angustifolia</i>	0.02, 0.04 y 0.06	60
<i>Sedum prealtum</i>	0.02	60
<i>Origanum vulgare</i>	0.02	60

### **3.3 Síntesis de nanopartículas monometálicas de plata a partir del extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia***

La síntesis de AgNPs se llevó a cabo por medio de la reacción del extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia* preparado a 60 °C, una concentración de 0.01 g/ml y variación de la sal precursora AgNO<sub>3</sub> con una pureza del 98 % de la marca Sigma-Aldrich en concentraciones de (1, 2, 3, 4 y 5 mM).

Se realizaron dos ensayos complementarios para mejorar la síntesis de la muestra 5 mM. La primera variación se denominó 5 mM “A”. Se empleó el extracto preparado a temperatura ambiente con una concentración de sal de precursora de 5 mM, por un periodo de 10 min. Además, la dosificación de la sal fue por medio de una bureta de titulación por 20 min y se agitó la muestra por 105 min a una velocidad de 5 STIR, hasta la aparición de un color negro en la solución para ser analizada inmediatamente por medio de la espectroscopía UV-Vis.

Para el caso de 5 mM “B” se mantuvo constante la concentración de la sal precursora AgNO<sub>3</sub>, y se varió la dosificación, siendo ésta de 10 minutos. Posteriormente, la muestra se agitó por 22 h a una velocidad de 2 STIR.

#### **3.3.1 Eliminación del ion Cl**

Con la finalidad de eliminar el ion Cl presente en el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, esta se sometió a lavado en agua destilada. Primeramente, se tomaron 2 gr de planta seca y molida y se colocaron en un vaso de precipitados con 100 ml de agua destilada para ser lavados por medio de agitación a temperatura ambiente, por un periodo de 10 min a una velocidad de agitación de 6 STIR. Posteriormente, se recuperó la planta para ser sometida a secado y lavado nuevamente. El proceso anterior se repitió para 2 gr de la planta lavada y secada a temperatura ambiente. Finalmente, se recuperó el polvo de la planta para ser usado en el proceso de síntesis.

### **3.4 Síntesis de nanoalambres de plata por medio del extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia***

Para el ensayo de formación de AgNWs se preparó extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia* a una concentración de 0.01 g/ml a temperatura ambiente. Primeramente, se adicionó la sal precursora CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O hasta una concentración final de 5 mM, 24 h después se adicionó la sal precursora AgNO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 5 mM, posterior al cambio de color la

muestra se sometió a centrifugado a 12 000 rpm por un tiempo de 30 min en una microcentrífuga de la marca Premiere con un rango de operación comprendido entre 1000-12000 rpm. El proceso anterior se realizó por duplicado e inmediatamente se analizó por medio de la espectroscopía UV-Vis.

### **3.5 Estimación de la concentración de las AgNPs y AgNWs por medio de espectroscopía de absorción atómica.**

Se empleó un espectrómetro de absorción atómica de la marca Perkin Elmer modelo 3100 con la finalidad de conocer la concentración y el rendimiento porcentual de la reacción de síntesis de los nanomateriales. El primer paso consistió en la obtención de una curva patrón a partir de un estándar de plata de la marca Perkin Elmer grado puro. Posteriormente, las muestras de AgNPs y AgNWs a concentración final de sal precursora de 5 mM fueron lavados por medio de un proceso de centrifugación, hasta la obtención del sobrenadante (solución donde se encuentran los iones de Ag sin reaccionar). Finalmente, se analizaron los valores de absorbancia de los sobrenadantes correspondientes a AgNWs, AgNPs y la solución AgNO<sub>3</sub> (5 mM). Mediante la curva patrón se les asignó un valor en concentración; por lo tanto, la diferencia entre los iones de Ag iniciales y los restantes en las soluciones lavadas resultó ser proporcional a la cantidad de iones reducidos a sólidos de plata. El rendimiento porcentual fue calculado de acuerdo por medio de la (Ec. 2), en donde *Agsal* representa la cantidad de iones de plata presentes en la sal precursora AgNO<sub>3</sub> a una concentración de 5 mM, mientras que *Agsobrenadante* corresponde a las soluciones lavadas de los AgNWs y AgNPs.

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{Agsal - Agsobrenadante}{Agsal} * 100 \quad (\text{Ec.2})$$

### **3.6 Caracterización de los nanomateriales**

Las diferentes técnicas estructurales empleadas fueron: espectroscopía UV-Vis, espectroscopía FT-IR, MEB, DRX y MET.

Se confirmó por medio de espectroscopía UV-Vis la síntesis de los nanomateriales, observando el comportamiento de las variables presentadas en los objetivos. Cada espectro fue calibrado a partir de una sustancia de referencia (agua destilada, etanol y extracto de la planta *Lavandula angustifolia*), con el objetivo de garantizar que las muestras espectrales del estudio no estuvieran

alteradas por el medio de dispersión. Los análisis de esta técnica fueron obtenidos con un equipo Ocean Optics USB-4000.

La espectroscopía de infrarrojo corroboró los compuestos involucrados en la síntesis de los nanomateriales, ya que, se ha reportado que la reducción y estabilización se debe a compuestos aromáticos, fenoles, carbohidratos y flavonoides. Primeramente, se secaron las soluciones que contenían el extracto puro de la planta *Lavandula angustifolia* y las AgNPs respectivamente. Posteriormente, se elaboraron pastillas compactas de las muestras con la sal KBr para espectrofotometría de infrarrojo de la marca Sigma-Aldrich. Las muestras fueron estudiadas en el equipo Bruker Tensor 27.

Con ayuda de la técnica MEB por medio del equipo Jeol JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope se observó el tamaño y dispersión de los AgNWs y AgNPs. Además, se realizó el análisis químico puntual (EDS) y mapeo químico para identificar la presencia del elemento de interés, siendo Ag para este trabajo. La preparación se efectuó colocando una gota de las soluciones en una cinta de carbono, para evitar el desprendimiento de las partículas.

A través de un equipo de difracción de rayos X D8 Advance, DAVINCI se determinó la estructura cristalina de los nanomateriales sintetizados. Las muestras se colocaron en un horno de secado a 45 °C, con el objetivo de obtener los polvos que se caracterizaron por medio de la técnica instrumental DRX. Se colocaron en un portamuestra de vidrio esmerilado los polvos que contenían los AgNWs y AgNPs, analizándolos en un rango angular comprendido entre 20-85 ° empleando un tiempo de 0.6 s y un incremento de 0.02 °. También, como complemento se analizó el polvo de la planta *Lavandula angustifolia* para determinar la presencia de compuestos orgánicos y sales contenidas en ésta.

Finalmente, se empleó MET por su gran capacidad de resolución, ya que, ésta técnica permite observar imágenes que reflejan claramente la morfología, tamaño y estructura de las AgNPs y AgNWs sintetizados. Se prepararon las muestras mediante la adición de una gota de las soluciones líquidas en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro cubiertas con una película de carbón amorfo, posteriormente, se secó la gota y se analizaron a través de diferentes técnicas. Para el caso de las AgNPs se realizaron imágenes de campo claro y de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés), en un microscopio electrónico de transmisión de la marca Phillips Tecnai F20. Se

analizaron los AgNWs por medio de imágenes de campo claro, campo oscuro, alta resolución, por contraste de masa (HAADF, por sus siglas en inglés) en un equipo Phillips Tecnai F20. Como complemento, se realizó análisis químico puntual y mapeo químico elemental de los AgNWs en un microscopio electrónico de transmisión con corrección por aberración Cs de la marca JEM-ARM200F, Atomic Resolution Analytical Microscope.

### **3.7 Ensayos biológicos de toxicidad**

Para el enfoque de este trabajo, se emplearon mitocondrias de hígado de rata con la finalidad de evaluar la toxicidad los nanomateriales sintetizados en el presente trabajo. Posterior al proceso de síntesis de las AgNPs y AgNWs por medio de la metodología presentada con anterioridad, se analizó la toxicidad de forma *in vitro* en mitocondrias de hígado de rata. La metodología que se llevó a cabo en estos ensayos fue la modificada por Saavedra-Molina y col. [54]. Además, es importante mencionar que todos los reactivos empleados en los ensayos son de la marca Sigma-Aldrich con pureza grado reactivo.

#### **3.7.1 Extracción de la mitocondria**

Primeramente, se adquirió una rata Wistar de aproximadamente 200 g de peso con la finalidad de obtener las mitocondrias de su hígado, se adaptaron durante 7 días en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) en cajas de acrílico a temperatura controlada con ciclos de 12 h luz/oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*, bajo los lineamientos del Comité de Bioética del IIQB, y siguiendo las recomendaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO” de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [55]. Subsecuentemente, se decapitó y se realizó una incisión en el abdomen con ayuda de un bisturí quirúrgico para extraer el hígado, se colocó en un vaso de precipitados con 25 ml de medio 1 (Tabla 3.3) para ser lavado 2 veces. Después, se cortó en pedazos más pequeños y nuevamente fue lavado en dos ocasiones con el medio 1 (ver tabla 3.3), para ser colocado en un tubo potter con la finalidad de homogeneizar los 4 lóbulos del hígado. Posteriormente, la muestra fue colocada en una centrífuga por un periodo de 10 min a 2000 rpm y temperatura de 4°C, con el propósito de desechar los orgánulos más pesados como núcleo, pared celular, entre otros. Por esta razón, se tomó el sobrenadante que resultó del proceso de centrifugación y se le adicionó mayor cantidad de medio 1, para obtener un volumen superior y

eliminar gran cantidad de residuos. Se centrifugó nuevamente a 7000 rpm por un periodo de tiempo de 10 min y 4°C, en esta ocasión, se recuperó el precipitado y se le adicionaron 2 ml del medio 2 (ver Tabla 3.4) con la intención de eliminar el ácido etilenglicol bis (2-aminoetil éter) tetra acético (EGTA) y conservar las mitocondrias, después, se añadieron 198 µl de albumina 0.2% en peso. Es importante mencionar que se adicionaron 80 µl por 1 ml del medio 2 y se continuó con el proceso de centrifugación, siendo en esta ocasión a 9000 rpm, por un periodo de tiempo de 10 min y temperatura de 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio 2 para poder ser usada solo por un tiempo posterior de 5 h.

**Tabla 3.3** Reactivos que integran el Medio 1. EGTA se disolvió previamente en NaOH y finalmente la solución se reguló a pH 7.4 [54].

Compuesto	P.M. (g/mol)	Concentración (mM)	Cantidad (g/L)
Manitol	182.2	220	40.084
Sacarosa	342.3	70	23.961
Mops*	209.3	2	0.4186
EGTA	380.4	1	0,3404

\*Mops (ácido 3-(n-Morfolino)-Propanosulfónico - Ácido 4-Morfolinopropanosulfónico).

\*EGTA (Ácido etilenglicol bis (2-aminoetil éter) tetra acético)

**Tabla 3.4** Reactivos que integran el Medio 2. La solución final se regula a pH 7.4 [54].

Compuesto	P.M.(g/mol)	Concentración (mM)	Cantidad (g/L)
Manitol	182.2	220	40.084
Sacarosa	342.3	70	23.961
Mops*	209.3	2	0.4186

### 3.7.2 Determinación de proteínas por el método de Biuret

El método de Biuret es la técnica más simple para la determinación de proteínas solubles. Las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo púrpura-violeta con sales de cobre (II). Este complejo, es desarrollado posiblemente por la formación de un ion coordinado, tetracúprico, con dos grupos de amidas adyacentes [56]. Es importante mencionar que el cambio de color es diferente para cada proteína y su intensidad se determina por medio de la espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm. La cuantificación de la proteína se lleva a cabo con una curva patrón de albumina bovina a una concentración de 0.01 g/ml. La Tabla 3.5 muestra los parámetros empleados, en el método de Biuret, para la curva patrón y mitocondrias. Por otra parte, el reactivo de Biuret fue preparado con los contenidos descritos en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.5** Diseño de experimentos del método de Biuret [54].

Muestra	Reactivo de Biuret (ml)	Agua ( $\mu$ l)	DOC 1 % ( $\mu$ l)	Mitocondrias o albumina ( $\mu$ l)
1	2	800	200	-
2	2	750	200	50
3	2	700	200	100
4	2	600	200	200
5	2	400	200	400
Ensayo 1	2	790	200	10

**Tabla 3.6** Reactivos de preparación del método de Biuret [54].

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tartrato de sodio y potasio (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	-	6 g
Sulfato de cobre pentahidratado	-	1.5 g
Hidróxido de sodio	10 %	30 g en 300 mL de agua desionizada
DOC*	1 %	1 g en 100 mL
Albúmina bovina	10 mg/mL	-

\***Buffer DOC (Desoxicolato de sodio).**

### ***3.7.3 Mediciones del potencial de membrana mitocondrial***

La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena transportadora es usada para bombear iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal [57]. Esta diferencia de potencial se le denomina potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). La diferencia de potencial es de 100 mV o más, a través de la membrana de mitocondrias energizadas, con el interior negativo respecto al exterior. Cabe destacar que el ( $\Delta\Psi_m$ ) desaparece cuando el metabolismo energético también desaparece [58]. El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se midió espectrofluorométricamente utilizando safranina 0.3  $\mu$ M y 0.5 mg/ml de proteína de mitocondrias frescas de hígado de rata. La mezcla anterior fue suspendida en un volumen final de 3 ml de buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM). La fluorescencia basal se monitoreó durante 60 segundos. Posteriormente, las mitocondrias se energizaron con succinato 10 mM, y se midió el cambio de fluorescencia tras su adición durante un periodo de tiempo de 3 min y después se añadió carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) para abatir el potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ), debido a que es un inhibidor de la fosforilación oxidativa.

En el caso de la evaluación de los nanomateriales y la sal  $\text{AgNO}_3$  el proceso de adición fue similar al descrito para las mitocondrias sin exposición alguna. El proceso consistió en la resuspensión de 1 mg/ml de mitocondrias frescas en buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM), además, a la mezcla anterior se le añadió 12.5, 25, 50 y 100 ppm (equivalentes a 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 g/L, respectivamente) de las distintas soluciones acuosas ( $\text{AgNPs}$ ,  $\text{AgNWs}$  y  $\text{AgNO}_3$ ) para el análisis de cada uno de los ensayos.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

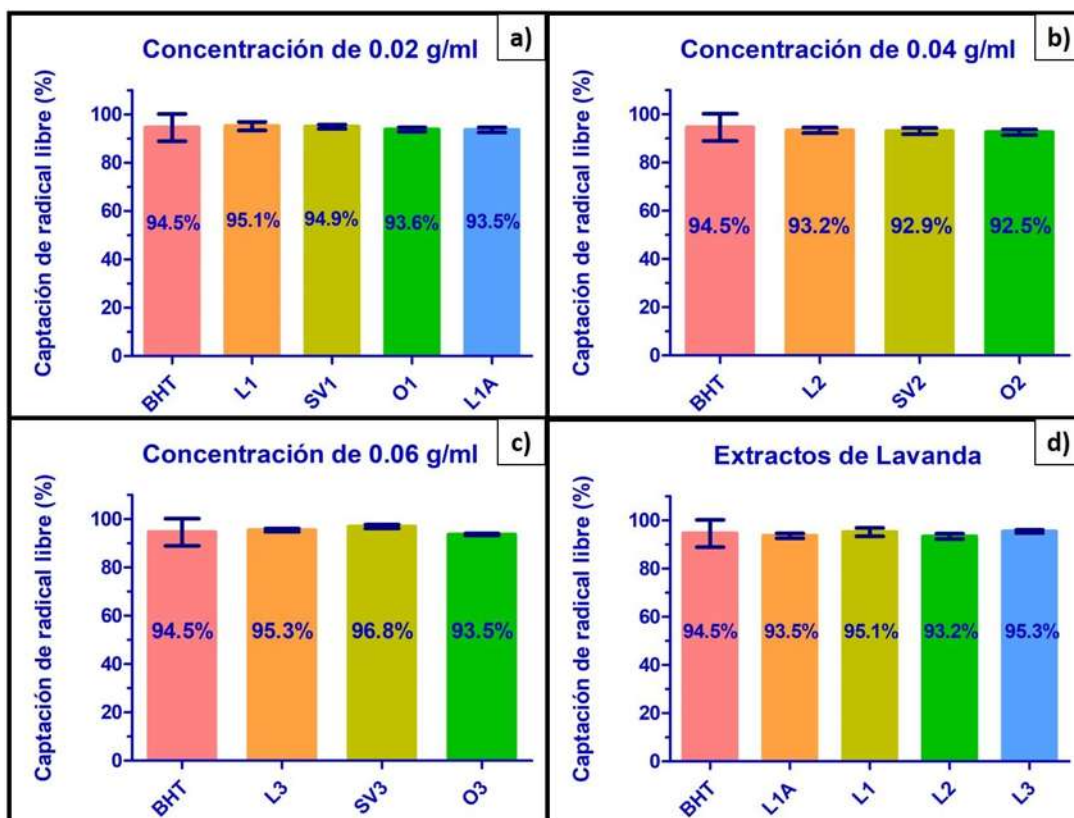
En esta sección se presentan los resultados correspondientes a las distintas estrategias de síntesis empleadas en la formación de nanopartículas monometálicas de plata, así como nanoalambres de plata a partir del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. Primeramente, se muestra el comparativo del potencial reductor y la cuantificación de fenoles de la planta *Lavandula angustifolia*, por medio del ensayo de potencial reductor (DPPH) y el método de Folin-Ciocalteu respectivamente, con el objetivo de justificar el empleo de esta planta. Además, se anexa la caracterización morfológica y estructural de las nanoestructuras de plata sintetizadas. Finalmente, se incluye el análisis toxicológico de las AgNPs y AgNWs en mitocondrias de hígado de rata Wistar por medio del ensayo de potencial de membrana.

#### 4.1 Determinación del potencial antioxidante por medio del ensayo DPPH\*

El ensayo de potencial reductor DPPH\* se realizó con la finalidad de conocer la actividad antioxidante del extracto de las plantas *Lavandula angustifolia*, *Sedum prealtum* y *Origanum vulgare* a diferentes concentraciones. El ensayo fue monitoreado por un cambio de color que va del morado al amarillo, que es indicativo del radical reducido y estable. La reacción es dependiente de la capacidad de donación del par electrón-protón de compuestos antioxidantes [48]. Además, la capacidad reductora se comparó con el reactivo antioxidante comercial butil hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 0.22 g/ml (10 mM).

La Figura 4.1, presenta los ensayos de potencial reductor de las plantas mencionadas con anterioridad. En la Figura 4.1(a), se exhibe el comparativo de las plantas *Lavandula angustifolia*, *Sedum prealtum* y *Origanum vulgare* a una concentración de 0.02 g/ml, en la cual se aprecia una capacidad antioxidante similar por encima del 90% en la mayoría de los casos. Para el caso de la muestra L1, que corresponde a la planta *Lavandula angustifolia* preparada a 60°C, se presenta el mayor porcentaje de capacidad antioxidante, incluso por encima del control BHT, siendo su porcentaje de captación de radical libre de 95.11 %. Por otra parte, el extracto de lavanda que fue preparado a temperatura ambiente presentó un porcentaje de captación del radical libre del 93.52 %, concluyendo, que, sin el empleo de temperatura, la extracción de los compuestos reductores es adecuada para el proceso de formación de las nanoestructuras de plata. Además, en la Figura 4.1

(b), se da a conocer el comparativo de las plantas *Lavandula angustifolia*, *Sedum prealtum* y *Origanum vulgare* a una concentración de 0.04 g/ml. En este caso, el porcentaje mayor de capacidad antioxidante correspondió al reactivo comercial BHT, siendo éste del 94.55 %. Aunque, fue la planta *Lavandula angustifolia* la que conservó el porcentaje más alto (93.28 %), en comparación con *Sedum prealtum* y *Origanum vulgare* que presentaron el 92.99 % y 92.51 %, respectivamente. También, la Figura 4.1 (c), ejemplifica el porcentaje de reducción del radical libre DPPH\* para una concentración de 0.06 g/ml, en el cual, el mayor porcentaje obtenido fue el de la planta *Sedum prealtum*, siendo de 96.88 %, posteriormente, sigue la planta *Lavandula angustifolia* con 95.38, el control BHT con 95.55 % y *Origanum vulgare* con 93.58 %. Finalmente, la Figura 4.1 (d), presenta en manera de resumen el comparativo de las distintas concentraciones de la planta *Lavandula angustifolia*. Se identificó que la máxima capacidad de captación fue registrada para la muestra que presentó la concentración más alta, siendo 0.06 g/ml, sin embargo, las concentraciones a 0.02 g/ml preparadas a temperatura ambiente y 60°C, mostraron un porcentaje de captación de radical libre similar a la mayor; por esta razón, se eligió la concentración de 0.02 g/ml como la inicial para la síntesis de los nanomateriales en los distintos ensayos. También, se observó que la concentración no está asociada proporcionalmente a la capacidad antioxidante. Otro detalle a resaltar, es que este ensayo solo es indicativo en específico de la capacidad reductora de los extractos sobre el radical DPPH\*, esto quiere decir que, en la reacción de óxido-reducción pueden estar involucrados otros factores como la afinidad de estos compuestos reductores hacia ciertos metales [59, 60].

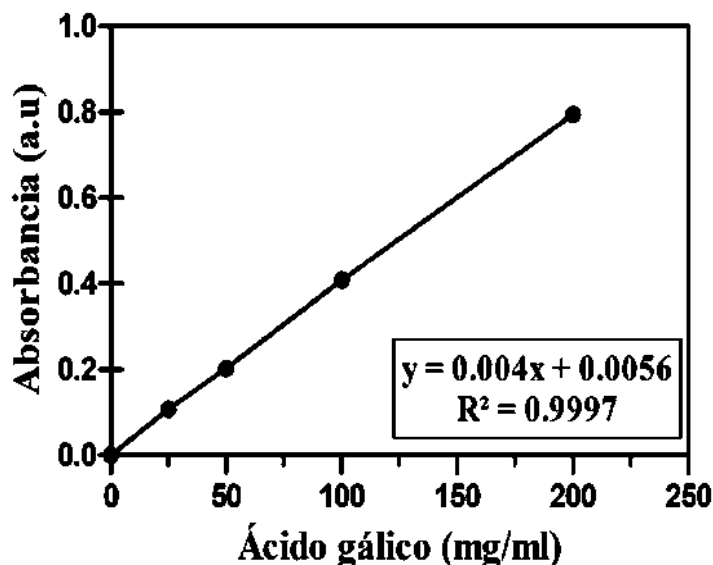


**Figura 4.1** Ensayo de potencial antioxidante de las distintas plantas estudiadas a) Concentración 0.02 g/ml, b) Concentración 0.04 g/ml, c) Concentración 0.06 g/ml y d) Comparativo de las diferentes concentraciones de la planta *Lavandula angustifolia*.

#### 4.2 Cuantificación de fenoles por medio del método de Folin-Ciocalteu

Con el objetivo de conocer la actividad de los compuestos involucrados en la reducción y estabilización de las AgNPs y AgNWs, se realizó la cuantificación de fenoles del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* a tres concentraciones diferentes, siendo éstas: 0.02 g/ml, 0.04 g/ml y 0.06 g/ml. También, se realizó la cuantificación para los extractos de las plantas *Origanum vulgare* y *Sedum prealtum* a concentración de 0.02 g/ml, con el propósito de realizar un comparativo de las tres plantas y poder asociar la función de estos compuestos en el proceso de formación de los nanomateriales. Se eligieron como comparativos, las plantas *Origanum vulgare* y *Sedum prealtum* a la misma concentración de 0.02 g/ml, de acuerdo a los mismos criterios mencionados en el apartado del ensayo reductor DPPH\*, en el cual se analizó que la concentración presentaba un potencial reductor similar a las concentraciones de 0.06 g/ml.

Los resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu de las plantas bajo estudio se calcularon a partir de la curva estándar de ácido gálico (ver Figura 4.2), y los valores expresados como mg AGE (ácido gálico equivalente) por mg de extracto seco se presentan en la Tabla 4.1.



**Figura 4.2** Curva patrón de ácido gálico para cálculo de la cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu.

La cantidad de fenoles equivalentes de las muestras analizadas son expresados en la Tabla 4.1. El primer resultado del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* se denominó L1A y corresponde al extracto preparado a temperatura ambiente y concentración de 0.02 g/ml, se puede apreciar que su valor en mg AGE (ácido gálico equivalente) por mg de extracto seco es similar a la infusión que se preparó a 60°C con la misma concentración, concluyendo así, que no es necesario el empleo de la temperatura para la preparación de la infusión en el caso de la planta *Lavandula angustifolia*. Para el caso, L2 y L3, que representan los extractos preparados a temperatura de 60 °C y concentración de 0.04 y 0.06 g/ml respectivamente, es notorio que la cantidad de mg AGE (ácido gálico equivalente) por mg de extracto seco incrementó a medida que la concentración del extracto de planta aumentó, siendo la muestra L3 la que presentó la cantidad mayor, esto es razonable, ya que la prueba se encarga de cuantificar fenoles de manera general, esto significa que los valores presentados contienen los agentes reductores y estabilizantes. Además, se presentan los resultados de las muestras O1 y SV1 que corresponden a las plantas *Origanum vulgare* y *Sedum preaultum* a concentración de 0.02 g/ml, respectivamente. El valor mayor en cantidad de mg AGE (ácido gálico equivalente) por mg de extracto seco se observó para la muestra O1, demostrando que posee una

cantidad similar de fenoles que la muestra L2. Lo más importante a resaltar de ésta muestra es, que, en el ensayo de potencial reductor, fue de las que presentó menor capacidad reductora, esto se atribuye a que la mayoría de los fenoles que posee son agentes estabilizantes y no reductores. Para el caso de SV1 ocurrió un fenómeno contrario al de la planta *Origanum vulgare*, ya que su valor en mg AGE (ácido gálico equivalente) por mg de extracto seco es muy bajo en comparación con las plantas bajo estudio, pero presenta una capacidad reductora similar a la planta *Lavandula angustifolia*.

Por lo tanto, se puede concluir de ambos ensayos, que las infusiones de planta *Lavandula angustifolia* preparadas a las dos temperaturas y concentración de 0.02 g/ml fueron las que presentaron valores más equilibrados, ya que, la planta posee compuestos que actúan de manera equitativa como agentes reductores y estabilizadores. Sin embargo, la planta *Origanum vulgare* no presentó la capacidad reductora más alta, pero si contiene mayor contenido de fenoles para una concentración de 0.02 g/ml en comparación con las otras plantas sujetas a estudio, por lo cual el caso de la estabilización es un fenómeno diferente que no se asocia a la cantidad de compuestos reductores, de acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 4.1.

Cabe mencionar, que en un proceso de formación de diversas estructuras de Ag, además, de los compuestos orgánicos (presentes en las plantas), es necesario emplear otros parámetros que permitan homogeneizar el tamaño y las formas que se deseen obtener, estas condiciones son: concentración de la sal precursora, tiempo y velocidad de agitación, temperatura, dosificación, entre otras, lo cual conlleva a un cambio en la velocidad de reducción de los compuestos y por lo tanto un reordenamiento distinto de los átomos de Ag [61].

**Tabla 4.1** Comparativo del contenido total de fenoles de las plantas *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare* y *Sedum preaultum*.

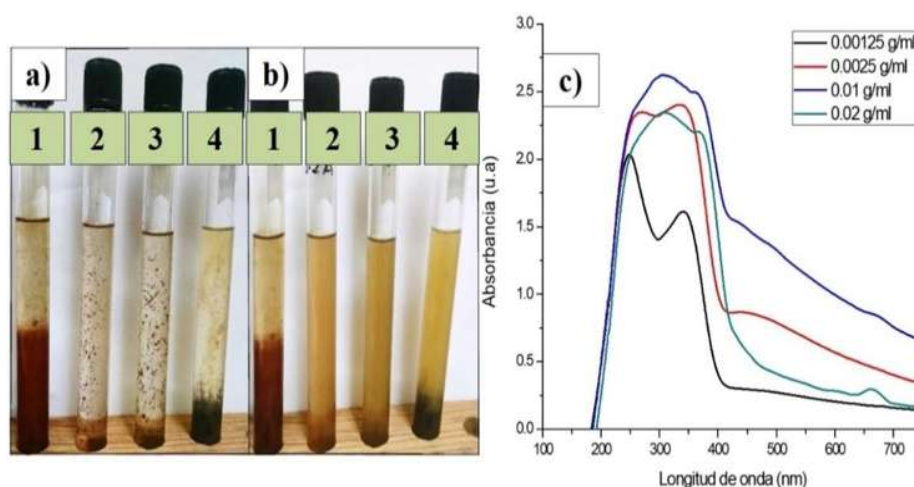
Muestra	Planta de estudio	Concentración de extracto (g/ml)	Temperatura de infusión	mg AGE/mg extracto seco
L1A	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.02	24 °C	374.71
L1	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.02	60° C	379.75

L2	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.04	60° C	419.53
L3	<i>Lavandula angustifolia</i>	0.06	60° C	440.17
O1	<i>Origanum vulgare</i>	0.02	60° C	423.37
SV1	<i>Sedum prealtum</i>	0.02	60° C	61.21

#### 4.3 Síntesis de nanopartículas monometálicas de plata usando el extracto etanólico de la planta *Lavandula angustifolia*

Primeramente, se determinaron los mejores parámetros para el proceso de formación de AgNPs. Las primeras condiciones de síntesis consistieron en emplear una concentración fija de sal precursora AgNO<sub>3</sub>, siendo ésta de 5 mM con extracto de la planta *Lavandula angustifolia* en solución etanólica a diferentes concentraciones (0.00125, 0.0025, 0.01, 0.02 g/ml). Es importante mencionar, que los parámetros debajo de la concentración de 0.02 g/ml fueron elegidos con el objetivo de determinar la concentración mínima, en la cual, el extracto de la planta tiene la capacidad reducir los iones de Ag. Además, de acuerdo a los resultados del ensayo de potencial reductor anterior, se concluyó que la concentración de 0.02 g/ml es adecuada para el proceso de formación de las AgNPs. El primer indicativo de formación de las AgNPs es el cambio de color en la solución. La Figura 4.3 (a), muestra de izquierda a derecha de manera ascendente, las soluciones con el incremento de concentración en el extracto de planta *Lavandula angustifolia*. Es apreciable, que las muestras presentaron una tonalidad similar en coloración, y se distinguen por la formación de precipitados sólidos (Figura 4.3 (b)), siendo éstos indeseables en el proceso de síntesis. Además, al paso del tiempo las soluciones comenzaron a precipitar en las paredes del tubo de ensaye, siendo más notorio en la muestra número 4 de izquierda a derecha que corresponde a la concentración 0.02 g/ml del extracto de *Lavandula angustifolia* con 5 mM de AgNO<sub>3</sub> y que se atribuyó al crecimiento de la plata que va desde nanopartículas hasta el estado macrométrico del material. El apartado 4.3 (c) de las figuras presenta los espectros de UV-Vis de las muestras a las diferentes concentraciones estudiadas, donde la mayoría de las muestras no presentaron una banda de plasmón de superficie definida (SPR, por sus siglas en inglés) como en el caso de Mohanty y col. los cuales

obtuvieron un SPR con un máximo de absorción a 421 nm [62]; solo para el caso de la concentración de 0.0025 g/ml, se observó la mayor intensidad de la banda a una longitud de onda comprendida alrededor de los 450 nm que corresponde a las AgNPs, sin embargo, debido a que el ancho del pico es muy amplio se pueden esperar diversas distribuciones de formas y tamaños que no son deseables en el proceso de formación. Finalmente, se empleó la agitación a velocidad de 3 STIR en periodos de tiempo corto, medio y largo, siendo estos de 2, 10 y 24 h, con el objetivo de obtener AgNPs homogéneas, pero no se obtuvieron los resultados deseados, además, las soluciones presentaron gran cantidad de residuos sólidos; por esta razón se concluyó que la síntesis empleando etanol como solvente no es adecuada para el proceso de formación y como consecuencia no se continuó la caracterización de éstas.

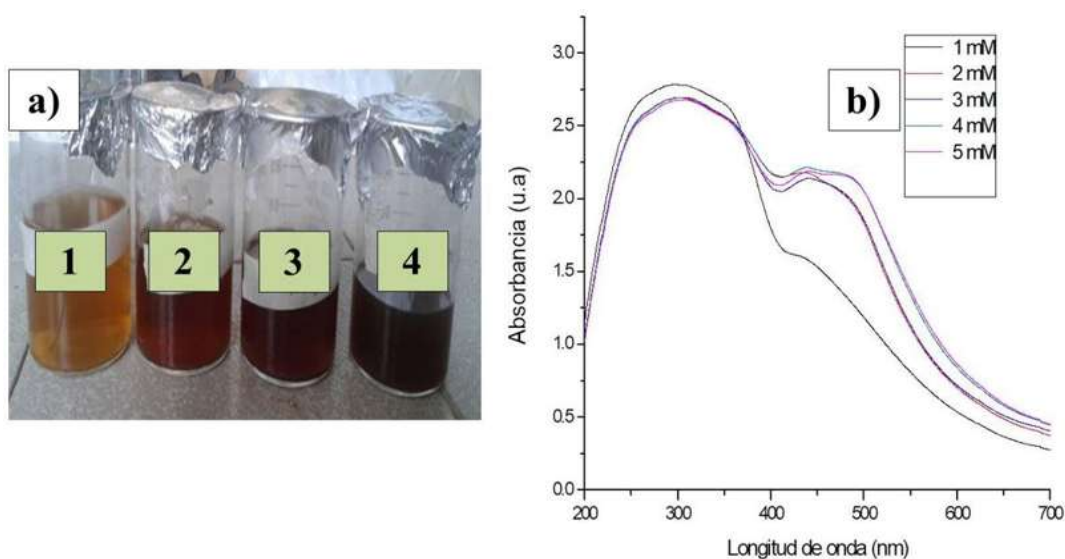


**Figura 4.3** Síntesis de AgNPs empleando etanol como solvente a) Formación de precipitados, b) Adherencia a las paredes del tubo y c) Espectros de UV-Vis a diferentes concentraciones de extracto de la planta *Lavandula angustifolia*.

#### 4.4 Síntesis de nanopartículas monometálicas de plata empleando extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia*.

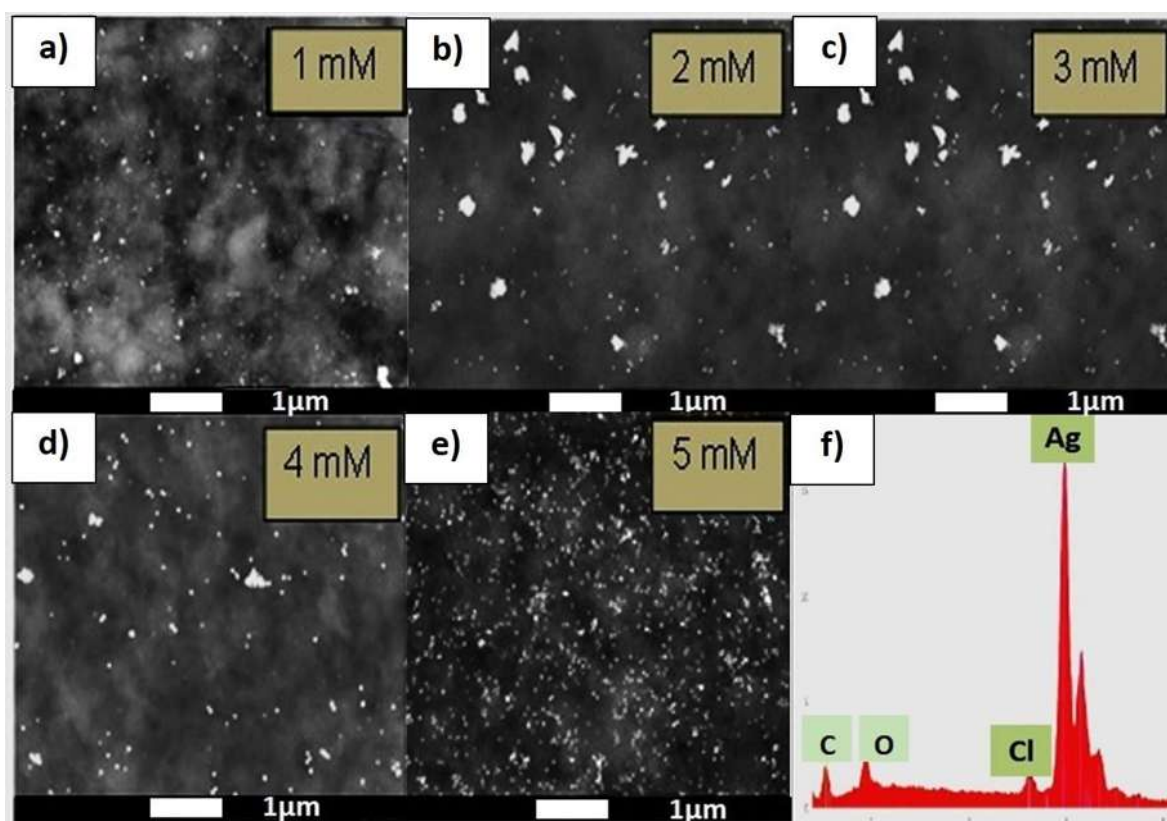
Como se mencionó con anterioridad, el empleo de etanol como solvente no fue adecuado en el proceso de síntesis de AgNPs; por esta razón la síntesis se llevó por medio de la reacción de la sal precursora  $\text{AgNO}_3$  con variación de las concentraciones finales (1, 2, 3, 4 y 5 mM) y el extracto acuoso de planta *Lavandula angustifolia* preparado a 60 °C a una concentración final 0.01 g/ml (proveniente de la relación volumétrica 1:1 entre la solución de extracto de planta 0.02 g/ml y la sal precursora). El primer indicativo de formación de AgNPs es el cambio de color en la solución

acuosa que va del amarillo al marrón, en ocasiones negro como el trabajo de Lopes y col. [63]. La Figura 4.4 (a), muestra el cambio en la coloración de las soluciones que contienen las AgNPs a través del tiempo. Además, se anexa en el apartado 4.4 (b), los espectros de UV-Vis a diferentes concentraciones de sal precursora, en donde, se aprecia que a medida que aumenta la sal precursora, también se incrementa el máximo en la banda del plasmón de superficie ubicado alrededor de los 494 nm, como en el caso de López-Miranda y col. [40] (Ver Figura 2.9). Una de las características al momento de elegir la mejor muestra fue por medio del criterio de la intensidad del máximo de la banda de plasmón de superficie, que tiene que ver con la cantidad de nanopartículas presentes en la solución, el ancho de la banda que se relaciona con las formas de las partículas y la longitud de onda presente, ya que cuando la banda se encuentra a una longitud de onda menor, los tamaños son más pequeños y viceversa. Para el caso de las AgNPs, el rango de longitud de onda está comprendido entre 450-550 nm; por ésta razón se eligió como mejor resultado el ensayo que contiene la concentración de 5 mM, se ajustó de manera adecuada a los criterios mencionados con anterioridad porque comparte la intensidad más alta junto a la concentración de 4 mM, la diferencia radica en que ésta última presenta otro pico pronunciado a una longitud alrededor de los 445 nm, lo que es indeseable en el proceso de síntesis, mientras que la muestra 5 mM presenta una banda más homogénea, que se relaciona con una sola distribución de tamaños.



**Figura 4.4** Muestra 5 mM a) Cambio de color de las soluciones respecto al tiempo y b) Espectros de UV-Vis a diferentes concentraciones molares.

Posteriormente, las muestras se estudiaron por microscopía electrónica de barrido para observar la forma y distribución de tamaños, así como su análisis químico. La Figura 4.5 (a-e) muestra las micrografías de barrido de las diferentes concentraciones estudiadas, en donde se aprecia que la cantidad de AgNPs es mayor a medida que incrementa la cantidad de sal precursora  $\text{AgNO}_3$ , coincidiendo con el análisis arrojado por la espectroscopía UV-Vis. Además, la mayoría de las partículas se encuentran debajo de los 100 nm, presentando formas esféricas, aunque esa información se corroboró en conjunto con microscopía electrónica de transmisión. Finalmente, en el apartado 4.5f se añade el análisis químico, el cual demostró la presencia de los elementos Ag y Cl.

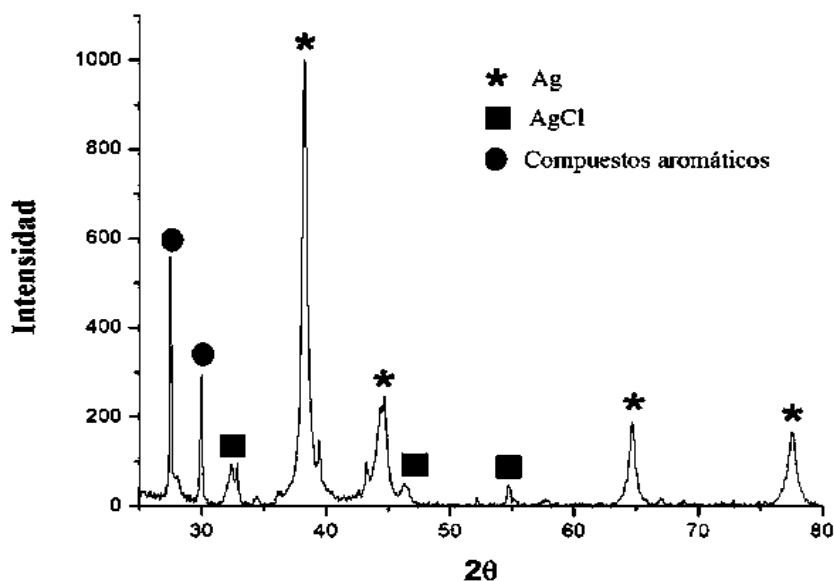


**Figura 4.5** Micrografías de MEB de las AgNPs a medida que incrementa la concentración de sal precursora a) 1 mM, b) 2 mM, c) 3 mM d) 4 mM, e) 5 mM y f) Análisis químico EDS de la muestra 5 mM.

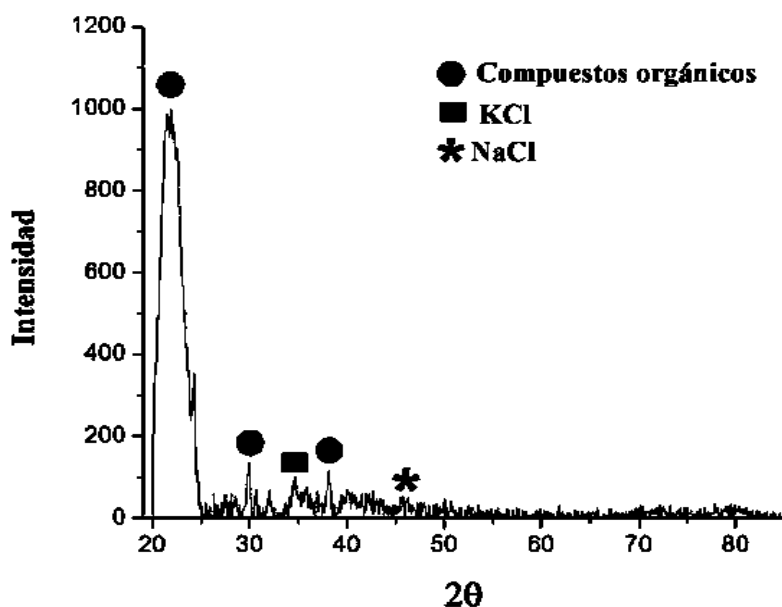
Para confirmar la estructura cristalina de las AgNPs, se analizó la muestra 5 mM por medio de difracción de rayos X. En la Figura 4.6, se observan 4 picos de difracción en ángulos de 38, 44.5, 64.5 y 77.6°, a los que se les asignaron respectivamente los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1) de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) del cristal de plata. A partir del semiancho

del pico principal a la altura media mediante la ecuación de Scherrer, se estimó el tamaño de cristal siendo éste de 20 nm, confirmando así la estructura de las nanopartículas obtenidas como en el caso del trabajo elaborado por Ahluwalia y col.[64], los cuales sintetizaron AgNPs a partir del extracto *Swertia paniculata* percibiendo un tamaño de cristal promedio de 18 nm.

Además, los picos adicionales a 33, 48 y 54° se atribuyeron al compuesto AgCl, de acuerdo al número de tarjeta [00-031-1238]. Por otro lado, en la Figura 4.7, se anexa el difractograma de rayos X del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*, con la finalidad de identificar los picos desconocidos en el difractograma de las AgNPs. El análisis de los picos ubicados en ángulos de 25, 30, 38 y 40 ° coincidieron con una amplia cantidad de compuestos formados principalmente por C, H, O, que corresponden a compuestos orgánicos de cadena larga, siendo éstos aromáticos como: fenoles, flavonoides y taninos. Lo anterior coincide con lo mencionado por López-Miranda y col. [40, 42], los cuales atribuyen, los picos ubicados a 25 y 40 ° del difractograma de las AgNPs (ver Figura 4.6), a compuestos orgánicos presentes en la planta encargados de estabilizar las nanopartículas. Además, como complemento en la Figura 4.7 se indexaron los picos a 32, 47° que se atribuyeron al cristal de NaCl con número de tarjeta [01-088-2300]. Finalmente, los picos a valores angulares de 34, 49 y 62° correspondieron al cristal KCl con número de tarjeta [01-077-2121].

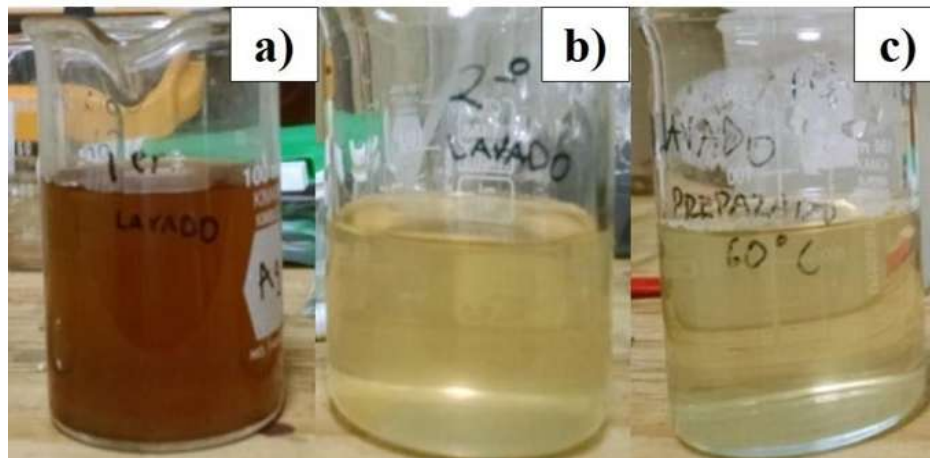


**Figura 4.6** Difractograma de rayos X de la muestra de AgNPs a una concentración de 5 mM.



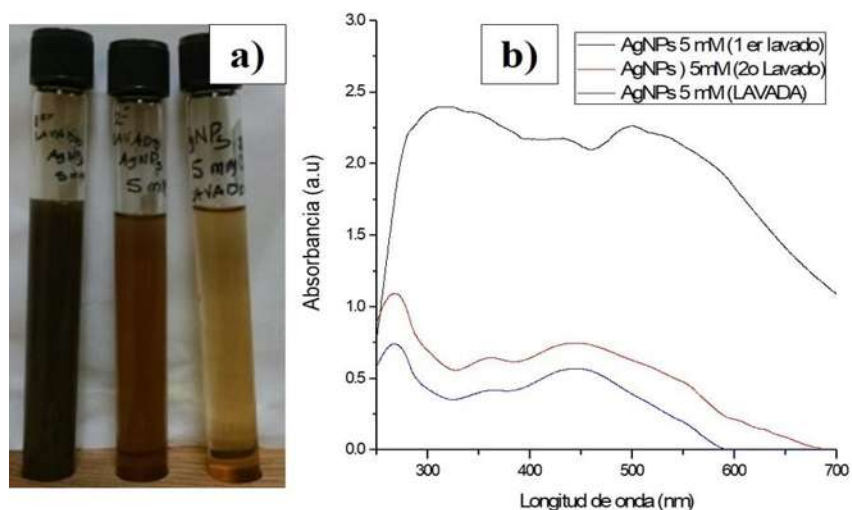
**Figura 4.7** Diffractograma de rayos X de la planta *Lavandula angustifolia*.

De acuerdo a los resultados analizados por medio de DRX en la Figura 4.6, se identificó la presencia del compuesto AgCl como producto no deseado; es por ello que se procedió a realizar una prueba complementaria para la eliminación del ion Cl, mediante lavados con agua destilada. La Figura 4.8 muestra las diferentes tonalidades del extracto posterior a los lavados de izquierda a derecha, apreciándose una disminución en el color de manera considerable a medida que fueron realizados. En el primer lavado se observó una tonalidad café, que es similar a la extraída por medio de temperatura de 60 °C; por esta razón se justifica la extracción de los compuestos reductores y estabilizadores del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* con agua destilada a temperatura ambiente de aproximadamente 24 °C. El segundo lavado presentó una tonalidad amarilla, que se atribuye a la disminución de los componentes reductores y estabilizadores presentes en la planta. Finalmente, la planta que se sometió a dos lavados se secó y se empleó en la preparación de un nuevo extracto a temperatura de 60 °C, con el propósito de observar si la tonalidad incrementaba, pero se identificó que el color amarillo fue ligeramente más tenue que el segundo lavado (ver Figura 4.8 (c)).



**Figura 4.8** Cambio de color del extracto de la planta *Lavandula angustifolia* con los lavados a) Primer residuo del lavado b) Segundo residuo del lavado y c) Extracto preparado a 60°C.

Para corroborar la disminución de los agentes reductores y estabilizadores se realizó un ensayo de síntesis de AgNPs con los extractos que conciernen al residuo del primer lavado, residuo del segundo lavado y al extracto lavado. La Figura 4.9 (a) ilustra de izquierda a derecha el cambio de color de las soluciones que contienen las AgNPs, en las cuales es notoria una tonalidad marrón para el residuo del primer lavado, un tono café para el residuo del segundo lavado y amarillo miel para aquella muestra lavada y preparada a 60°C. Además, se anexan los espectros de UV-Vis en el apartado 4.9 (b), en los cuales se apreció una disminución en las intensidades y un incremento en el ancho de la banda a medida que se realizaron los lavados, esto se interpreta como la disminución de AgNPs y diversidad en la distribución de tamaños, como consecuencia del decremento de agentes reductores y estabilizantes presentes en el extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. Por esta razón, se decidió continuar los ensayos del presente trabajo con la planta sin lavar.



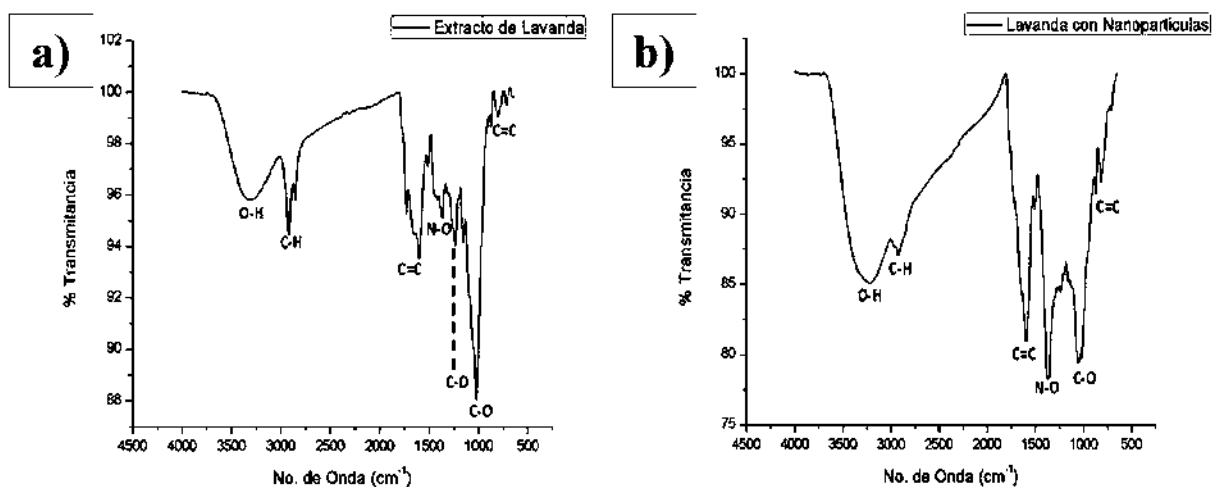
**Figura 4.9** Síntesis de AgNPs de los diferentes lavados a) Disminución del cambio de color de formación a medida que se realizaron los lavados y b) Comparativo de los espectros de UV-Vis de las distintas soluciones.

La espectroscopía por infrarrojo es una alternativa adecuada para identificar de manera general los compuestos involucrados en la síntesis de las AgNPs. La Figura 4.10 (a), muestra el espectro IR del extracto de la planta *Lavandula angustifolia*. En primer lugar, se aprecia una banda con número de onda  $3329\text{ cm}^{-1}$  producida por vibraciones de estiramiento del enlace O-H del grupo de los alcoholes. Además, se presentan un par de bandas con números de onda  $2922$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$ , las cuales corresponden al enlace C-H de los alcanos, más específicamente del grupo  $\text{CH}_2$  (metileno). Posteriormente, se ubican una banda principal en  $1604\text{ cm}^{-1}$  y algunas secundarias en  $1732$ ,  $1651$  y  $1512\text{ cm}^{-1}$  pertenecientes al grupo de los aromáticos con enlace C=C. Cuando la banda principal se encuentra cerca de  $1600\text{ cm}^{-1}$  el compuesto tiene núcleo bencénico. Por otro lado, los picos de absorción en  $1417$  y  $1369\text{ cm}^{-1}$  se identifican como enlaces N-O de los compuestos nitro. También se observa un pico de absorción con número de onda  $1236\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al enlace C-O de los ácidos carboxílicos. Cercano a  $1000\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-O se presentan dos bandas, siendo la más intensa en  $1020\text{ cm}^{-1}$  y la secundaria en  $1159\text{ cm}^{-1}$  que, en su conjunto, pertenecen al grupo de los ésteres. Finalmente, los picos de absorción por debajo de  $850\text{ cm}^{-1}$  representan la existencia de sustituciones en aromáticos.

En la Figura 4.10 (b), se presenta el espectro de las AgNPs. Se aprecia una banda correspondiente al enlace O-H con desplazamiento hacia menores longitudes de onda ( $3242\text{ cm}^{-1}$ ). Cercano a  $3000\text{ cm}^{-1}$  se observa la desaparición de las bandas del grupo metileno, las cuales son sustituidas por un solo pico de absorción en  $2923\text{ cm}^{-1}$  para un enlace C-H del grupo de los alquenos. Posteriormente, se ubican dos picos de absorción en  $1598$  y  $1508\text{ cm}^{-1}$ , que en conjunto corresponden al enlace C=C del grupo de los compuestos aromáticos.

Además, el pico de absorción en  $1379\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace N-O de los compuestos nitro, y se encuentra acompañado de una banda menos intensa ( $1263\text{ cm}^{-1}$ ) que podría ser interpretada como una banda secundaria de este enlace. Sin embargo, por su ubicación en el espectro no es así, y se determina que esta absorción representa al enlace C-O de los ácidos carboxílicos, tal como se presentó en el espectro del extracto puro y, por su intensidad, se establece que estos compuestos han reaccionado para la formación de AgNPs.

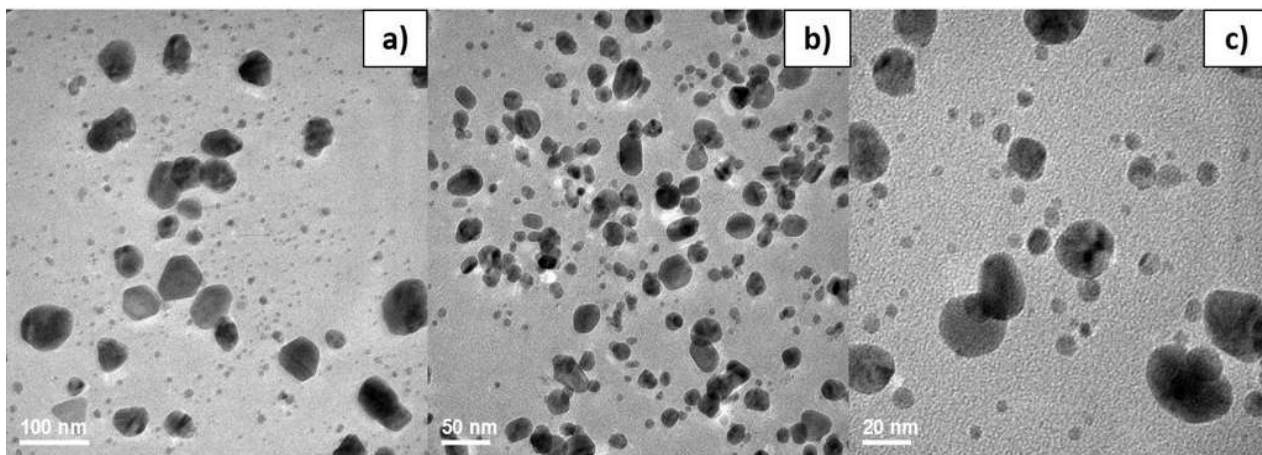
Las bandas en  $1056$  y  $1022\text{ cm}^{-1}$  se interpretan como una absorción correspondiente al enlace C-O y, por tratarse de dos picos, pertenece al grupo de los ésteres. Finalmente, se observa una serie de absorciones de baja intensidad ubicadas debajo de  $900\text{ cm}^{-1}$ , las cuales representan la existencia de sustituciones en aromáticos.



**Figura 4.10** Espectros de FT-IR a) Extracto de la planta *Lavandula angustifolia* y b) AgNPs.

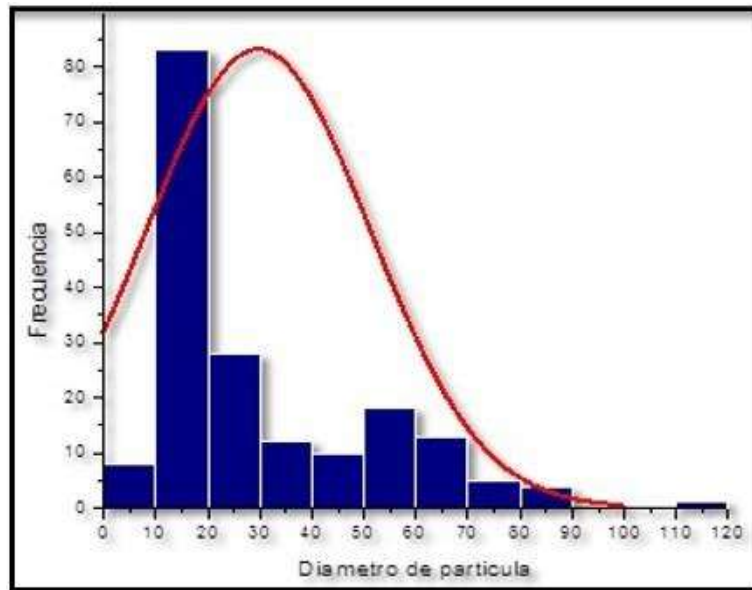
Finalmente, para determinar la forma y estructura cristalina de las AgNPs se analizó la muestra a una concentración de  $5\text{ mM}$  por medio de microscopía electrónica de transmisión. La Figura 4.11, exhibe tres imágenes de campo claro, en la cual se aprecia que las nanopartículas obtenidas

mediante el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* se encuentran en su mayoría debajo de los 100 nm, mostrando una distribución heterogénea de tamaños. Las nanopartículas más pequeñas son esféricas y las de mayor tamaño tienden a ser tetraedros truncados como las obtenidas por Balashanmugama y col. [65].



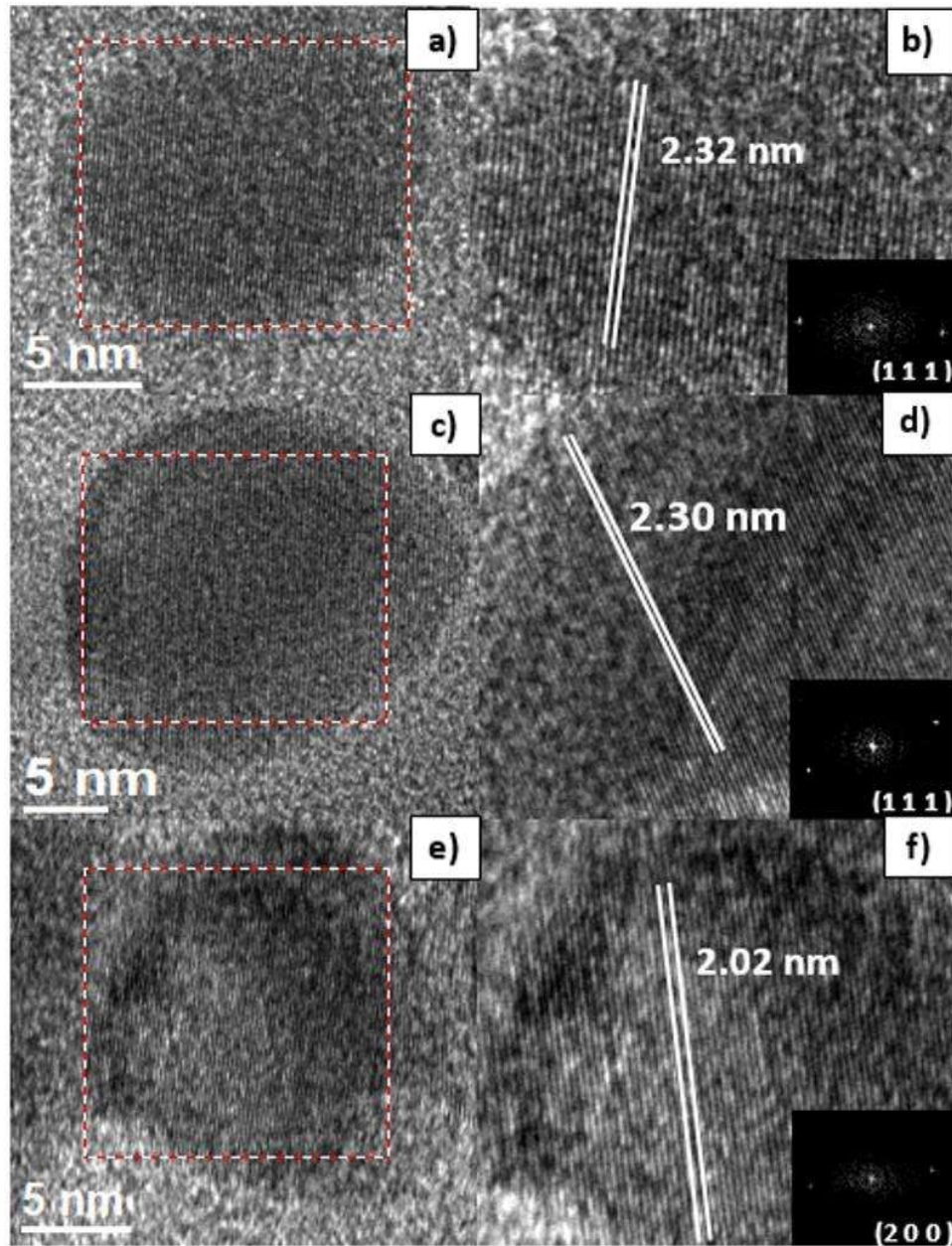
**Figura 4.11** Imágenes de campo claro mostrando una distribución heterogénea de tamaños.

A partir de los resultados obtenidos en la Figura 4.11, se presenta el histograma que indica la distribución de tamaño de las partículas. Es notorio, que el rango de tamaño de las AgNPs es muy amplio, ya que se encuentra desde 1-90 nm, sin embargo, se aprecia una alta frecuencia de nanopartículas comprendidas entre 10-20 nm. Posteriormente, se realizó la medición del tamaño aproximadamente 250 partículas y se determinó la media, siendo ésta de 18 nm similar a la investigación realizada por Sánchez y Col [66]. Cabe mencionar que la diferencia en las mediciones entre DRX (20 nm) y MET (18 nm), se derivan de que en éste último solo se midieron pocas partículas de cierta zona, mientras que en DRX, el número de partículas es superior, y debe respetarse más ese resultado.



**Figura 4.12** Histograma de la distribución de tamaño de las partículas.

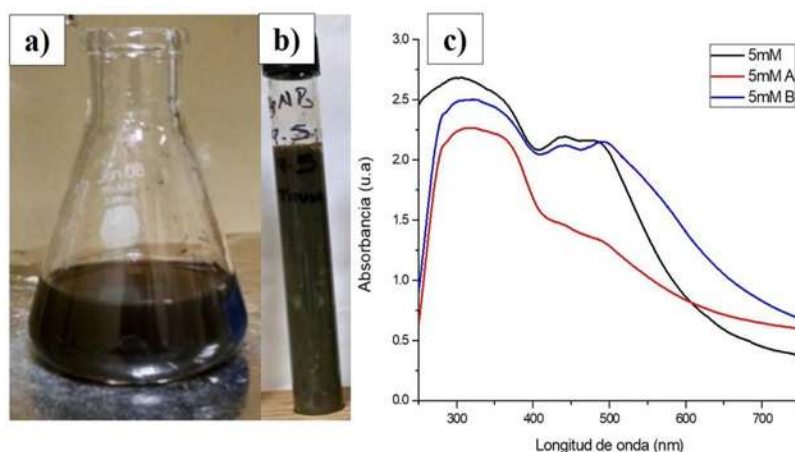
En la Figura 4.13 (a-f) se presentan imágenes de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés), en donde se puede observar la estructura interna de las nanopartículas, denotada por la resolución lineal dentro de ellas. Además, se aprecian partículas de un tamaño aproximado entre 10-20 nm, cuya forma tiende a ser elipsoidal alargada, causado por un fenómeno denominado crecimiento anisotrópico, lo que sugiere que el extracto presenta modificadores de forma que actúan sobre las nanopartículas. Posteriormente, mediante la transformada rápida de Fourier (anexos en los apartados b, d, e) se confirma la naturaleza cristalina, así como las distancias interplanares entre las líneas de difracción interiores de las nanopartículas, en las cuales se presenta tanto la distancia aproximada a 2.35 Å que coincide con los planos del tipo (1 1 1), así como la distancia 2.04 Å que pertenece a los planos del tipo (2 0 0), ambas de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) de la plata metálica, reafirmando que los nanosólidos pertenecen al cristal de plata.



**Figura 4.13** Imágenes de MET de alta resolución (HRTEM) con anexos de la transformada de Fourier, planos del tipo (1 1 1), (2 0 0) y distancias interplanares que confirman la naturaleza cristalina de las AgNPs.

Se consideraron 2 alternativas para mejorar la síntesis de la muestra a concentración 5 mM. La primera variación se denominó 5 mM “A” y consistió en la variación del tiempo de dosificación de la sal precursora  $\text{AgNO}_3$ , la velocidad y el tiempo de agitación, así como la temperatura de preparación del extracto. El extracto se preparó a la misma concentración de los ensayos anteriores, pero a temperatura ambiente por un periodo de 10 min. El motivo de cambiar la temperatura de

infusión fue que, de acuerdo a los resultados presentados en los ensayos de potencial reductor y cuantificación de fenoles, se demostró que la temperatura no influye de manera significativa en el proceso de extracción de los compuestos presentes en la planta *Lavandula angustifolia*. Además, la dosificación de la sal fue por medio de una bureta de titulación por 20 min y se agitó la muestra por 105 min a una velocidad de 5 STIR, hasta la aparición de un color negro en la solución para ser analizada inmediatamente por espectroscopía UV-Vis. Esta solución se ejemplifica en la Figura 4.14 (a-b). También, se incorpora el espectro de UV-Vis en el cual se observa que la banda de absorción es ancha, indicando estructuras de tamaño superior a las AgNPs.

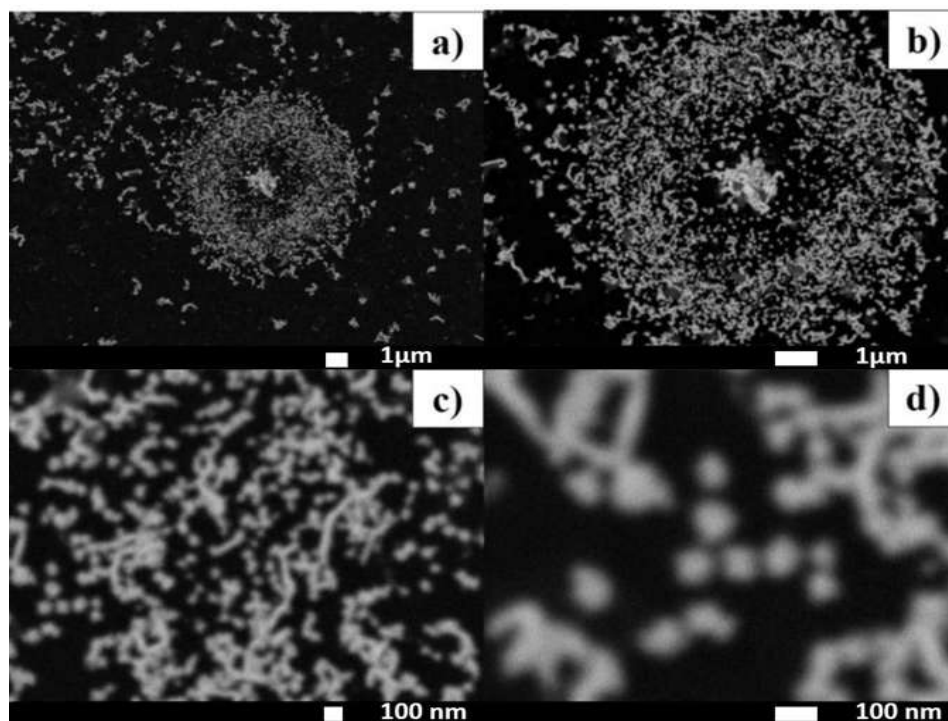


**Figura 4.14** Formación de AgNPs a) 5 mM A, b) 5 mM B y c) Comparativo de los espectros de UV-Vis de los diferentes ensayos de síntesis a la misma concentración de sal precursora.

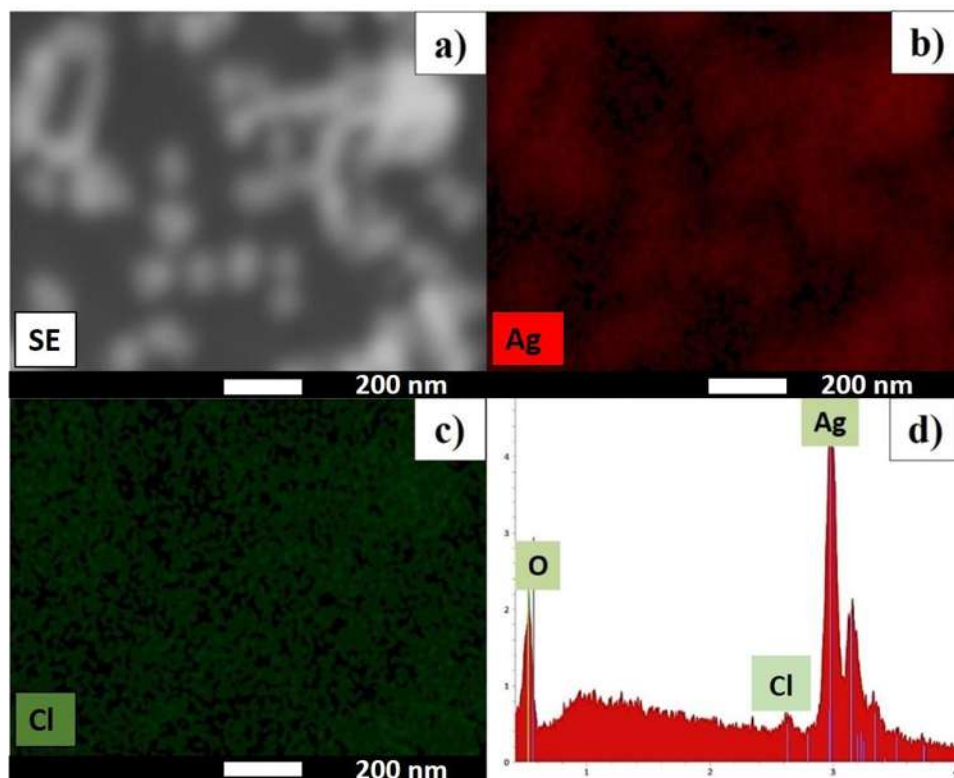
La segunda variación se denominó 5 mM “B”, en el cual se mantuvieron fijos los parámetros de preparación del extracto, así como su concentración y la dosificación de la sal precursora. Los únicos cambios que se presentaron fueron el tiempo y la velocidad de agitación, siendo éstos de 22 h a 2 STIR respectivamente. El cambio en las variables de síntesis causó una coloración gris en la solución (ver Figura 4.14 (b)), atribuyéndose al incremento en la velocidad de reacción, y por lo tanto envejecimiento del sistema, ya que el cambio de coloración gradual al paso del tiempo en el proceso de formación de AgNPs es de amarillo, marrón, negro y gris. El aumento en la velocidad del proceso de óxido-reducción y estabilización se relacionó con la adición de energía que atribuye la agitación a la solución, al estar expuesta a periodos largos. Finalmente, la muestra fue analizada mediante espectroscopía UV-Vis al término de la síntesis y se observa en la Figura 4.14 (c) como la muestra 5 mM “B” tiene una intensidad superior en comparación con el ensayo 5 mM “A”, pero

similar a 5 mM. La diferencia se aprecia en la definición del SPR, la cual es mejor para 5 mM “B”, esto puede significar tamaños similares con distribución homogénea.

Posteriormente, la Figura 4.15 (a-d) muestra a diferentes ampliaciones (5000, 10000, 40000, 100000 X) lo interpretado por espectroscopía UV-Vis, ya que las estructuras identificadas son superiores en tamaño a las AgNPs. Además, se apreciaron estructuras en forma de alambres en conjunto con AgNPs esféricas. También, se adicionó el análisis EDS y mapeo químico en la Figura 4.16, con el propósito de confirmar que la composición de los nanoalambres fuera de plata. Cabe destacar que se les otorgó el término nano debido a que una de sus dimensiones pertenece al rango nanométrico como es el caso de su espesor, siendo éste inferior a los 100 nm. Por otro lado, se adicionó el mapeo químico en la Figura 4.16c, con la finalidad de descartar que las formas de alambres fueran de AgCl, ya que este sólido es indeseable en el proceso de formación. De este ensayo se concluyó que las estructuras son causadas por la velocidad de agitación, a la cual la muestra estuvo sometida, éste provocado por la energía que aporta la agitación al proceso de crecimiento en forma de alambres. Posteriormente, en este trabajo se hará referencia a ello en el apartado correspondiente a la síntesis de nanoalambres de plata.



**Figura 4.15** Micrografías de barrido de la muestra 5 “A” a diferentes ampliaciones a) 5000 X, b) 10000 X, c) 40000 X y d) 100000 X.

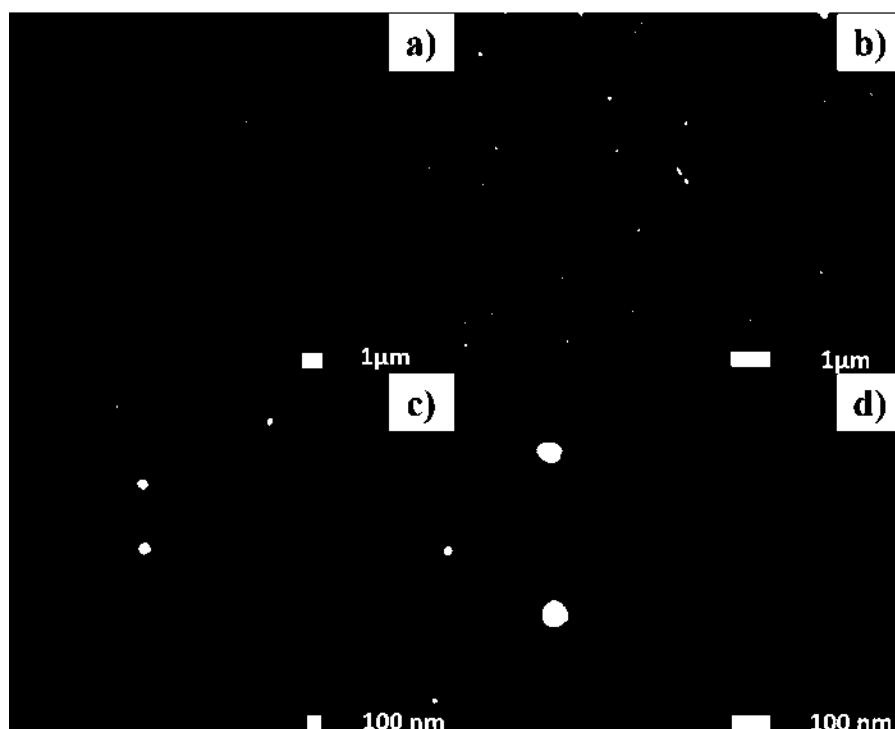


**Figura 4.16** Mapeo químico de la muestra 5 “A” a) Imagen en gris, b) Ag, c) Cl y d) Análisis químico.

La Figura 4.17, muestra las micrografías de barrido a diferentes ampliaciones para reafirmar lo analizado por espectroscopía UV-Vis. Se observa, que las AgNPs presentaron tamaños homogéneos en comparación con las muestras sintetizadas con anterioridad. También, se apreció una mejor distribución de las nanopartículas favorecida por el tiempo y velocidad de agitación. Los anteriores resultados demostraron una población más densa de AgNPs y mejor dispersión que las obtenidas por López-Miranda [42]. Es importante mencionar que la variación 5 mM “B” es una opción viable en el proceso de optimización de las AgNPs, de acuerdo a los resultados generados por medio de las dos técnicas de caracterización realizadas. Aunque, para un trabajo futuro es necesario continuar con la caracterización mediante las técnicas instrumentales de DRX en conjunto de MET, con el propósito de conocer la estructura cristalina, forma, y tamaño de las AgNPs.

De acuerdo a los resultados obtenidos se cree que la velocidad de agitación lenta favorece a una mayor homogeneidad de la cantidad de iones de Ag presentes en la solución y por lo tanto mayor cantidad de núcleos disponibles para formar agregados mediante nucleación homogénea. Por otro

lado, el tiempo prolongado de agitación se atribuyó a la dificultad de unión de los clusters ya formados, que se relaciona con una velocidad de producción lenta de las partículas, esto coincide con la teoría [17], que menciona, el proceso de formación de nanopartículas será exitoso, siempre y cuando exista una gran cantidad de núcleos disponibles y que la velocidad de reducción sea rápida aunada a un crecimiento lento de nanopartículas.



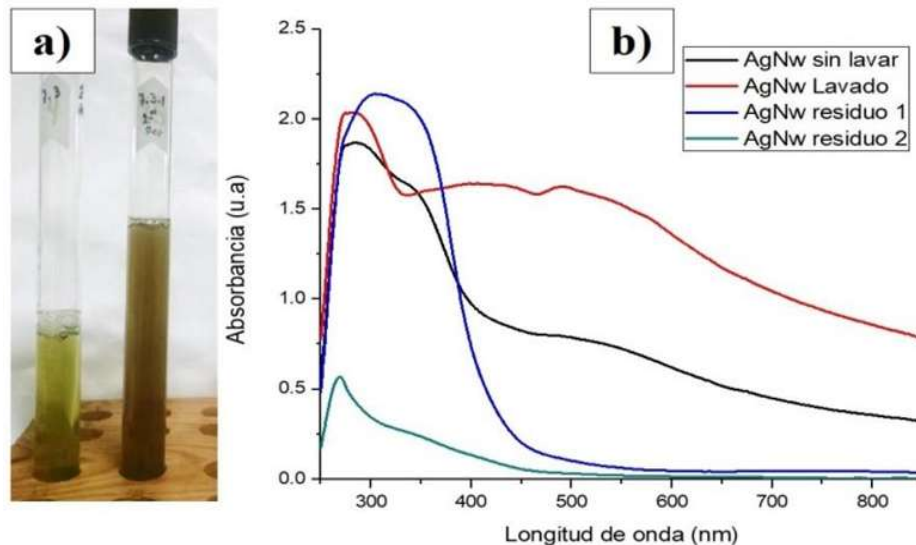
**Figura 4.17** Micrografías de MEB de la muestra 5 mM “B” a diferentes ampliaciones a) 5000 X, b) 10 000 X, c) 40 000 X y d) 100 000 X.

#### **4.5 Síntesis de AgNWs a partir del extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia***

La síntesis de AgNWs se realizó por medio de un proceso de dos pasos, similar al de la síntesis bimetalica del tipo núcleo-coraza. Primeramente, se preparó el extracto acuoso de la planta *Lavandula angustifolia* a concentración final de 0.01 g/ml y temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó la sal precursora  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , hasta una concentración final de 5 mM, con el objetivo de generar sobresaturación del sistema por medio de la competitividad de los iones de Cu. 24 horas posteriores, se adicionó la sal precursora  $\text{AgNO}_3$  hasta una concentración final de 5 mM. Inmediato al cambio de color, la muestra se sometió a centrifugado a 12 000 rpm por un tiempo de 30 min. El proceso anterior se realizó por duplicado e inmediatamente se analizó por medio de

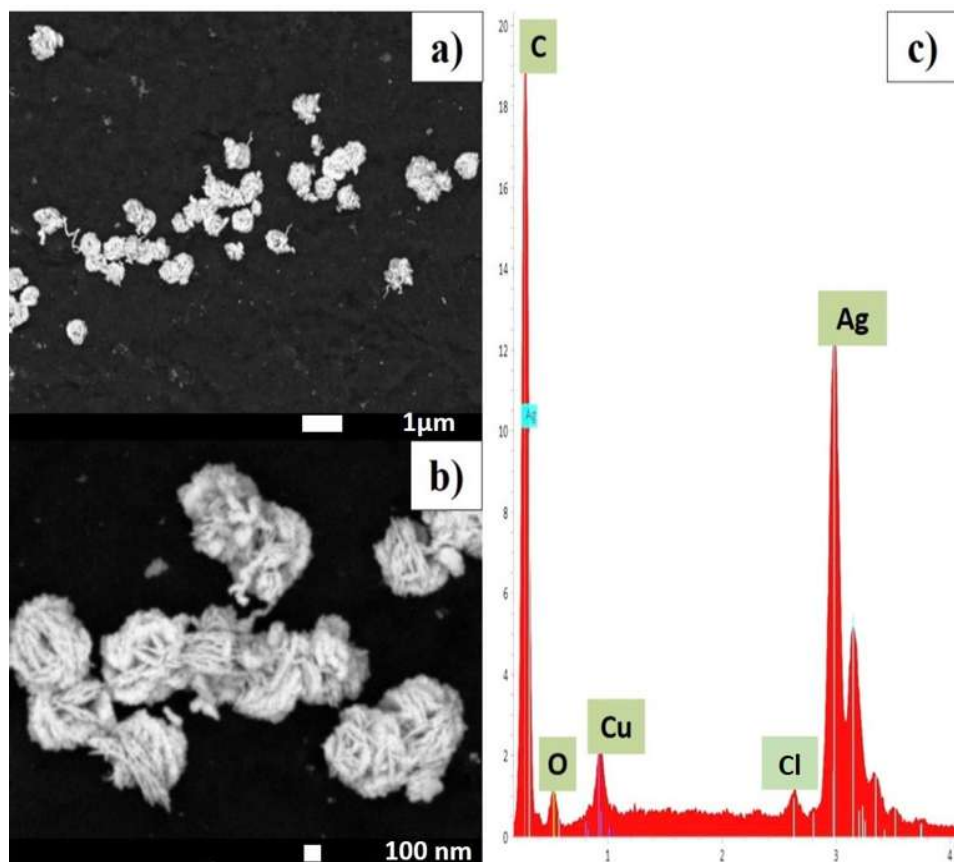
espectroscopía UV-Vis. La Figura 4.18 (a) muestra la imagen del cambio de color de la solución que contiene la sal sulfato de cobre pentahidratado y el extracto hasta el cambio de tonalidad de ésta, una vez adicionada la sal nitrato de plata, indicando la formación de los AgNWs. Se aprecia que aquella solución que contiene la sal de cobre no presenta cambio de color que pueda ser interpretado como formación de nanoestructuras, aunque si generó sobresaturación en el sistema de trabajo, no obstante, una vez que se adicionó la sal de plata, el color marrón apareció a causa de los plasmones de superficie de las nanoestructuras de plata formadas. Por esta razón, una vez observado el cambio en la coloración fue necesario lavar y disolver en agua para mantener su estabilidad. Además, en el apartado 4.18 (b), se presentan los espectros de UV-Vis de la solución que contiene los AgNWs lavados, así como sus respectivos residuos que resultaron del lavado por duplicado. Se distinguen dos bandas con un plasmón de superficie alrededor de los 500 nm, que corresponden a los AgNWs sintetizados. La banda con menor absorbancia corresponde los nanoalambres contenidos en el extracto y la más intensa concierne a los nanoalambres purificados por medio del proceso de centrifugación. El incremento en la intensidad de la muestra de AgNWs lavado se debe a que el precipitado sólido que contenía los AgNWs se dispersó en una cantidad de volumen menor de agua destilada en comparación con la muestra sin lavar. Además, la banda se ensanchó a causa de la formación de estructuras de mayor tamaño en comparación con AgNPs. El primer paso para corroborar la formación de AgNWs fue por medio de la aparición de una banda de plasmón de superficie ancha, abarcando en ocasiones el rango de 400-650 nm como es el caso del trabajo de Yang y col. [46]

También, se percibió que el lavado fue realizado de manera correcta, esto se debe a que la banda de plasmón de superficie de los nanosólidos de Ag desaparece, quedando solo la correspondiente al extracto de la planta *Lavandula angustifolia*.



**Figura 4.18** Síntesis de nanoalambres de plata a) Cambio de color de formación y b) Comparativo de los espectros de UV-Vis de los lavados y residuos de los AgNWs.

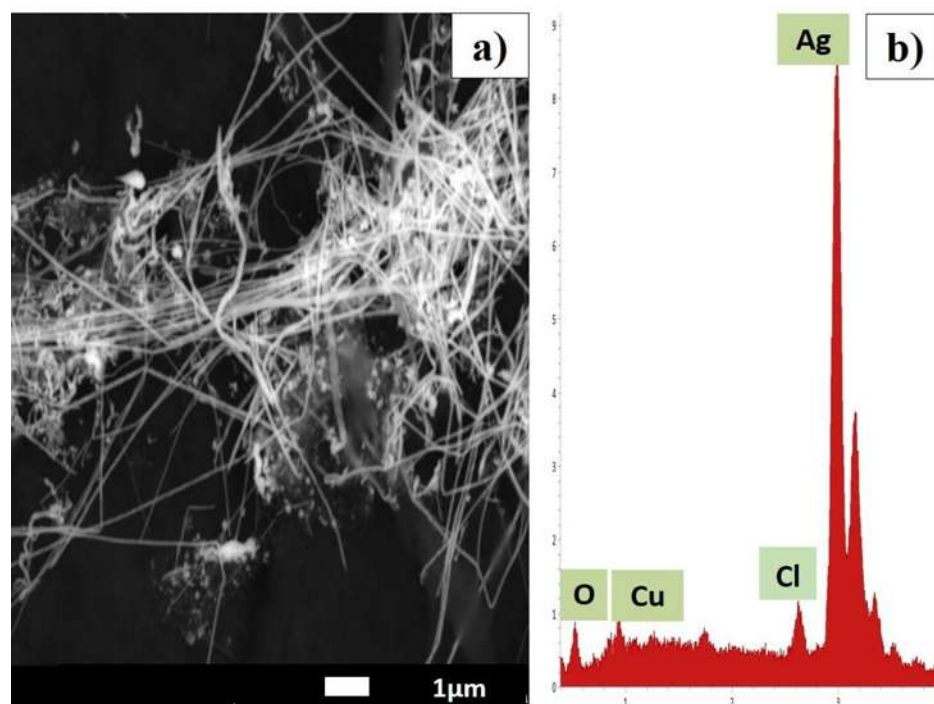
Para continuar con la caracterización de los AgNWs, las diversas muestras fueron analizadas por medio de MEB, con la finalidad de entender el papel del centrifugado en el proceso de formación. La Figura 4.19, presenta una micrografía de la solución que contiene los AgNWs antes de ser centrifugados. Además, se anexa su respectivo análisis químico EDS para demostrar la presencia de los elementos Ag y Cu. Es notorio que las estructuras presentan formas de estambres, es decir alambres entrelazados que son los precursores de las estructuras sintetizadas, éstas estructuras de mayor tamaño son formadas en consecuencia de la sobresaturación que generó la sal de cobre en la solución y la de adición de una cantidad alta de sal precursora de Ag, esto se atribuye así, porque algo similar ocurre en el proceso de formación de nanoensambles de Ag, el cual consiste en la adición de la sal precursora  $\text{AgNO}_3$  a una concentración muy alta, que se traduce a la formación de diversos núcleos dispuestos a reducirse, una vez que están formados los agregados, sobre ese mismo se unen más átomos de Ag.



**Figura 4.19** Micrografías de MEB de AgNWs sin lavar a diferentes ampliaciones a) 10 000 X, b) 40 000 X y c) Análisis químico EDS.

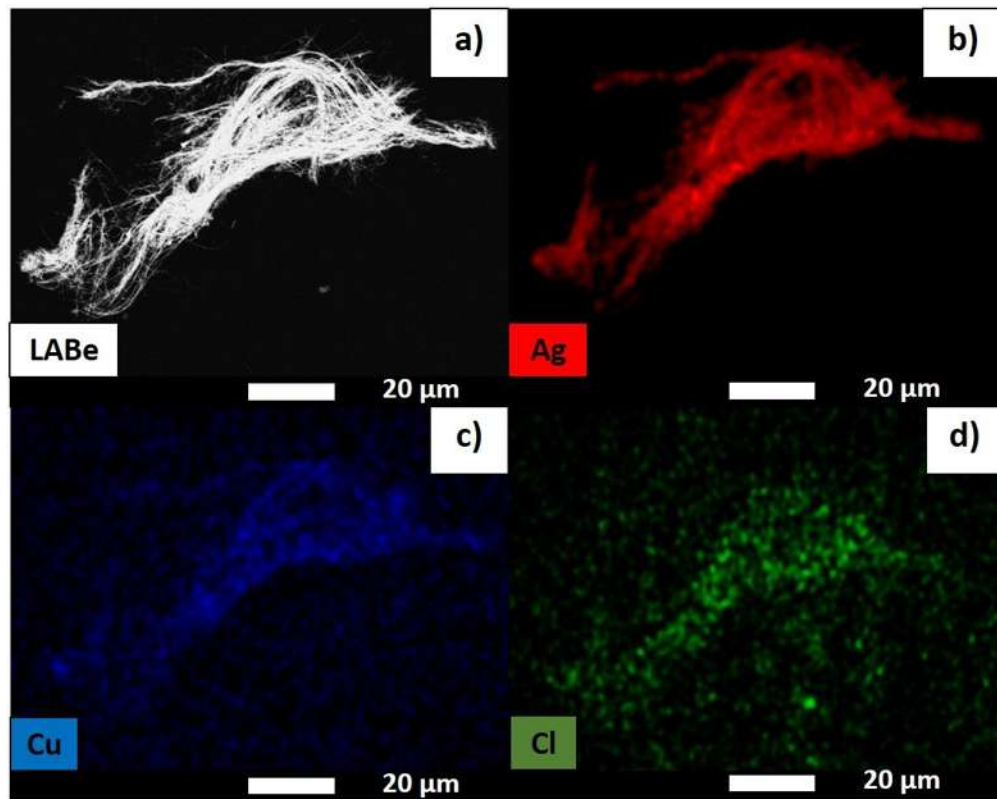
Por otro lado, se puede observar en la Figura 4.20 imágenes de MEB posteriores al centrifugado. Se puede apreciar de manera clara la formación de estos alambres en conjunto de pequeños grupos de AgNPs, que posiblemente al paso del tiempo se adherirán a los nanoalambres para formar parte de su estructura. Además, se incluye el análisis químico EDS para demostrar que los elementos principales que componen los AgNWs son Ag y Cu. Al analizar la imagen antes del centrifugado y la Figura 4.20 se interpretó que la formación de estos alambres es causada por el despliegue de las de las estructuras en forma de estambres, ya que, la energía asociada al centrifugado puede estar rompiendo las moléculas asociadas a la estabilización. Una vez terminado el proceso de centrifugación, en vista de que el estado nano, no es un estado estable de la materia, puede causar que las moléculas orgánicas y los nanosólidos de plata presenten un reacomodo en su configuración que tiene como consecuencia la formación de los nanoalambres.

Las imágenes presentadas en la Figura 4.20 ,se pueden comparar con lo realizado por Yang [46], aunque, es importante aclarar que Yang menciona que su vía de síntesis es verde, cuando en realidad ellos sintetizan por medio de una vía química convencional, por esta razón presentan variables más controladas y formas más definidas.



**Figura 4.20** Micrografías de MEB a) AgNWs y b) Análisis químico EDS.

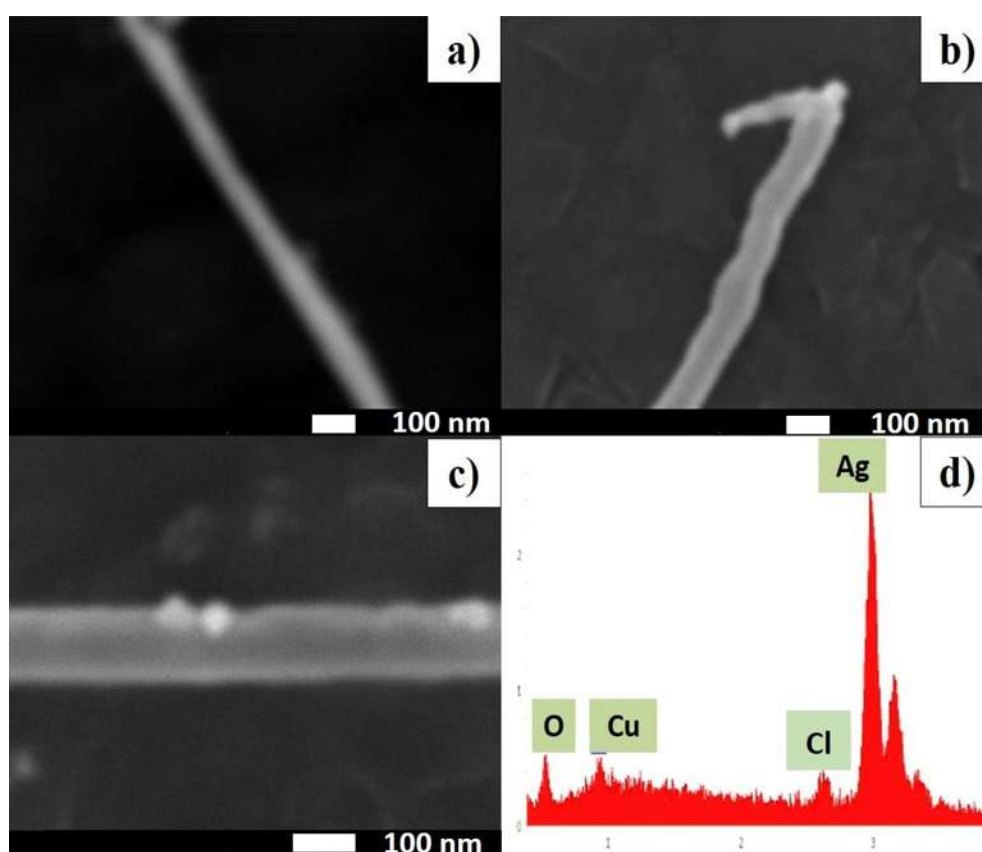
En la Figura 4.21, se presenta el análisis por medio de mapeo químico de los AgNWs. Se observa que los componentes principales son el Cu, Cl y Ag. Con esto se puede concluir que es posible que estos dos elementos en combinación jueguen un papel importante en la formación como templete inorgánico de las estructuras, esto se menciona porque a pesar de que se realizó un ensayo sin la presencia de sal de cobre a las mismas condiciones, los resultados no fueron los mismos en cuanto a cantidad, formas y longitud de los AgNWs. También, es importante mencionar que la presencia de estos elementos, puede ser causada por la solubilidad de pequeños agregados en la estructura principal de plata y no necesariamente formar parte del templete inorgánico como base en la formación de los nanoalambres de plata, aunque para afirmar esto, es indispensable realizar MET, con el propósito de corroborar la estructura cristalina de los nanoalambres, así como el mecanismo de crecimiento.



**Figura 4.21** Mapeo químico de los AgNWs a) Imagen en gris, b) Plata, c) Cloro y d) Cobre.

Para verificar el tamaño nanométrico de los AgNWs se anexa la Figura 4.22 (a-c), la cual demuestra que el ancho es menor a los 100 nm; por lo tanto, puede ser considerado como una nanoestructura 1D. También, se exhibe el posible mecanismo de formación de nanoalambres causado por la disociación de átomos de cobre en la estructura de plata y la centrifugación, para posteriormente adherirse nanopartícula por nanopartícula de plata a lo largo de esta estructura en forma de alambre, esto coincidiendo con lo mencionado con anterioridad acerca del reacomodo en la configuración, ya que, al momento que se forma el templete en forma de alambre, es causa del rompimiento de moléculas orgánicas, por lo tanto, los nanosólidos en forma de partículas se van uniendo una a una sobre el alambre, por otro lado, los compuestos orgánicos vuelven a tomar su papel de estabilizar como modificadores de forma, obligando a la adherencia de la AgNPs a lo largo del alambre. Este mecanismo puede ser comparado con lo realizado por Ai y col. [67], el cual a partir de la formación de un templete de hidroxiapatita (HA), se adhiere la sal  $\text{AgNO}_3$  con glucosa en solución para que actúe como agente reductor en la formación de AgNPs, con la finalidad de que éstas sirvan de revestimiento sobre los NWs precursores de HA. Esto se menciona porque las imágenes de MET que ellos poseen, ejemplifican la similitud de formación de AgNWs del presente trabajo. Además,

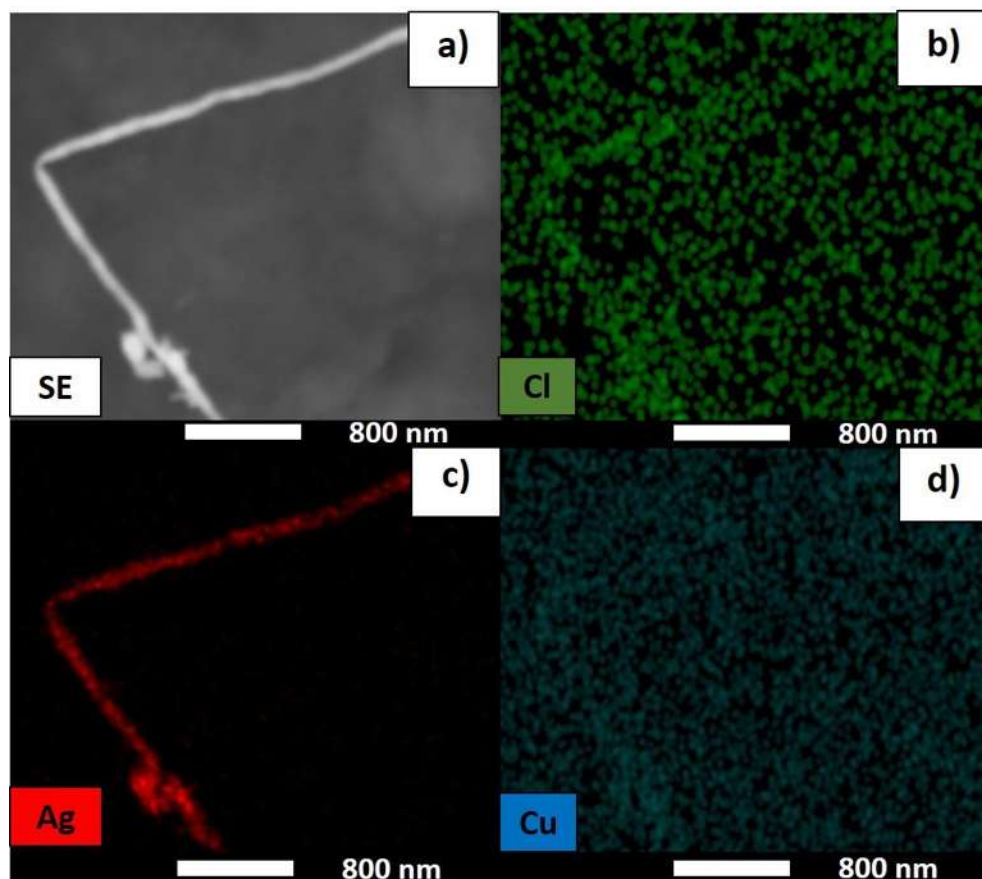
se añade su análisis químico en el apartado 4.22 (d) para demostrar la presencia de los elementos Cu y Ag. En este caso, se presentó la ausencia de Cl, demostrando que no todas estas estructuras contienen este elemento, por lo tanto, puede ocurrir lo que se mencionó con anterioridad acerca de pequeños agregados en la estructura de los nanoalambres de plata, pero que no son el elemento principal o determinante en el proceso de formación. Es importante mencionar, que los AgNWs sintetizados en el presente trabajo poseen una longitud de tamaño micrométrica más amplia en comparación con lo reportado con Yang [46], con un ancho por debajo de los 100 nm, sin embargo, se necesita realizar microscopia de transmisión para poder verificar la distribución de tamaños del ancho.



**Figura 4.22** Mecanismo de crecimiento de los AgNWs a) Base formada por centrifugación, b) Adherencia de AgNPs en la punta, c) Adherencia de AgNPs en el cuerpo y d) Análisis químico EDS.

Para estudiar un nanoalambre en específico, se realizó mapeo químico con el objeto de poder identificar de manera adecuada los elementos presentes. La Figura 4.23a-d manifiesta que los nanoalambres están constituidos por 3 elementos principales, siendo Ag en mayor proporción, Cu y Cl en menor proporción que el anterior, esto confirma lo mencionado con anterioridad, donde la

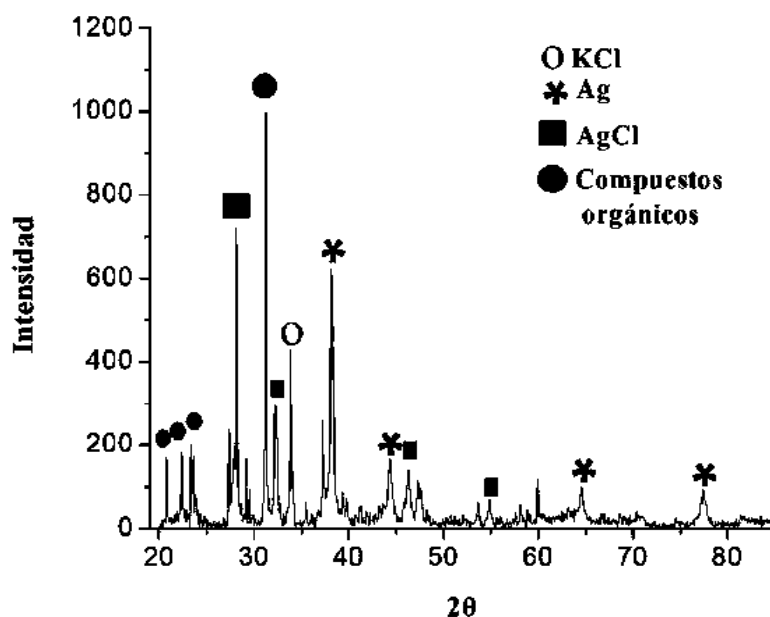
presencia de estos elementos puede ser causado por solubilidad en la estructura del nanowire de plata.



**Figura 4.23** Mapeo químico de un nanowire a) Imagen en gris, b) Cobre, c) Plata y d) Cloro.

Finalmente, se confirmó la estructura cristalina de los nanowires sintetizados mediante la técnica de DRX. En la Figura 4.24 se exhiben cinco picos de difracción en 38.5, 44.5, 64.5, 77.5 y 83.5° a los que pueden ser asignados los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) y (2 2 2) de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) del cristal de Ag con número de tarjeta [00-004-0783]. Además, se exhiben 4 picos de difracción en 27.8, 32.2, 46.2 y 58.7 a los que se les pueden asignar los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) del cristal AgCl con número de tarjeta [00-031-1238]. Los picos no identificados se asociaron a compuestos orgánicos encargados de la estabilización de los nanowires, esto realizó de acuerdo al difractograma de rayos X del extracto presentado en la Figura 4.7. Es complicado identificar un solo compuesto asociado a los picos, esto se debe a que se relacionan con una amplia gama de compuestos que contienen en su estructura principal C, H, O y en ocasiones N, siendo los más aproximados polifenoles, flavonoides o en

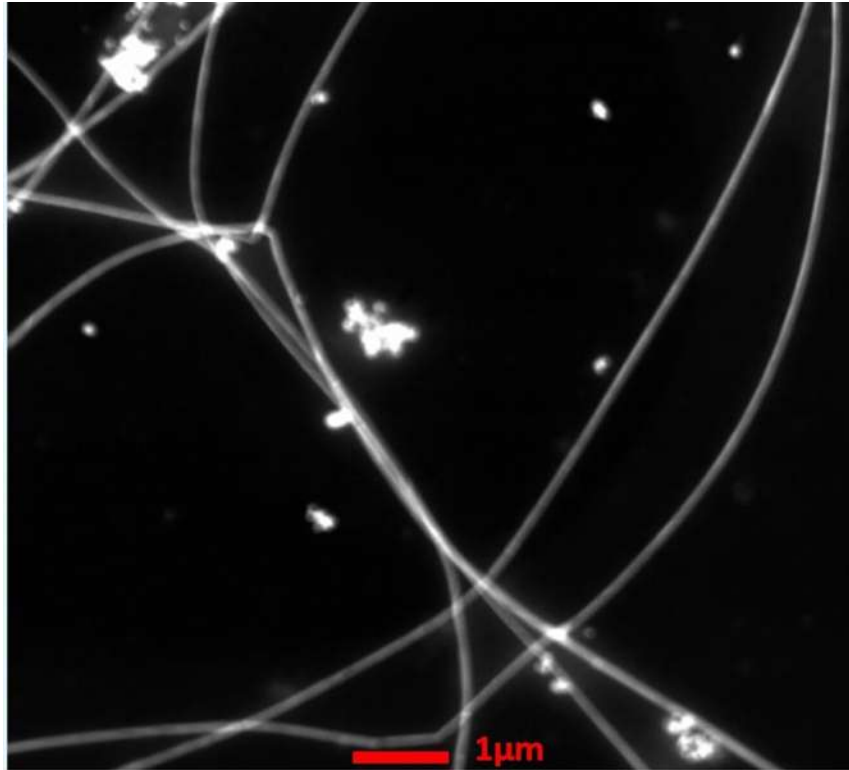
algunos casos la clorofila. Además, como complemento se analizaron los subproductos de la reacción como son Cu, Cu-Ag, Cu-Cl, Cu-Ag-Cl, CuO<sub>x</sub>, Cu (OH)<sub>x</sub> y CuS<sub>x</sub>, así como las sales de NaCl y KCl, pero no se observó coincidencia con más de un pico.



**Figura 4.24** Difractograma de rayos X de los AgNWs.

Para corroborar la estructura cristalina de los AgNWs se realizaron diversas técnicas por medio de imágenes de MET. Es importante mencionar se evaluaron aproximadamente 10 imágenes de cada una de las técnicas para que los resultados sean confiables, pero, en el siguiente apartado se presentan las imágenes más representativas.

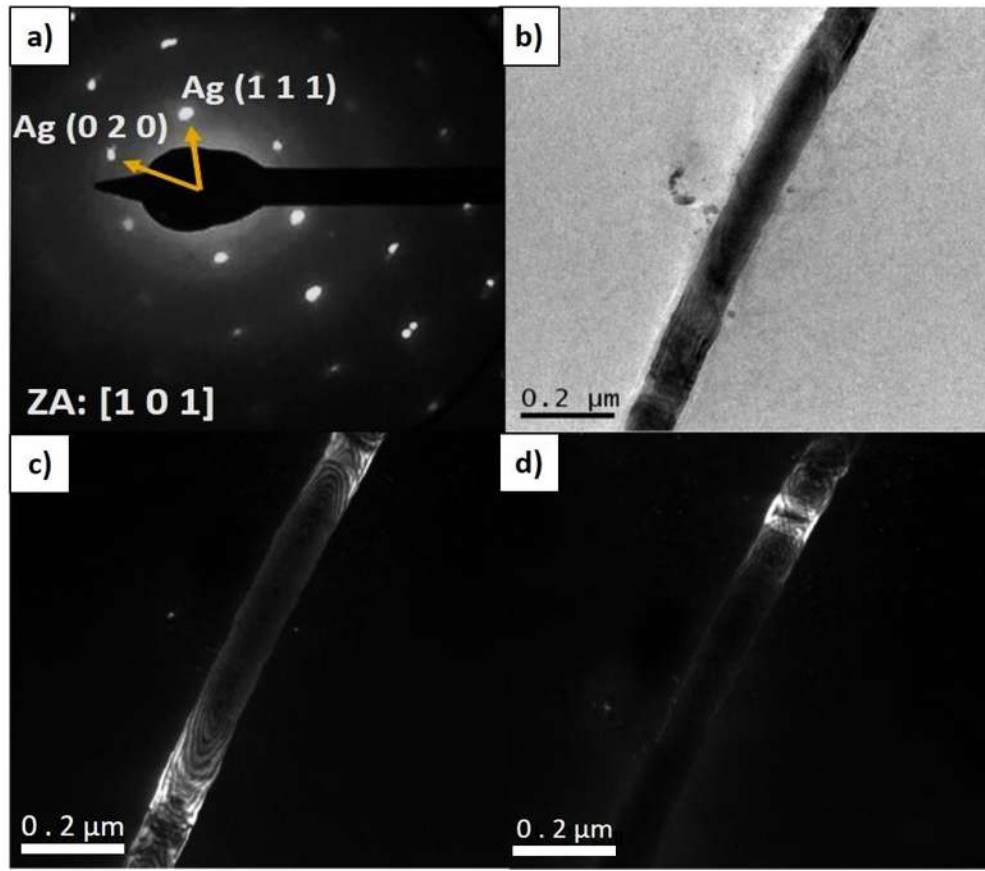
La Figura 4.25, exhibe la imagen de microscopía de transmisión de campo oscuro y contraste de masa (HAADF, por sus siglas en inglés) de los nanoalambres, el cual ilustra el mapeo de composición de Ag metálica, donde éste aparece brillante, dado su mayor número atómico y afirma que el ancho es inferior a los 100 nm y longitud de superior a los 12 μm. Además, es notoria la presencia de AgNPs que son las atribuidas a la unión con la estructura de los nanoalambres.



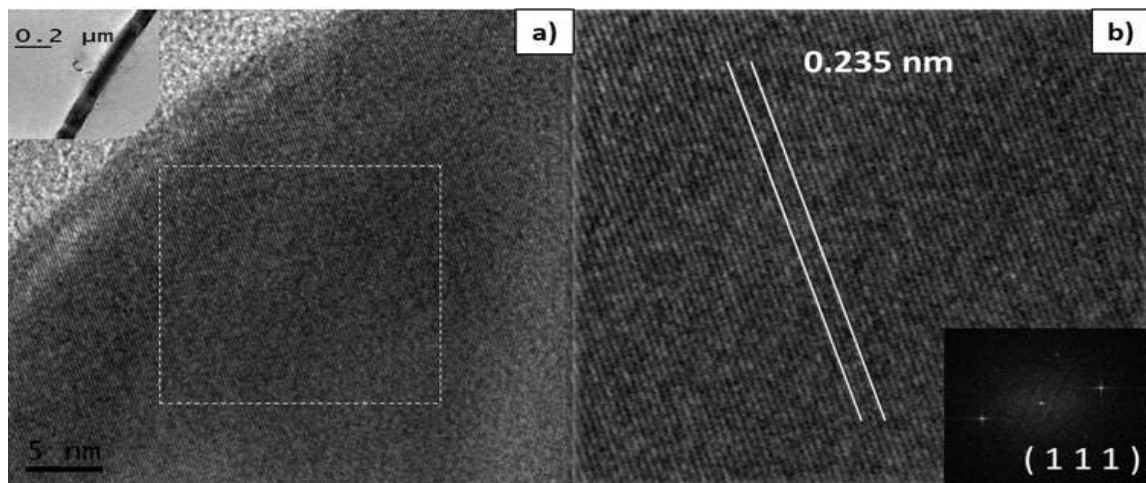
**Figura 4.25** Imagen de contraste de masa de MET de los AgNWs.

También, se presenta en la Figura 4.26 (a) el patrón de difracción de electrones del nanoalambre, el cual presenta un patrón de puntos que se relaciona con una estructura monocristalina. También, en el apartado 4.26 (b) se ilustra la imagen de campo claro, la cual confirma la forma y ancho menor a los 100 nm. Finalmente, la Figura 4.26 (c-d) exhibe dos imágenes de campo oscuro de dos diferentes ejes de zona, mostrando que pertenece al mismo material. Es importante mencionar que la composición del nanoalambre puede ser analizada por medio del patrón de difracción, y por el empleo de otra técnica como es la transformada rápida de Fourier.

La Figura 4.27 (a-b) muestra la imagen de alta resolución, donde se puede observar la estructura interna del nanoalambre, denotada por la resolución lineal dentro de éste. Mediante la transformada rápida de Fourier (anexa en la Figura 4.27(b)), se confirma la naturaleza cristalina, así como las distancias interplanares entre las líneas de difracción del nanoalambre (la transformada de Fourier es un promedio de todas estas líneas), en la cual se presenta la distancia aproximada a 2.35 Å, que coincide con los planos del tipo (1 1 1), perteneciente a la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) del cristal de plata.



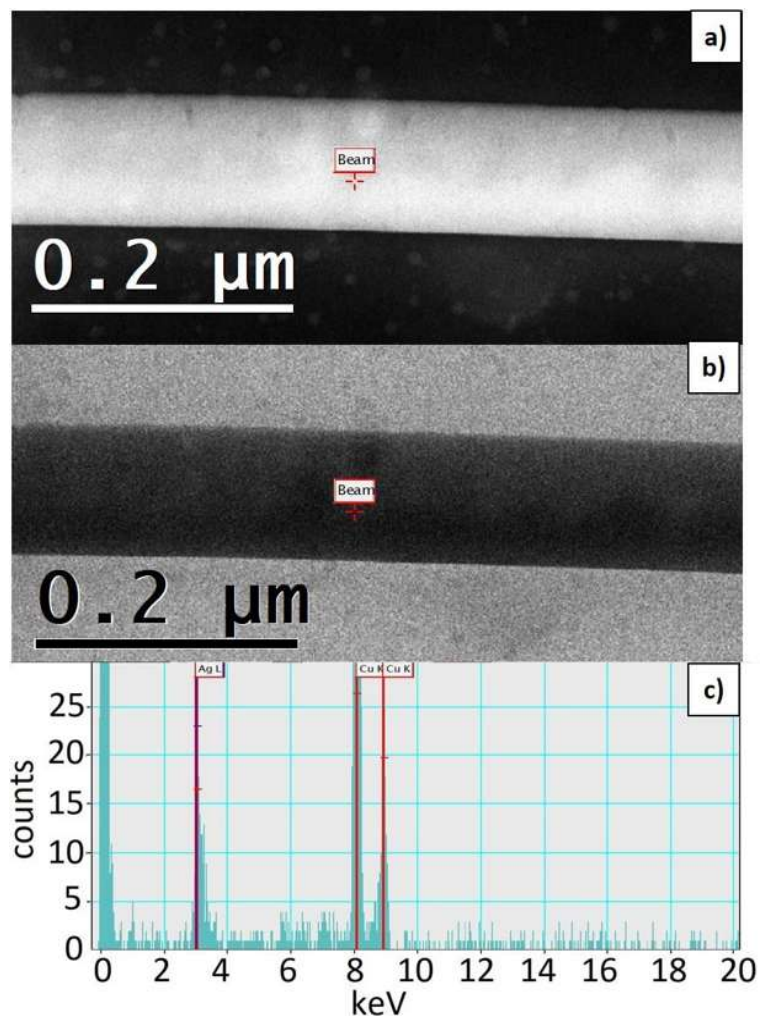
**Figura 4.26** Imágenes de MET a) Patrón de difracción de los AgNWs, b) Campo claro c) Campo oscuro 1, d) Campo oscuro 2.



**Figura 4.27** Imagen de alta resolución (HRTEM) de los AgNWs en donde a) Imagen original b) Zoom de la imagen indicando la naturaleza cristalina de éstos.

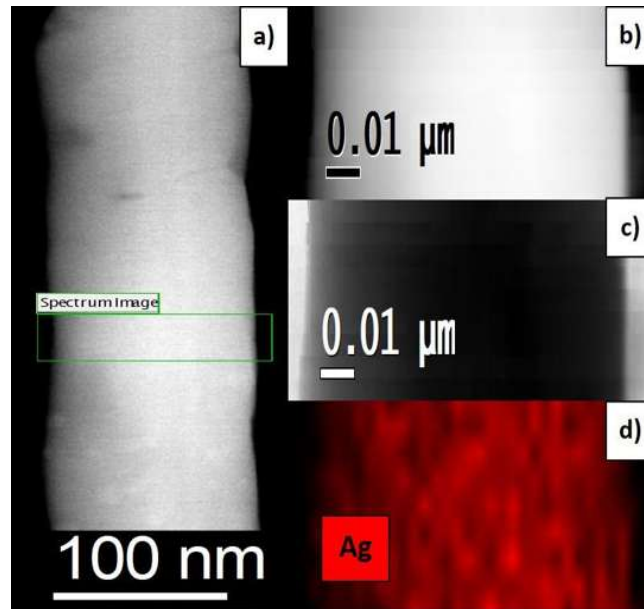
Adicionalmente, se añaden dos análisis químicos realizados por MET, con el objetivo de complementar la información de la composición de éstos. La Figura 4.28 (a-c), relaciona las

imágenes de campo claro y oscuro del nanoalambre de plata, en el cual se realizó el análisis químico puntual. En el apartado de la Figura 4.28c se distingue la presencia del elemento Ag, evidenciando que el nanoalambre está compuesto de este cristal.



**Figura 4.28** Imágenes de MET a) Campo claro, Campo oscuro y c) Análisis químico puntual.

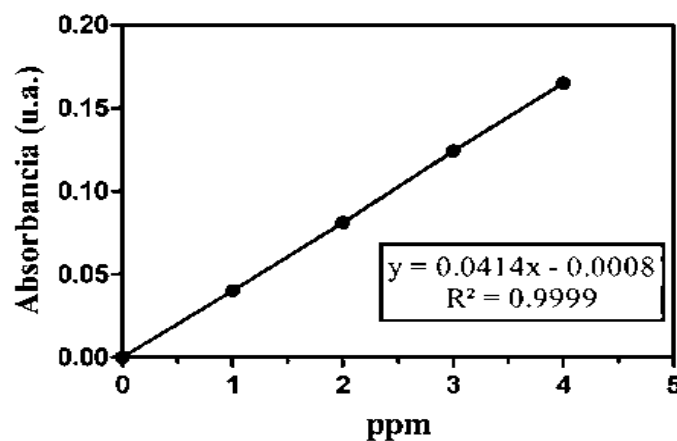
Por otro lado, en la Figura 4.29 (a-d) se ilustra el mapeo químico del nanoalambre de plata, en el cual, el apartado (a) presenta la imagen completa de campo oscuro, mostrando el área de análisis. Además, el apartado 4.29 (b) y (c) exhibe las ampliaciones de la zona de análisis en dos tipos de imágenes, siendo campo oscuro y claro, respectivamente. Finalmente, en el apartado 4.29 (d) se muestra que la zona de color rojo pertenece a un solo elemento, siendo éste plata metálica.



**Figura 4.29** Mapeo químico de AgNWs a) Campo oscuro (imagen original), b) Campo oscuro de la zona de análisis, c) Campo Claro de la zona de análisis y d) Zona del elemento plata mostrada en color rojo.

#### 4.6 Mediciones del potencial de membrana mitocondrial

Uno de los objetivos trazados en el presente proyecto fue el conocer la toxicidad de los nanomateriales sintetizados, por esta razón, es importante conocer un aproximado de la concentración de éstos. La determinación de la concentración se realizó por medio de espectroscopía de absorción atómica de acuerdo a la cantidad de iones  $\text{Ag}^+$  que no reaccionaron en el proceso de reducción. La concentración de iones de  $\text{Ag}^+$  se calculó de acuerdo a la curva ajustada a las soluciones estándar (ver Figura 4.30).



**Figura 4.30** Curva patrón de iones de Ag para el cálculo de la concentración de las AgNPs y AgNWs sintetizados.

Primeramente, se realizó el lavado por medio de centrifugación de las muestras que contenían los AgNWs y AgNPs. Una vez que se obtuvo el residuo, se analizó la absorbancia de las soluciones por medio de espectroscopía de absorción atómica y mediante la curva patrón se le asignó un valor en concentración, lo mismo se realizó para la solución AgNO<sub>3</sub> a una concentración de 5 mM, el empleo de éste valor se debe a que los mejores resultados para la síntesis de nanomateriales presentados en el presente trabajo parten de ésta concentración; por lo tanto, la diferencia entre los iones de Ag iniciales y los restantes en la solución del lavado resulta ser proporcional a la cantidad de iones que se redujeron a estructuras de plata. La Tabla 4.2, muestra los valores resultantes en ppm del análisis mencionado con anterioridad, así como la eficiencia del proceso de reducción. Es importante mencionar que, a partir de éste ensayo se obtuvieron resultados aproximados, debido a que se estimó que todos los iones de Ag reaccionaron a AgNPs o AgNWs. Además, posiblemente algunos pudieron haber quedado en la solución que contiene los nanomateriales y no en el residuo que se analizó.

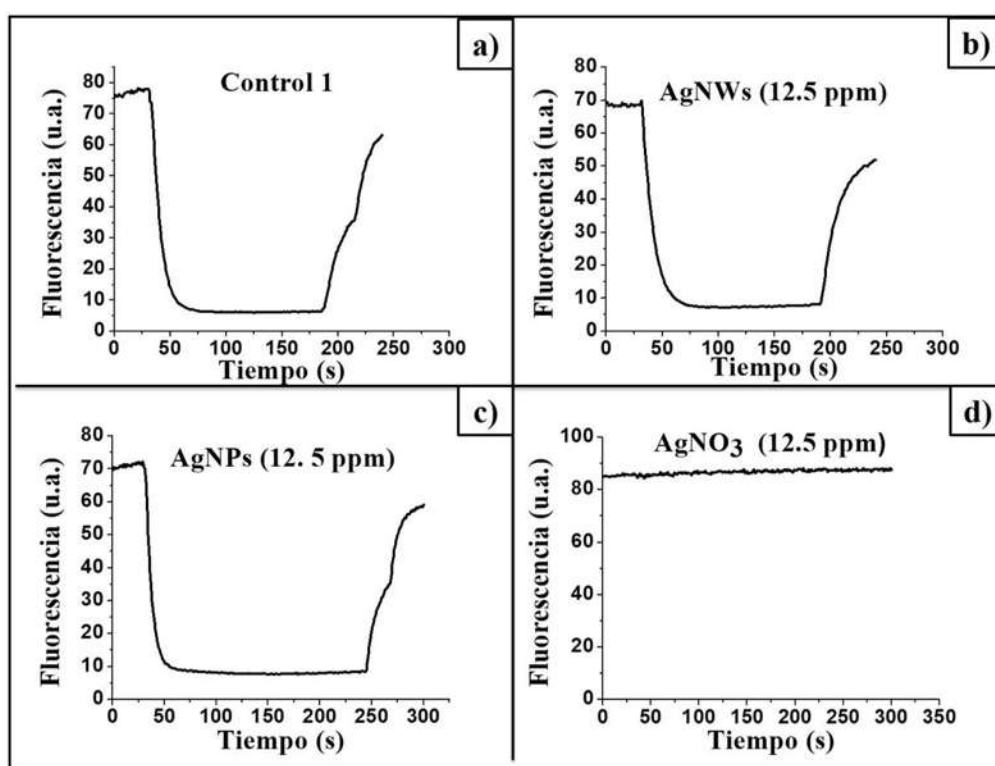
**Tabla 4.2** Resultados del análisis de concentración de AgNPs y AgNWs.

Muestra	ppm (Ag <sup>+</sup> )	Δ Ag <sup>+</sup> (ppm)	Eficiencia (%)
AgNWs	252.17	275.97	52.2532
AgNPs	84.09	444.05	84.0781
AgNO <sub>3</sub> (5 mM)	528.14		

Para conocer la toxicidad de los nanomateriales, se realizó el ensayo de potencial de membrana con 4 diferentes concentraciones, siendo éstas: 12.5 25, 50 y 100 ppm. También se añadió el AgNO<sub>3</sub> con el propósito de comparar el efecto de los iones contra los nanosólidos sintetizados.

Primeramente, en la Figura 4.31 (a) (evaluación del estudio de toxicidad en mitocondrias de hígado de rata para una concentración de 12.5 ppm) se muestra el control del primer ensayo que contiene las mitocondrias sin ser expuestas a algún factor externo, se puede percibir como la fluorescencia a aproximadamente un tiempo de 30 s disminuye, suscitado por la adición de la safranina, debido a que es un catión lipofílico que posee fluorescencia y decrece como consecuencia de una diferencia entre cargas originado por el trabajo de las mitocondrias. Posteriormente, se añadió el succinato como energizador de las mitocondrias, con la finalidad de favorecer a la actividad del potencial de membrana, por ésta razón, se analizó que la fluorescencia basal se mantuviera constante en el

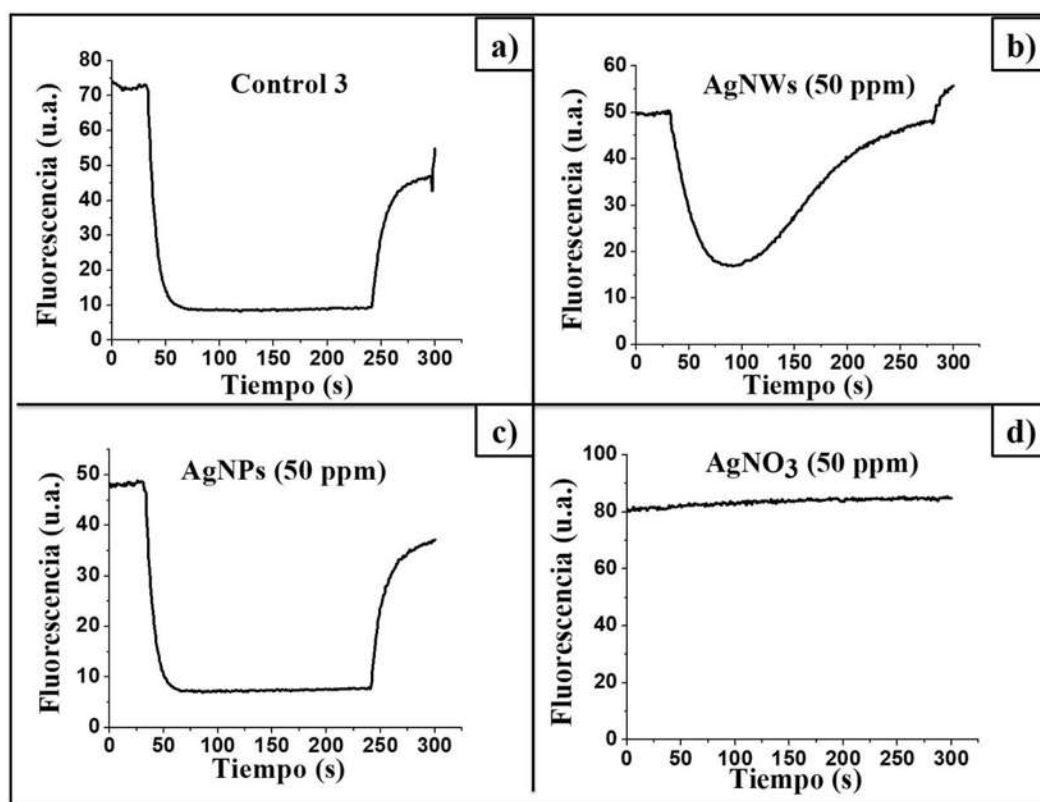
periodo de tiempo aproximado de 200 s. Finalmente, se agregó el desacoplante carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP), que tiene la función de abatir el potencial de membrana, ocasionando el aumento de la fluorescencia o su retorno hacia el punto inicial de partida. En el caso del apartado 4.31 (b) y (c) que corresponden a las mitocondrias expuesta a AgNWs y AgNPs a una concentración de 12.5 ppm respectivamente, se aprecia que el comportamiento es similar al del control 1, por lo tanto, en éste ensayo los nanomateriales no contribuyeron con algún efecto en el potencial de membrana. Por el contrario, para el caso de la sal AgNO<sub>3</sub>, la línea de fluorescencia se mantuvo fija, atribuyéndose a la toxicidad de esta sal hacia las mitocondrias y como consecuencia la pérdida de funciones metabólicas.



**Figura 4.31** Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (12.5 ppm), c) Expuestas a AgNPs (12.5 ppm) y d) Expuestas a AgNO<sub>3</sub> (12.5 ppm).

Se presenta el ensayo 2 en el apartado 4.32 (a) (consistió en evaluar el efecto tóxico de los nanomateriales a una concentración de 25 ppm) el control 2 que pertenece a las mitocondrias sin exposición a algún nanomaterial, el cual verifica el comportamiento adecuado, que consiste en un cambio de fluorescencia a los 30 s aproximadamente, el mantenimiento de la fluorescencia basal por 200 s y el desacoplamiento completo a los 300 s. En el caso del apartado 4.32 (b), se percibe

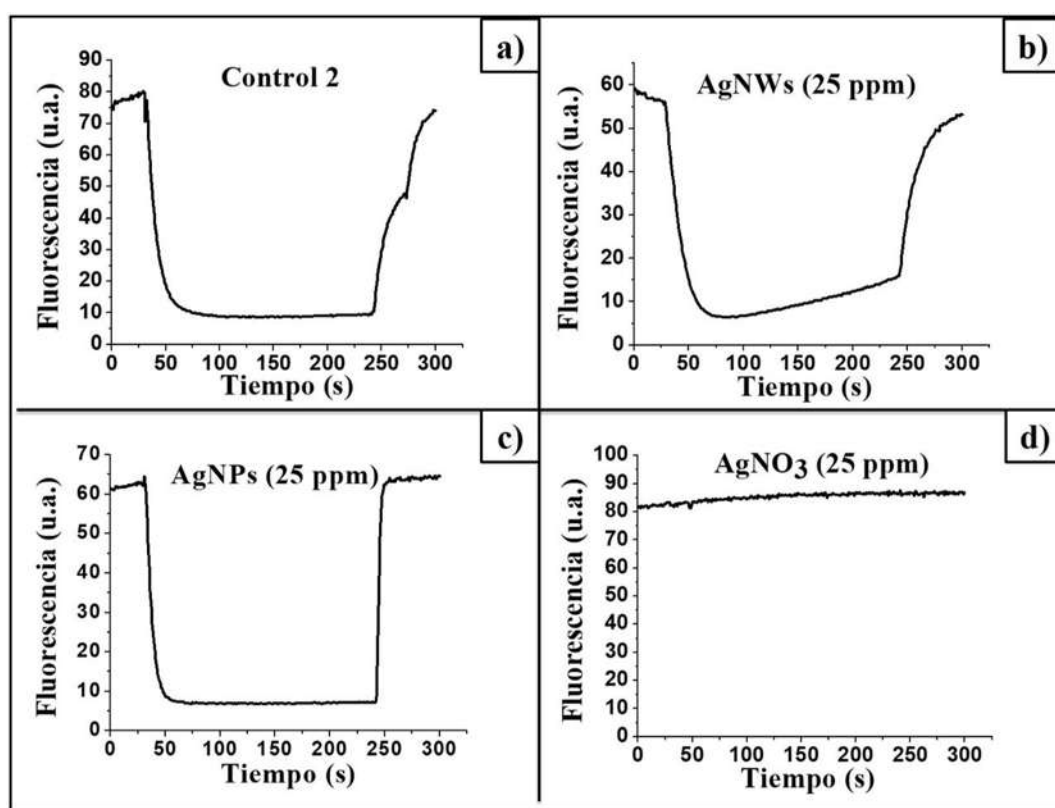
un cambio en la fluorescencia a los 150 s que se atribuyen al efecto de los AgNWs a concentración de 25 ppm, promovido por alteraciones en el intercambio de iones en la membrana. Cabe destacar, que, aunque se muestra el inicio de toxicidad, el cambio en el potencial de membrana se mantiene funcional. También, en el apartado 4.32 (c) se exhibe el efecto de las AgNPs a concentración de 25 ppm, pero no se notó algún efecto debido a que su comportamiento fue similar al de las mitocondrias sin exposición a los nanomateriales. Finalmente, como se esperaba en el apartado 4.33 (d), se apreció que la sal  $\text{AgNO}_3$  presentó efecto de toxicidad a 25 ppm, ya que, desde el inicio del ensayo hasta el final no se presentó diferencial de potencial en el intercambio iónico de la membrana.



**Figura 4.32** Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (25 ppm), c) Expuestas a AgNPs (25 ppm) y d) Expuestas a  $\text{AgNO}_3$  (25 ppm).

El apartado 4.33, presenta el tercer ensayo de toxicidad (evaluación de los nanomateriales a concentración de 50 ppm) donde se expone el control 3 del ensayo demostrando el comportamiento de las mitocondrias sin exposición a los nanomateriales, el cual refleja el mismo patrón que los ensayos anteriores, con un decremento de la fluorescencia causado por la adición de la safranina, el mantenimiento de la línea basal por la función del succinato y el retorno de la línea de

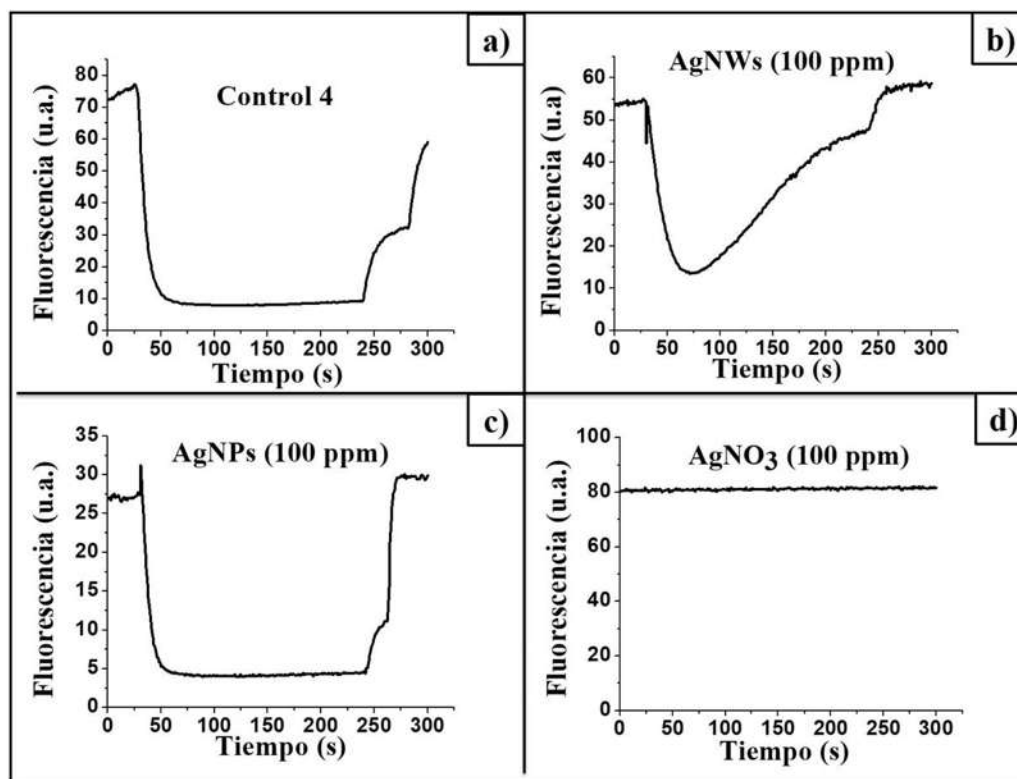
fluorescencia a los 300 s en consecuencia del desacoplante CCCP. En el caso del apartado 4.33 (b), se confirmó la toxicidad de los AgNWs, apreciándose una pérdida de las funciones metabólicas mayor a la presentada con anterioridad para 25 ppm, esto se debe a que cuando línea basal debe mantenerse constante, hay un cambio en la fluorescencia entre el rango de 100 -150 s, siendo atípico, ya que el desacoplante CCCP se adicionó a los 200 s. En el caso de las AgNPs (ver figura 4.33 (c)), no se observó cambio alguno en las funciones metabólicas de las mitocondrias, esto indicando que los nanosólidos de plata en forma de esferas no propician el mismo daño que aquel en forma de nanoalambres. También, en el apartado 4.33 (d) se manifiesta el efecto de la sal  $\text{AgNO}_3$ , el cual de acuerdo a los resultados anteriores concuerda con el efecto tóxico.



**Figura 4.33** Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (50 ppm), c) Expuestas a AgNPs (50 ppm) y d) Expuestas a  $\text{AgNO}_3$  (50 ppm).

El último ensayo consistió en el análisis del cambio en el potencial de membrana (causado por los nanomateriales y sal  $\text{AgNO}_3$  a una concentración de 100 ppm). En el panel 4.34 (a), se aprecia como en todos los ensayos anteriores la muestra control, que consistió en las mitocondrias sin exposición a los materiales mencionados, el cual verifica que las mitocondrias son funcionales y por lo tanto son viables para confirmar la toxicidad. Además, en la Figura 4.34 (b), se anexa el

efecto de los AgNWs para una concentración de 100 ppm, el cual corroboró la toxicidad de éstos a medida que se incrementa la concentración, ya que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial fue apreciada en un rango de 50-100 s. Es importante mencionar, que, aunque no se realizaron ensayos posteriores a concentraciones mayores, queda evidenciado que los AgNWs presentan efectos negativos en el gradiente de concentración de las células, esto conllevando a la pérdida de una de las funciones más importantes dentro de las mitocondrias. En el caso del apartado 4.34 (c) se observa que las AgNPs no fomentaron daño en el proceso del potencial de membrana mitocondrial a 100 ppm, esto coincidió con los casos anteriores, los cuales demostraron comportamientos similares para las muestras estudiadas. El efecto contrario ocurrió para aquellas muestras que se analizaron con la presencia del  $\text{AgNO}_3$ , ya que en todas las concentraciones evaluadas se demostró la toxicidad de la plata en forma iónica (ver Figura 4.34 (d)).



**Figura 4.34** Potencial de membrana mitocondrial a) Sin exposición b) Expuestas a AgNWs (100 ppm), c) Expuestas a AgNPs (100 ppm) y d) Expuestas a  $\text{AgNO}_3$  (100 ppm).

A lo largo del ensayo del potencial de la membrana mitocondrial se conoció el efecto de toxicidad de los AgNWs, AgNPs y la sal precursora  $\text{AgNO}_3$  a diferentes concentraciones. En el caso de los AgNWs es evidente que la toxicidad por debajo de 12.5 ppm es nula, no obstante, superior a 25

ppm comienzan los efectos negativos en el potencial de membrana, esto es importante conocerlo, ya que, la concentración mínima de daño está comprendida dentro del rango anterior mencionado, por eso, para un trabajo futuro es interesante manejar concentraciones intermedias a las estudiadas en la presente investigación, con el objetivo de conocer el valor exacto de concentración mínima inhibitoria del proceso de intercambio de iones. Para el caso de las AgNPs, no se presentó daño alguno a las concentraciones estudiadas, aunque, esto no significa que a concentraciones superiores no pueda ocurrir. Por esta razón sería importante para el futuro evaluar concentraciones superiores, además, emplear otros ensayos como complemento a la investigación de la toxicidad, ya que, aunque las AgNPs no causaron daño al potencial de membrana mitocondrial, puede ocasionarlo para otras funciones metabólicas. Además, se observó que las nanoestructuras de plata en forma esférica presentaron menor toxicidad en comparación de los nanoalambres en las mitocondrias, esto demuestra que la forma si influye en el mecanismo de acción en los distintos organismos, ya que hay algunos estudios que demuestran que la toxicidad en bacterias es mayor con nanomateriales esféricos [47]. Lo anterior nos hace pensar que el contacto directo con nanopartículas no es perjudicial a concentraciones bajas, esto se debe a que las AgNPs eliminan bacterias y no dañan a las mitocondrias, aunque, para aplicaciones que involucren la salud humana, es necesario una mayor cantidad de ensayos y evaluaciones en distintos organismos. Finalmente, se comprobó que el  $\text{AgNO}_3$  fue la solución que presentó mayor toxicidad, éste resultado es interesante, porque el efecto de los iones y los nanosólidos de Ag es completamente diferente, esto puede ser causado por los agentes estabilizantes, ya que los compuestos orgánicos pueden ser los encargados de reducir la toxicidad al momento de rodear las estructuras inorgánicas de plata.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

A partir de los estudios de caracterización realizados mediante espectroscopía UV-Vis, MEB, DRX y MET se comprobó la reducción de iones de plata hasta nanosólidos para obtener nanopartículas monometálicas de plata y nanoalambres de plata, mediante el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* preparados a temperatura ambiente y 60 °C.

Respecto a los estudios de potencial reductor DPPH\* se verificó que la planta *Lavandula angustifolia* posee una captación de radicales libres por encima del 93% en las tres concentraciones estudiadas, siendo este porcentaje mayor al del reactivo comercial BHT a una concentración de 10 mM.

Se eligió la concentración de 0.02 g/ml como la inicial en el proceso de formación de AgNPs porque el potencial reductor no está asociado al aumento de la concentración del extracto, es decir para la optimización de recursos es necesario el uso de menos materiales para lograr los resultados esperados.

Se identificó que la capacidad antioxidante es específica sobre el radical libre DDPH\*, y para el caso de la síntesis de nanopartículas metálicas es importante la afinidad de los compuestos antioxidantes hacia el metal.

Como complemento, se realizó el ensayo de cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu, que demostró, que la infusión de planta *Lavandula angustifolia* a temperatura ambiente y 60°C presentó los valores más equilibrados, ya que posee compuestos que actúan de manera equitativa como agentes reductores y estabilizadores.

Además, se verificó por medio de espectroscopia FT-IR que los compuestos aromáticos están mayormente asociados a la reducción y estabilización de las nanopartículas monometálicas y nanoalambres de plata.

Las condiciones más adecuadas en la síntesis de AgNPs fueron, el extracto de la planta *Lavandula angustifolia* a concentración de 0.01 g/ml y 5 mM de la sal precursora AgNO<sub>3</sub>.

La espectroscopía UV-Vis ratificó la formación de AgNPs por medio de la banda SPR alrededor de los 480 nm.

Mediante espectroscopía de absorción atómica se estimó que la cantidad aproximada de plata reducida fue de 445 ppm con una eficiencia en la reacción del 84 %.

A través de MEB, se observó una población densa de AgNPs con diferentes formas y tamaños inferiores a los 100 nm. El análisis por EDS corroboró la presencia de plata elemental.

Mediante DRX y MET se confirmó la presencia de sólidos reducidos de plata con estructura FCC y tamaño promedio de 18 nm con dos tipos de formas, donde las más pequeñas son esféricas y los más grandes tetraedros truncados.

Se logró mejorar la distribución por medio de la velocidad de agitación de 2 STIR y un periodo de tiempo de 21h. Adicionalmente, se obtuvo el subproducto no deseado AgCl.

Por otro lado, fue posible sintetizar por primera vez AgNWs a través de un método verde empleando la planta *Lavandula angustifolia* como agente reductor y estabilizante. Esto se logró para una concentración final de extracto de 0.005 g/ml preparado a temperatura ambiente y una relación final de sal  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{AgNO}_3$  de 2.5 mM y 5 mM, respectivamente.

La espectroscopía UV-Vis corroboró la formación de AgNWs mediante una banda SPR alrededor de los 500 nm y se estimó por medio de espectroscopía de absorción atómica la cantidad aproximada de plata reducida, siendo 276 ppm con una eficiencia en la reacción del 51 %.

Por medio de MEB, se observaron estructuras en formas de estambres, que son los precursores de los AgNWs sintetizados, éstas estructuras de mayor tamaño fueron formadas como consecuencia de la sobresaturación que generó la sal de cobre en la solución y la de adición de una cantidad alta de sal precursora  $\text{AgNO}_3$ , esto se atribuyó a la formación de diversos núcleos dispuestos para la reducción.

También, se apreció que la centrifugación por duplicado a 12 000 rpm contribuyó a la formación de los nanoalambres, esto se debe al despliegue de las estructuras en forma de estambres, debido a que la energía asociada al centrifugado rompe las moléculas encargadas de la estabilización.

En vista de que el estado nano, no es un estado estable de la materia, causa el reagrupamiento de las moléculas orgánicas y los nanosólidos.

Se determinó que la longitud de los nanolambres fue superior a los 10  $\mu\text{m}$  con un ancho menor a los 100 nm.

Finalmente, por medio de las técnicas DRX y MET se reafirmó que los nanoalambres sintetizados pertenecen a monocristales con estructura FCC del cristal de plata.

Por otra parte, los ensayos de toxicidad en mitocondrias de hígado de rata Wistar arrojaron que la toxicidad de los iones Ag fue mayor a la de los nanosólidos de plata reducida, causado por los agentes orgánicos que se encargan de estabilizar las nanoestructuras.

Se comprobó que la toxicidad depende de la forma del nanomaterial y de los organismos evaluados, ya que, no se identificó algún daño por parte de las AgNPs a diferentes concentraciones. Además, se identificó que la concentración inicial de daño en el potencial es de 25 ppm, y éste aumenta a medida que la concentración se incrementa.

## **5.1 Recomendaciones**

- Realizar un lavado menos agresivo a la planta con la finalidad de disminuir la presencia del ion Cl.
- Emplear mejores polímeros de recubrimiento de rejillas para MET, para obtener mejores imágenes de análisis.
- Evaluar por medio de MET y microscopía confocal el mecanismo de acción de los nanomateriales.
- Complementar estudios de potencial Z para determinar la influencia de las cargas eléctricas en el mecanismo de acción en las mitocondrias.

## **5.2 Trabajo futuro**

Algunas de las estrategias que se pueden emplear es la variación de la temperatura de síntesis y la adición de compuestos orgánicos que modifiquen el pH. En el caso de los AgNWs, es necesario incrementar la eficiencia del proceso de síntesis, esto puede ser logrado con el empleo de una sola sal precursora por medio de la sobresaturación del sistema de trabajo. Finalmente, para un amplio

estudio de la toxicidad de los nanomateriales es necesario complementar los estudios con técnicas como oximetría e hinchamiento mitocondrial.

De los ensayos de potencial reductor y cuantificación de fenoles se determinó que los valores obtenidos para las plantas *Origanum vulgare* y *Sedum preaultum* son complementarios, esto se debe a los fenómenos inversos que presentaron, siendo una gran capacidad como agente reductor para la planta *Sedum preaultum* y una alta capacidad estabilizante para la planta *Origanum vulgare*, se hace referencia a esto, porque, por medio del empleo de éstas de manera conjunta en el proceso de formación de AgNPs, se podrían obtener estructuras homogéneas.

## CAPÍTULO VI

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RAJAN R, CHANDRAN K, HARPER S L, YUN S-I and KALAICHELVAN P T. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*. 70, 356-373, 2015.
- [2] SREEKANTH T V M, RAVIKUMAR S and EOM I-Y. Green synthesized silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* root extract for efficient protein binding, antioxidant and cytotoxicity activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 141, 100-105, 2014.
- [3] ABDEL-MOHSEN A M, HRDINA R, BURGERT L, ABDEL-RAHMAN R M, HAŠOVÁ M, ŠMEJKALOVÁ D, KOLÁŘ M, PEKAR M and ALY A S. Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 92(2), 1177-1187, 2013.
- [4] RATHI SRE P R, REKA M, POOVAZHAGI R, ARUL KUMAR M and MURUGESAN K. Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 135, 1137-1144, 2015.
- [5] AHMED S, AHMAD M, SWAMI B L and IKRAM S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*. 7(1), 17-28, 2016.
- [6] ACOFARMA. Ficha de datos de seguridad 2006. Disponible en: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/1894-0cc19117e8b7e17f227e02b1b2ad2eddfc1dae9a/main/files/Polivinil%20pirrolidona%20yodada.pdf>. [Consultado 30 de Mayo del 2018].
- [7] MA H, WANG J, ABDEL-RAHMAN S Z, BOOR P J and KHAN M F. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 233(2), 247-253, 2008.
- [8] HARBORNE J B and WILLIAMS C A. 9 Phytochemistry of the genus *Lavandula*. *Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*. 86, 2002.
- [9] ZAIN N M, STAPLEY A G F and SHAMA G. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*. 112, 195-202, 2014.

- [10] RODRÍGUEZ F D D C. Introducción a los nanomateriales ed. UNAM. Cuatitlán Izcalli. 2012.
- [11] SCIENCES P. Micro and Nano Technology. 2016. Disponible en: <http://www.particlesciences.com/services/micro-nano-technology/>. [Consultado 30 de Mayo del 2018].
- [12] ALMENDÁREZ-CAMARILLO and GONZÁLEZ-CALDERÓN. Nanomateriales: su crecimiento, caracterización estructural y tendencias. CONCYTEG. 772-787, 2011.
- [13] BANDHYOPADHYAY A K. Nanomaterials ed. New Age International. India. 2008.
- [14] POLO; J D C and MERCADO L A D. SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA Y MODIFICACIÓN CON PULPA DE PAPEL PARA APLICACIÓN ANTIMICROBIAL. Licenciatura Facultad de Ingeniería Química Universidad de Cartagena Cartagena, Colombia 2013.
- [15] NAGARAJAN R, HATTON T A, COLLOID A C S D O, CHEMISTRY S and MEETING A C S. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization. ed. American Chemical Society. 2008.
- [16] LLAMAZARES S M R. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y NANO-ORDENAMIENTOS METÁLICOS EMPLEANDO LA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN.
- [17] CAO G and WANG Y. Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications. ed. World Scientific. 2011.
- [18] ZHANG P, WYMAN I, HU J, LIN S, ZHONG Z, TU Y, HUANG Z and WEI Y. Silver nanowires: Synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications. Materials Science and Engineering: B. 223, 1-23, 2017.
- [19] DUPAS C and LAHMANI M. Nanoscience: Nanotechnologies and Nanophysics. ed. Springer Berlin Heidelberg. 2007.
- [20] MEYYAPPAN M and SUNKARA M K. Inorganic Nanowires: Applications, Properties, and Characterization. ed. CRC Press. 2009.
- [21] NGO C and VAN DE VOORDE M. Nanotechnology in a Nutshell: From Simple to Complex Systems. ed. Atlantis Press. 2014.
- [22] POOLE C P and OWENS F J. Introduction to nanotechnology : selected topics. ed. John Wiley. Hoboken, NJ. 2003.

- [23] MENDEZ M A A. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. Doctorado. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional México, DF 2009.
- [24] 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), 513-517, 2011.
- [25] BASAVARAJA S, BALAJI S, LAGASHETTY A, RAJASAB A and VENKATARAMAN A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Materials Research Bulletin*. 43(5), 1164-1170, 2008.
- [26] YUAN C-G, HUO C, YU S and GUI B. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Capsicum annuum* var. *grossum* pulp extract and its catalytic activity. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. 85, 19-26, 2017.
- [27] SAIFUDDIN N, WONG C and YASUMIRA A. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *Journal of Chemistry*. 6(1), 61-70, 2009.
- [28] ANASTAS P T and WARNER J C. Principles of green chemistry. *Green chemistry: Theory and practice*. 29-56, 1998.
- [29] DURÁN N, MARCATO P D, DURÁN M, YADAV A, GADE A and RAI M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(5), 1609-1624, 2011.
- [30] VALVERDE V. *Lavandula angustifolia*. 2013. Disponible en: <http://www.scoop.it/t/lavanda>. [Consultado 30 de mayo del 2018].
- [31] GILMAN E F. *Lavandula angustifolia* Lavender, English Lavender. 2011. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FP/FP33700.pdf>. [Consultado 30 de Mayo del 2018].
- [32] ONLINE B. El cultivo de la lavanda 2014. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/cultivolavanda.htm>. [Consultado 30 de Mayo del 2018].
- [33] RYMAN D. *Aromaterapia: enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales*. ed. Kairós. 1995.
- [34] KOOLMAN J and RÖHM K H. *Bioquímica: texto y atlas*. ed. Médica Panamericana. 2005.
- [35] MUNN E A. *The Structure of Mitochondria*. ed. Elsevier Science. 2014.

- [36] REN Y-Y, YANG H, WANG T and WANG C. Green synthesis and antimicrobial activity of monodisperse silver nanoparticles synthesized using Ginkgo Biloba leaf extract. *Physics Letters A*. 380(45), 3773-3777, 2016.
- [37] FERNÁNDEZ J G, FERNÁNDEZ-BALDO M A, BERNI E, CAMÍ G, DURÁN N, RABA J and SANZ M I. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*. 51(9), 1306-1313, 2016.
- [38] SHANTHI S, DAVID JAYASEELAN B, VELUSAMY P, VIJAYAKUMAR S, CHIH C T and VASEEHARAN B. Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dabhl and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microbial Pathogenesis*. 93, 70-77, 2016.
- [39] HUSSEINY S M, SALAH T A and ANTER H A. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 4(3), 225-231, 2015.
- [40] LÓPEZ-MIRANDA J L, VÁZQUEZ M, FLETES N, ESPARZA R and ROSAS G. Biosynthesis of silver nanoparticles using a *Tamarix gallica* leaf extract and their antibacterial activity. *Materials Letters*. 176, 285-289, 2016.
- [41] CHOWDHURY N R, MACGREGOR-RAMIASA M, ZILM P, MAJEWSKI P and VASILEV K. 'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 482, 151-158, 2016.
- [42] LÓPEZ-MIRANDA J L, BORJAS-GARCIA S, ESPARZA R and ROSAS G. Synthesis and Catalytic Evaluation of Silver Nanoparticles Synthesized with *Aloysia triphylla* Leaf Extract. *Journal of Cluster Science*. 27(6), 1989-1999, 2016.
- [43] PADALIA H, MOTERIYA P and CHANDA S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry*. 8(5), 732-741, 2015.
- [44] TARUNA, KAUSHAL J, BHATTI J and KUMAR P. Green synthesis and physico-chemical study of silver nanoparticles extracted from a natural source *Luffa acutangula*. *Journal of Molecular Liquids*. 224, Part A, 991-998, 2016.
- [45] SHOBIN L R, SASTIKUMAR D and MANIVANNAN S. Glycerol mediated synthesis of silver nanowires for room temperature ammonia vapor sensing. *Sensors and Actuators A: Physical*. 214, 74-80, 2014.

- [46] YANG C, TANG Y, SU Z, ZHANG Z and FANG C. Preparation of Silver Nanowires via a Rapid, Scalable and Green Pathway. *Journal of Materials Science & Technology*. 31(1), 16-22, 2015.
- [47] ASHKARRAN A A, ESTAKHRI S, NEZHAD M R H and ESHGHI S. Controlling the Geometry of Silver Nanostructures for Biological Applications. *Physics Procedia*. 40, 76-83, 2013.
- [48] AVELLA D M G, GARCÍA C A O and CISNEROS A M. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. En: *Memorias del Simposio de Metrología*. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro. eds. 2008.
- [49] PALOMINO L R, GARCÍA C M, GIL J H, ROJANO B A and DURANGO D L. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 16(3), 2009.
- [50] RAPPOPORT Z. *The Chemistry of Phenols*. ed. Wiley. 2004.
- [51] FERNÁNDEZ SEGOVIA I and FUENTES LÓPEZ A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- [52] ALEJANDRO G N M. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS NATURALES. Universidad Autónoma de Querétaro. *Rev Acad*. 1-4, 2009.
- [53] AINSWORTH E A and GILLESPIE K M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*. 2(4), 875-877, 2007.
- [54] SAAVEDRA-MOLINA A and DEVLIN T. Effect of extra-and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids*. 12(3), 293-298, 1997.
- [55] SECRETARÍA DE AGRICULTURA G, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. 2001. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf). [Consultado 30 de Mayo 2018].
- [56] V N B, C G L and R C H H. *Química de Alimentos: Manual de laboratorio*. ed. Universidad de Costa Rica. 2003.
- [57] ARBOLEDA G and SÁNCHEZ R M. Mitocondria y muerte celular. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*. 6(10), 190-200, 2008.
- [58] NAVARRETE J L C. Citometría de flujo en la evaluación de potencial de membrana y viabilidad celular de *helicobacter pylori*. Universidad de Concepción. 2005.

- [59] MANTOVANI A L L, VIEIRA G P G, CUNHA W R, GROppo M, SANTOS R A, RODRIGUES V, MAGALHÃES L G and CROTTI A E M. Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(6), 877-884, 2013.
- [60] VASILEVA I, DENKOVA R, CHOCHKOV R, TENEVA D, DENKOVA Z, DESSEV T, DENEV P and SLAVOV A. Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and melissa (*Melissa Officinalis*) waste on quality and shelf life of bread. *Food Chemistry*. 253, 13-21, 2018.
- [61] DUDA S C, MĂRGHITAŞ L A, DEZMIREAN D, DUDA M, MĂRGĂOAN R and BOBIŞ O. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*. 77, 499-507, 2015.
- [62] MOHANTY A S and JENA B S. Innate catalytic and free radical scavenging activities of silver nanoparticles synthesized using *Dillenia indica* bark extract. *Journal of Colloid and Interface Science*. 496, 513-521, 2017.
- [63] LOPES C R B and COURROL L C. Green synthesis of silver nanoparticles with extract of *Mimusops coriacea* and light. *Journal of Luminescence*. 199, 183-187, 2018.
- [64] AHLUWALIA V, ELUMALAI S, KUMAR V, KUMAR S and SANGWAN R S. Nano silver particle synthesis using *Swertia paniculata* herbal extract and its antimicrobial activity. *Microbial Pathogenesis*. 114, 402-408, 2018.
- [65] BALASHANMUGAM P, BALAKUMARAN M D, MURUGAN R, DHANAPAL K and KALAICHELVAN P T. Phytogetic synthesis of silver nanoparticles, optimization and evaluation of in vitro antifungal activity against human and plant pathogens. *Microbiological Research*. 192, 52-64, 2016.
- [66] SÁNCHEZ G R, CASTILLA C L, GÓMEZ N B, GARCÍA A, MARCOS R and CARMONA E R. Leaf extract from the endemic plant *Peumus boldus* as an effective bioproduct for the green synthesis of silver nanoparticles. *Materials Letters*. 183, 255-260, 2016.
- [67] AI M, DU Z, ZHU S, GENG H, ZHANG X, CAI Q and YANG X. Composite resin reinforced with silver nanoparticles–laden hydroxyapatite nanowires for dental application. *Dental Materials*. 33(1), 12-22, 2017.