



# UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE INVESTIGACION EN METALÚRGIA Y  
MATERIALES

“SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE Ag Y SU EVALUACIÓN  
ANTIBACTERIAL EN *ESCHERICHIA COLI*.”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN METALURGIA Y CIENCIAS  
DE LOS MATERIALES

PRESENTA

ING. EN MATERIALES FABIAN MARES BRIONES

ASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES GERARDO A. ROSAS TREJO

MORELIA MICHUACÁN, MÉXICO; ENERO DEL 2015



## ÍNDICE

<b>RESUMEN.</b> .....	1
<b>ABSTRACT.</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN.</b> .....	3
<b>OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.</b> .....	4
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.</b> .....	5
<b>JUSTIFICACIÓN.</b> .....	5
<b>HIPÓTESIS.</b> .....	5
<b>CAPÍTULO I.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
1.1. NANOTECNOLOGÍA. ....	6
1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES. ....	9
1.3. SÍNTESIS QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA. ....	12
1.4. PROPIEDADES Y USOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA, AgNPs. ....	13
1.5. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR MÉTODOS ECOLÓGICOS. ....	15
1.5.1. VELOCIDAD DE REACCIÓN. ....	23
1.5.2 PROPIEDADES ANTIBACTERIALES. ....	25
1.5.3 RELACIÓN FORMA/PROPIEDAD ANTIBACTERIAL. ....	28
1.6. POSIBLES COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS EMPLEANDO PLANTAS. ....	30
1.6.1 FLAVONOIDES. ....	31
1.6.2 TERPENOIDES. ....	32
1.6.3 AZÚCARES REDUCTORES. ....	32
1.6.4 PROTEÍNAS. ....	33

1.6.5 ÁCIDOS ORGÁNICOS Y METABÓLICOS SECUNDARIOS. ....	34
1.7 INFLUENCIA DE FACTORES EN LA FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR MEDIO DE PLANTAS. ....	34
1.7.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA. ....	35
1.7.2 RELACIÓN DE EXTRACTO DE PLANTA A CONCENTRACIÓN METÁLICA. ....	36
1.8 TAXONOMÍA DEL PIRUL. ....	40
<b>CAPÍTULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	42
2.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE PLANTA. ....	43
2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	46
2.3. PRUEBAS EN BACTERIAS E. COLI. ....	48
2.4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL. ....	49
2.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRA-VIOLETA-VISIBLE (UV-Vis). ....	49
2.4.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX) .....	50
2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB). ....	51
2.4.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET). ....	52
<b>CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	53
3.1 CARACTERIZACIÓN POR UV-VIS DE LAS MUESTRAS SUJETAS A REACCIÓN. ....	53
3.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X. ....	60
3.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO. ....	62
3.4. RESULTADOS OBTENIDOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN. ....	67
3.5. RESULTADOS OBTENIDOS EN EVALUACIÓN ANTIBACTERIAL DE NPs EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> . ....	75

3.6. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	77
<b>CAPÍTULO IV CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERENCIAS. ....</b>	<b>82</b>

### ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. 1. Esquema de la variedad de síntesis de nanopartículas y métodos de ensamble.....	8
Figura 1. 2. Clasificación donde los objetos poseen uno, dos o tres dimensiones en el rango nanométrico (1D, 2D y 3D).....	9
Figura 1.3. Clasificación de materiales de acuerdo con la dimensionalidad de las nanoestructuras. 0D, 1D, 2D, 3D. En la Ilustración 2D, tenemos capas incrustadas en la mayor parte y en los 3D cristalitos o granos.....	10
Figura 1. 4. Los diferentes tipos de nanomateriales según su composición. ....	11
Figura 1.5. Lista de nanopartículas de oro y plata de diversas morfologías, composiciones y estructuras, junto con sus ubicaciones típicas de bandas SPR (resonancia de plasma de superficie) en la región visible [17]......	14
Figura 1.6. Imágenes de TEM: (a) nanopartículas de plata, (b) nanopartículas de oro y sus respectivos histogramas (c) y (d) [23]. ....	17
Figura 1. 7. Espectro del plasmón superficial a diferentes concentraciones de extracto de hoja / concentración de iones metálicos (1:30, 2:30, 3:30, tiempo de contacto: 30 min). (a) NPs de Ag y (b) NPs de Au. ....	18
Figura 1.8. Cambio de color del extracto de mirra. (a) Formación de NPs de Ag de diferentes concentraciones de AgNO <sub>3</sub> : (b) 1mM, (c) 4 mM, (d) 10 mM, y (e) 15 mM.....	19
Figura 1. 9. Espectros UV-Vis de la formación de las NPs de Ag registradas como función de (a) el tiempo de la irradiación UV y (b) la concentración de AgNO <sub>3</sub> [9].....	20
Figura 1.10. Imagen de <i>Cardiospermum helicacabum</i> . ....	21

Figura 1.11. Extracto acuoso de la hoja de <i>Cardiospermum</i> con una concentración fija de 1 mM con intervalos de tiempo de 0, 24 y 48 horas, respectivamente de izquierda a derecha [25].	21
Figura 1.12. Imágenes representativas de las dispersiones de nanopartículas de plata sintetizadas con cantidades variables de la solución de extracto de ajo a 25 °C después de un tiempo de reacción de 48 horas (a) 1,0 ml, (b) 1,5 ml, (c) 2,0 ml, y (d) 2,5 ml [26].	22
Figura 1.13. Espectros UV-vis de NPs de Ag preparadas a diferentes volúmenes de NaOH [27].	24
Figura 1.14. Fotografías de (a) <i>Vitex negundo</i> y (b) Emulsión de Ag/ <i>Vitex negundo</i> después de 48 horas [31].	25
Figura 1. 15. Espectros de absorción UV-Vis de (a) <i>Vitex negundo</i> y (b) emulsión Ag/ <i>Vitex negundo</i> después de 48 horas [31].	26
Figura 1. 16. Imagen TEM y distribución de tamaño correspondiente de Ag / <i>Vitex negundo</i> después de 48 horas [31].	26
Figura 1.17. Ensayo de la actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> (a1-a4) y <i>S. aureus</i> (b1-b4): (a1, b1) <i>Vitex</i> extracto <i>negundo</i> (0,5 mg / ml), (a2, b2) AgNO <sub>3</sub> (0,17 moles/ L), (a3, b3) emulsión de Ag / <i>Vitex negundo</i> , (a4, b4) cefotaxima (30 mg) [31].	27
Figura 1. 18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando células normales de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . (A, C) y células cultivadas en soluciones que contienen nanopartículas de plata en agar (10 ppm). (B, D).	29
Figura 1. 19. Espectro FT-IR del extracto de hojas de <i>Aegle marmelos</i> a) antes y b) después de la reducción de AgNO <sub>3</sub> [35].	32
Figura 1. 20. Imágenes de MET que corresponden a las nanopartículas de oro sintetizadas a diferente temperatura de reacción de a) 30, b) 45, c) 60, d) 75 y e) 90°C [42].	36
Figura 1. 21. Espectro de absorción de UV-Vis de las nanopartículas de plata en función de la cantidad de <i>Malva parviflora</i> con una concentración fija de AgNO <sub>3</sub> [44].	37
Figura 1. 22. Espectro de UV-Vis de nanopartículas de plata a diferentes concentraciones de extracto de hojas de <i>H. cannabinus</i> (a, b, c, d vs 1, 2, 4 y 5ml de extracto respectivamente). En el recuadro se observan los cambios de color en la solución para las diferentes concentraciones del extracto [41].	39
Figura 1. 23. Hojas y fruto de <i>pirul</i> ( <i>Schinus molle</i> ).	40

Figura 2. 1. Esquema experimental desarrollado .....	42
Figura 2. 2. Equipo de molienda SPEX 8000-M.....	43
Figura 2. 3. Polvos de pirul pesados en balanza digital.....	44
Figura 2. 4. Parrilla eléctrica thermo scientific sp131325.....	45
Figura 2. 5. Extracto de pirul.....	45
Figura 2. 6. Diagrama seguido para la síntesis ecológica de nanopartículas de Ag.....	47
Figura 2.7. Equipo de Ultra violeta visible Usb 4000. ....	49
Figura 2. 8. Difractómetro de Rayos X Siemens D5000.....	50
Figura 2.9. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F.....	51
Figura 2.10. Microscopio Electrónico de Transmisión Phillips Tecnai F20.....	52
Figura 3. 1. Imágenes mostrando: a) nitrato de plata, b) el extracto del Pirul y c) solución después de la reacción de reducción.....	54
Figura 3. 2. Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 3mM de AgNO <sub>3</sub> variando los gramos de pirul añadidos.....	55
Figura 3.3. Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 5mM de AgNO <sub>3</sub> variando los gramos de pirul añadidos.....	57
Figura 3.4. Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 7mM de AgNO <sub>3</sub> variando los gramos de pirul añadidos.....	58
Figura 3. 5. Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 7mM de AgNO <sub>3</sub> variando los gramos de pirul añadidos.....	59
Figura 3.6. Patrones de difracción de rayos X en donde se muestran las fases indexadas: a) plata y b) nitrato de plata.....	61

Figura 3.7. Imagen de barrido en donde se muestran los polvos obtenidos del extracto de pirul a 700X. ....	62
Figura 3. 8. Micrografías electrónicas de barrido mostrando las nanopartículas obtenidas para una concentración de 5mM de AgNO <sub>3</sub> a diferentes ampliaciones: a) 20000, b) 100 000 y c) 300 000. ....	63
Figura 3. 9. Análisis químico puntual por EDS de los productos obtenidos correspondientes a la muestra con 5 mM. ....	64
Figura 3.10. Micrografía electrónica de barrido a 20000 X mostrando los resultados para la reacción de 9mM de AgNO <sub>3</sub> .....	65
Figura 3.11. Resultados obtenidos para la concentración de 9 mM de nitrato de plata empleada a) 20 000X y b) mapeo químico. ....	65
Figura 3.12. Micrografías de barrido obtenidas a 40000X de la misma zona por dos técnicas: a) Labe-MEB y b) Sei-MEB.....	66
Figura 3. 13. Imagen obtenida por Sei-MEB mostrando nanopartículas obtenidas de diferentes tamaños.....	67
Figura 3.14. Imágenes de campo claro en donde se muestran las nanopartículas obtenidas a diferentes concentraciones de AgNO <sub>3</sub> : a) 3, b) 5 y c) 7mM.....	68
Figura 3.15. Análisis químico realizado a las nanopartículas obtenidas a una concentración de 3mM de AgNO <sub>3</sub> .....	69
Figura 3.16. a-b: Nanopartículas de plata observadas por MET donde se percibe alta resolución. ....	69
Figura 3.17. Imagen de campo claro mostrando la influencia del pirul como agente desaglomerante. ....	70
Figura 3. 18. Micrografías de campo claro de la posible coalescencia de nanopartículas: a) nanopartículas separadas y b) coalescencia de Nps.....	71
Figura 3. 19 micrografías de campo claro de la posible coalescencia de 3 nanopartículas: a) nanopartículas individuales y b) nanopartícula policristalina alargada.....	71
Figura 3.20. Micrografías de campo claro mostrando nanopartículas de múltiple maclado a-d. ....	72
Figura 3. 21. Imagen de MET donde se aprecia una variedad de formas de las nanopartículas .....	73

Figura 3. 22. Imágenes de transmisión mostrando diferentes formas de las nanopartículas obtenida por síntesis ecológica a) nanopartículas semiesféricas, b) partícula hexagonal, c) y d) formas triangulares. ....	73
Figura 3. 23. Clasificación de las nanopartículas obtenidas por sus maclas: a) partículas STP, b) MTP piramidal, c) y d) maclado múltiple lineal. ....	74
Figura 3.24. Imagen de campo claro mostrando aglomeración de las nanopartículas. ....	75
Figura 3. 25. Pruebas de inhibición realizadas por triplicado con las AgNps en contra de la bacteria E.Coli, el disco en (a) correspondiente al extracto no presenta halo de inhibición. ....	76
Figura 3.26. Histogramas de distribución de tamaño de partícula correspondientes a las nanopartículas obtenidas por biorreducción a diferentes concentraciones de AgNO <sub>3</sub> = a) 3, b) 5 y c) 7 mM. ....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Ejemplos de nanomateriales [7]. ....	6
Tabla 1. 2. Métodos de síntesis e investigación de los nanomateriales [7]. ....	7
Tabla 1. 3. Características de nanopartículas de Ag obtenidas por el método de reducción de sales [12]. ....	12
Tabla 1.4. Relación de superficie nanopartícula a número de capas atómicas y número total de átomos. [15]. ....	14
Tabla 1.5. Trabajos reportados correspondientes a síntesis ecológica [21]. ....	16
Tabla 1.6. Resultados del análisis espectrofotométrico de UV-vis. ....	21
Tabla 1.7. Promedio de las zonas de inhibición con nanopartículas sintetizadas de Ag / Vitex negundo. ....	28
Tabla 1.8. Tasas de efecto inhibitorio sobre las formas de nanoplata frente a S. aureus y E. coli. ....	28
Tabla 1. 9. Área superficial de la forma de las nanopartículas de plata determinadas por el método de BET (Brunauer, Emmitt and Teller). ....	29

Tabla 2. 1. Condiciones de molienda. ....	43
Tabla 2. 2. Parámetros para la preparación de extractos. ....	44
Tabla 2. 3. Reacciones de síntesis realizadas variando el volumen del extracto de pirul. ....	46
Tabla 3. 1. Valores en mm de las distancias de inhibición de las AgNps y controles. ....	77

## **RESUMEN.**

Las nanopartículas de plata se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología debido a su fuerte actividad antimicrobiana. Sin embargo, dichas aplicaciones se encuentran limitadas debido a los métodos de síntesis por reducción química empleados, los cuales involucran sustancias tóxicas. Se ha comprobado que una gran variedad de plantas contienen sustancias que pueden utilizarse como un agente reductor en la síntesis de nanomateriales.

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en la síntesis verde de nanopartículas de plata mediante un extracto acuoso de hojas de *Schinus molle* L. (Pirul). La reacción se llevó a cabo utilizando  $\text{AgNO}_3$  como sal precursora en solución acuosa a diferentes concentraciones (3, 5, 7 y 9 mM). El extracto de pirul se varió en diferentes cantidades en gramos que van desde 0.1, 0.14, 0.18 hasta 0.2 g. para determinar su influencia en la síntesis de nanopartículas de plata. Finalmente, la caracterización de las nanopartículas fue realizada por medio de UV-Vis, DRX, MEB y MET. Las nanopartículas obtenidas presentaron en su mayoría morfología esférica con un rango de tamaño de 5-40nm. La prueba antibacteriana se llevó a cabo por el método de disco utilizando nanopartículas sintetizadas con 5mM de  $\text{AgNO}_3$  y 0.1 g, de pirul los resultados fueron positivos en la inhibición de la reproducción bacteriana.

**Palabras clave:** síntesis verde, nanopartículas de Ag, caracterización microestructural propiedad antibacteriana.

## **ABSTRACT.**

Silver nanoparticles are becoming one of the product categories of the greatest growth in the nanotechnology industry because their strong antimicrobial activity. However, these applications are limited due to the chemical reduction synthesis methods involving toxic substances. It has been verified that wide varieties of plants contain substances that can be used as a chemical reducing agent in the nanomaterials synthesis. In this paper, we presented the results obtained in the green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of

Schinus molle L. leaves 'Pirul'. The chemical reaction was carried out using  $\text{AgNO}_3$  as salt precursor in aqueous solution at different concentrations (3, 5, 7 and 9 mM). The extract amount was varied at 0.1, 0.14, 0.18 until 0.2 g. in order to determine their influence on the silver nanoparticles synthesis. Finally, the structural characterization of the nanoparticles was performed by means of UV-Vis, DRX, SEM and TEM. The obtained nanoparticles showed mostly spherical morphology with size range of 5-40nm. The antibacterial test was carried out by the disk method using synthesized nanoparticles with 5 mM  $\text{AgNO}_3$  and 0.1 g of pepper tree, the results were positive in inhibiting bacterial reproduction.

**Keywords:** green synthesis, Ag nanoparticles, microstructural characterization, antibacterial property.

## INTRODUCCIÓN.

Un gran daño ecológico al medio ambiente se está sufriendo, debido a la rápida industrialización y urbanización, en gran medida por causa de la cantidad de productos químicos, gases o sustancias peligrosas y no deseadas que son liberadas [1]. Con el creciente desarrollo de la nanotecnología, muchos productos serán sintetizados utilizando diversas sustancias tóxicas y se prevee una contaminación mayor del medio.

El entorno natural es una fuente rica en extracto crudo sin tratar a partir de tejidos de gran diversidad de flora y fauna terrestre como plantas, organismos marinos, microorganismos, etc. que tienen compuestos químicos estructuralmente diversos y es ahora crucial investigar sus diversas propiedades [2].

Se ha comprobado que algunas de las sustancias que contiene la inmensa variedad de la flora, pueden ser utilizadas en la síntesis ecológica de nanomateriales. Esto conduce a explorar nuevos procesos ecológicos de síntesis de partículas a nivel nanométrico [3].

Las propiedades físico-químicas y optoelectrónicas de los nanomateriales son fuertemente dependientes de la distribución de su tamaño, pero también, la forma y la estructura de las mismas contribuye significativamente al control de sus propiedades [4]. Son excelentes adsorbentes, catalizadores y sensores debido a su gran superficie específica y alta reactividad [5]. Recientemente, varios nanomateriales han demostrado que tienen fuertes propiedades antimicrobianas, incluyendo nanopartículas metálicas de oro, cobre, plata y nanopartículas cerámicas de dióxido de titanio.

Por otro lado, la síntesis química de nanopartículas con extractos de plantas, es un método en la actualidad muy explorado para la producción de estos materiales, ya que es respetuoso con el medio ambiente y también tiene una ventaja especial, que las plantas están muy extendidas, son de fácil acceso y mucho más seguras de manejar, actuando como una fuente de varios metabolismos [6].

En este país las condiciones climatológicas diversas implican una amplia variedad de plantas con propiedades medicinales y no tóxicas al medio ambiente. Sin embargo, muy poca investigación al respecto se ha reportado. Debido a las características ambientales existen plantas típicas que se desarrollan en cada país o estado. Esto permite abrir una investigación en la síntesis de nanopartículas de plata utilizando plantas nacionales como son: el chile, pirul y floripondio.

Previas investigaciones han mostrado que la efectividad de la síntesis de las nanopartículas varía como función de la planta y la cantidad de la sustancia activa. En este contexto se ha observado que las nanopartículas de plata entre otras, son relativamente fáciles de reducir. Las propiedades antimicrobiales de estas nanopartículas han demostrado usos potenciales en la sustitución de algunos antibióticos. Por tanto, en este trabajo se llevó a cabo la reducción de sales de plata utilizando las plantas antes mencionadas para la obtención de nanopartículas de plata cero valente. Para conocer la influencia en el tamaño de las partículas se varió la relación cantidad del extracto a sal metálica. Por otro lado, la propiedad antibacteriana de la plata como nanopartículas fue evaluada en medios inoculados de la bacteria E. Coli.

### **OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.**

El objetivo general de este proyecto es sintetizar ecológicamente nanopartículas de plata, a partir de nitrato de plata empleando plantas de la región como el pirul (*Schinus molle*), para minimizar el uso de reactivos tóxicos, los cuales comúnmente son utilizados y aprovechar la propiedad antibacteriana de la plata.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Evaluar la efectividad del pirul como agente reductor del precursor ( $\text{AgNO}_3$ ), en la síntesis de partículas de Ag con tamaños nanométricos.
- Establecer un protocolo adecuado y reproducible que permita tener una dispersión homogénea y estable de las nanopartículas.
- Evaluar la propiedad antibacterial de las nanopartículas de plata en colonias de la bacteria E.Coli.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Durante años la síntesis química ha sido uno de los métodos más utilizados para la generación de nanopartículas de Ag, en la cual los reactivos utilizados como el borohidruro de sodio y N-dimetilformamida son perjudiciales al medio ambiente, además de tener un alto costo. Con la creciente necesidad de minimizar o eliminar el uso de sustancias de riesgo al medio ambiente, la síntesis bioinspirada como una alternativa viable a los procesos físico-químicos, ha tenido un gran auge en los últimos años, ya que se hace uso de varios métodos en donde se emplean ya sea bacterias, hongos o extractos de plantas. Además, de ser favorable al medio ambiente y su bajo costo, este procedimiento puede aplicarse fácilmente a gran escala y no requiere energía, temperatura y presiones elevadas.

Por otra parte, la necesidad del tratamiento de aguas ha tomado una trayectoria ascendente, por lo que las nanopartículas antimicrobianas como lo son las de Ag, pueden tener un papel importante en ese proceso.

## **HIPÓTESIS.**

El uso de las sustancias extraídas del pirul permitirá a temperatura ambiente la reducción y estabilización ecológica de las nanopartículas de plata, además, las nanopartículas de plata serán efectivas en la eliminación de la bacteria E. Coli.

## CAPÍTULO I.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. NANOTECNOLOGÍA.

El término nanotecnología se emplea para describir la creación y explotación de materiales con unidades estructurales de tamaño entre los átomos y pequeñas agrupaciones, con al menos una dimensión en el intervalo de nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). En la Tabla 1.1, se enumeran los nanomateriales típicos de diferentes dimensiones. Las propiedades de los materiales de dimensiones nanométricas son significativamente diferentes de los materiales a granel y se encuentran muy relacionadas con las propiedades de los átomos. Un control adecuado de las propiedades de estructuras a escalas nanométricas, pueden conducir a la nueva ciencia, así como nuevos dispositivos y tecnologías. El tema fundamental de la nanotecnología es la miniaturización [7].

**Tabla 1. 1.** Ejemplos de nanomateriales [7].

	Tamaño aproximado	Materiales
Nanocristales y clusters (quantum dots)	diam. 1–10 nm	Metales, semiconductores, materiales magnéticos
Otras nanopartículas	diam. 1–10 nm	Óxidos cerámicos
Nanoalambres	diam. 1–10 nm	metales, semiconductores, óxidos, sulfuros, nitruros
Nanotubos	diam. 1–10 nm	carbono, calcogenuros metálicos en capas
Nanoporos	Poros diam. 0.5–10 nm	Zeolitas, fosfatos, etc.
Arreglos 2 dimensionales (de nanopartículas)	varios $\text{nm}^2$ - $\text{mm}^2$	Metales, semiconductores, materiales magnéticos
superficies y películas delgadas	Espesor de 1–1000 nm	Una variedad de materiales
Estructuras en 3 dimensiones (superredes)	Varios nm en las tres dimensiones	Metales, semiconductores, materiales magnéticos

Se ha producido un crecimiento explosivo de la nanociencia y la nanotecnología en pocos años, principalmente debido a la disponibilidad de nuevas estrategias para la síntesis de nanomateriales y nuevas herramientas para la caracterización y la manipulación (Tabla 1.2)[7]

**Tabla 1. 2.** Métodos de síntesis e investigación de los nanomateriales [7].

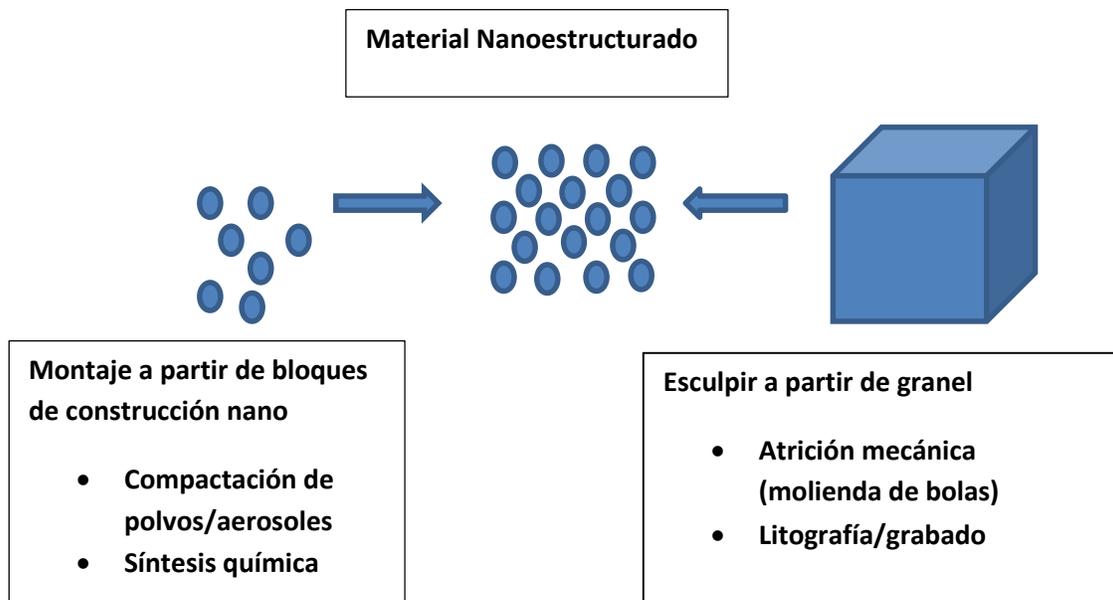
<b>Escala aproximada</b>	<b>Método sintético</b>	<b>Herramienta estructural</b>	<b>Teoría y simulación</b>
0.1 a ~10 nm	Síntesis covalente	Espectroscopia vibracional NMR	Estructura electrónica
<1 a ~100 nm	Técnicas de autoensamblado	Métodos de difracción Microscopía de barrido	Dinámica molecular y mecánica
100 nm a ~1µm	Procesamiento, modificaciones	SEM, TEM	Modelos de grano grueso, etc

El paso necesario para desarrollar nuevas nanotecnologías es la producción de nanopartículas. Una amplia variedad de fenómenos físico-químicos se han utilizado para crear un gran número de protocolos para sintetizar nanomateriales de interés tecnológico y biotecnológico [8].

Estos protocolos se pueden distinguir según el punto de partida de la ruta sintética (ver fig. 1.1):

- De los cuerpos macroscópicos a través de su posterior subdivisión en partículas cada vez más pequeñas por la entrada de energía externa (métodos de arriba hacia abajo). Métodos típicos descendentes son la molienda de sólidos por molienda con bolas o la vaporización a altas temperaturas.

- A partir de precursores atómicos y moleculares, a través de una reacción química espontánea y / o procesos de autoensamblaje (métodos de abajo hacia arriba). Ejemplos son los basados en la preparación de soluciones coloidales y el uso de materiales mesoporosos.



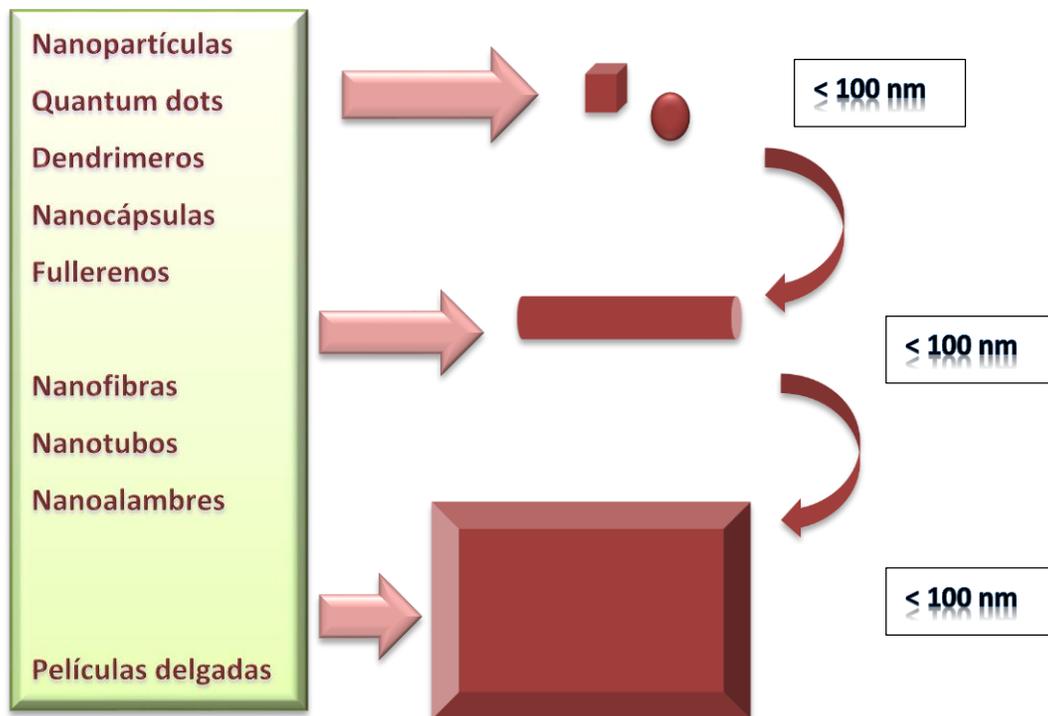
**Figura 1. 1.** Esquema de la variedad de síntesis de nanopartículas y métodos de ensamble.

Los materiales en la nanoescala son de origen reciente. Los actuales objetivos de la ciencia y la tecnología de los nanomateriales son para dominar la síntesis de nanoestructuras (unidades de creación nano) y su conjunto de propiedades deseadas, para explorar y establecer conceptos sobre nanodispositivos; para generar nuevas clases de nanomateriales de alto rendimiento, incluyendo sistemas de inspiración biológica; y perfeccionar las técnicas para la investigación de nanoestructuras. Algunas de las aplicaciones potenciales de la nanotecnología son la producción de nuevos materiales y dispositivos de nanoelectrónica, tecnología informática, medicina y la asistencia sanitaria [9].

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES.

Hay varias formas de clasificar los nanomateriales. Esto depende en gran medida de las aplicaciones y la filosofía, que se adopte. Dos clasificaciones extremas, se pueden encontrar en la literatura. En el primero, el enfoque se hace sobre las dimensiones macroscópicas del material [10].

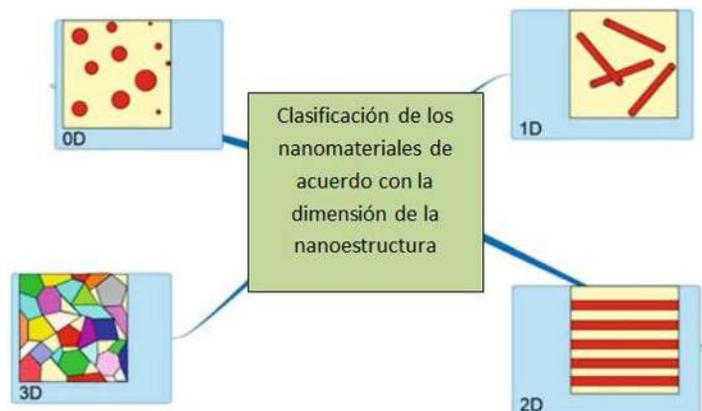
Los nanomateriales entonces se definen como materiales que contienen estructuras que tienen al menos una dimensión entre la escala de 1-100 nm. De acuerdo con esta definición, una película delgada (con un espesor de menos de 100 nm) se considera como un nanomaterial (fig. 1.2) porque al menos una de sus dimensiones es nanométrica. Las películas delgadas se han utilizado durante mucho tiempo, antes no había ningún interés en "la nanotecnología." Si dos medidas son "nano", tenemos nanofibras, nanocables, etc, y si las tres dimensiones son "nano" tenemos nanopartículas y puntos cuánticos [10].



**Figura 1. 2.** Clasificación donde los objetos poseen uno, dos o tres dimensiones en el rango nanométrico (1D, 2D y 3D).

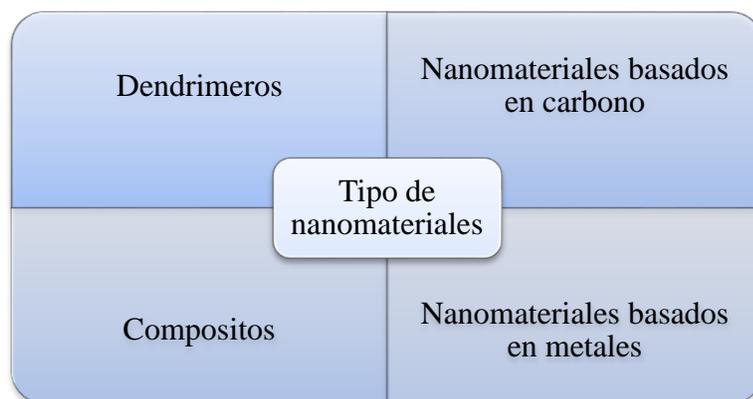
En esta clasificación, no hay ninguna referencia a la estructura del material. Otra clasificación, que podría ser más relevante en cuanto a la nanoestructura se refiere, es considerar la dimensionalidad del componente nanoescala con el que se hace el material. Una nanoestructura se dice que tiene una dimensión nanométrica, por ejemplo, si tiene una longitud mayor que 100 nm en una sola dirección. De acuerdo con esta definición, una nanopartícula se considera que tiene dimensión cero (ya que no tiene alguna dimensión con una longitud mayor que 100 nm). Un alambre o una fibra es un objeto unidimensional y un película delgada una nanoestructura bidimensional. En resumen, los nanomateriales 0D contienen grupos de átomos que se consideran como partículas puntuales. Nanomateriales unidimensionales contienen nanofibras, alambres, varillas, etc. materiales 2D son películas, platos, multicapas, o redes. Los nanomateriales tridimensionales consisten en granos equiaxiales de tamaño nanométrico. Esto se muestra esquemáticamente en la fig. 1.3 [10].

Los nanomateriales a granel son objetos más grandes hechos de estructuras que tienen dominios bien definidos, con un tamaño medio de menos de 100 nm, por ejemplo, el tamaño de grano en la cerámica. Para la comparación, el diámetro de un cabello humano es de aproximadamente 100 000 nm y el tamaño de una sola partícula de humo es de alrededor de 1 nm.



**Figura 1.3.** Clasificación de materiales de acuerdo con la dimensionalidad de las nanoestructuras. 0D, 1D, 2D, 3D. En la Ilustración 2D, tenemos capas incrustadas en la mayor parte y en los 3D cristalitos o granos.

También es posible clasificar los nanomateriales en familias que reflejan su composición. Esto permite la posibilidad de la clasificación tal como se muestra en la figura 1.4. Se pueden distinguir los cuatro tipos de nanomateriales. Los compuestos basados en carbono juegan un papel importante en las aplicaciones, así como en el desarrollo histórico del dominio de la nanotecnología. Esta clasificación incluye los fullerenos, nanotubos de carbono, el grafeno y similares[10].



**Figura 1. 4.** Los diferentes tipos de nanomateriales según su composición.

Los nanomateriales a base de metal son materiales hechos de nanopartículas metálicas como el oro, plata, óxidos metálicos, etc. Por ejemplo, dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) son nanopartículas utilizadas ampliamente en aplicaciones tales como la pintura, protector solar y crema dental.

Los dendrímeros son polímeros nanométricos contruidos a partir de unidades ramificadas. Estos se pueden funcionalizar en la superficie y puede alojar las moléculas en sus cavidades. Una aplicación directa de los dendrímeros es la administración de fármacos. Los nanomateriales compuestos contienen una mezcla de nanopartículas simples o compuestos tal como arcillas de tamaño nanométrico dentro de un material a granel. Las nanopartículas ofrecen una mejora en las propiedades físicas, químicas y mecánicas en comparación al material a granel [10].

### 1.3. SÍNTESIS QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: i) precursor metálico; ii) agente reductor, iii) agente estabilizante. El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones de plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc) [11].

La reducción química de sales de metales ha llegado a ser la síntesis más común en el campo de la obtención de nanopartículas debido a que es una de las técnicas más ampliamente usadas para generar suspensiones coloidales, por sus ventajas tales como el empleo de precursores comerciales, el uso de un medio acuoso o alcohólico y por que permite trabajar en condiciones de temperatura y presión ambiente. [12].

**Tabla 1. 3.** Características de nanopartículas de Ag obtenidas por el método de reducción de sales [12].

Precursor	Agente reductor	Estabilizante	Morfología de las nanoestructuras
AgNO <sub>3</sub>	t-BuONa activada con NaH en medio organico	t-BuONa activada con NaH	Partículas esféricas monodispersas, 6.6nm
AgCl	NaBH <sub>4</sub>	Dodecatiol	Nanoesferas 2-7 nm
AgNO <sub>3</sub> ó AgCl	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Nanoalambres o esferoides
AgNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	N <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	PVP	Nanoesferas bimetálicas (Ag-Pt), 100 nm
AgNO <sub>3</sub> /NiCl	N <sub>2</sub> H <sub>2</sub> en medio organico	PEI	Nanoesferas bimetálicas (Ag-Ni) nucleo 6.2 nm, coraza 0.85 nm
AgNO <sub>3</sub> ó AgCl	NaOH/NaCl	NAOH/NaCl	Partículas Polidispersas

En el caso específico de la obtención de coloides de plata, los precursores más utilizados son nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y Cloruro de plata ( $\text{AgCl}$ ). Por otra parte, los agentes reductores (fuertes y débiles) que han sido reportados son: hidrogeno, monóxido de carbono, borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), borohidruro de potasio ( $\text{KBH}_4$ ), Citrato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ), hidracina ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) o alcoholes en reflujo prolongado

#### **1.4. PROPIEDADES Y USOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA, AgNPs.**

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. [13]. Incluso civilizaciones antiguas como los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional.

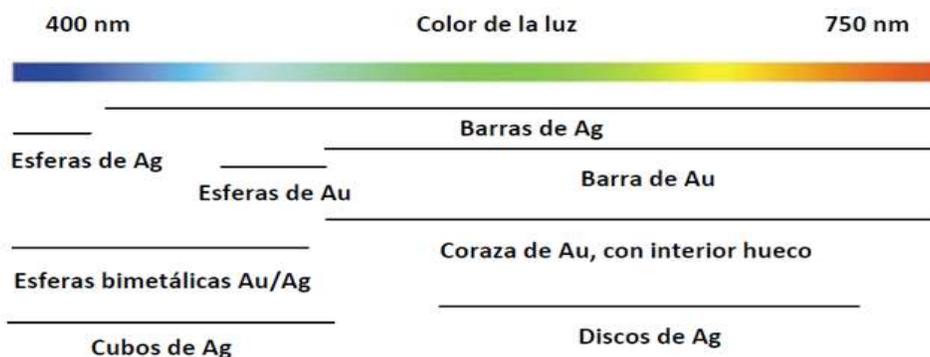
En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las AgNPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología, según un informe de investigación de mercado realizado por Bourne research. Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado. En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano [14].

Las propiedades ópticas, antimicrobianas, biomédicas y de cicatrización que muestran las nanopartículas metálicas de plata se atribuye a su alta relación de superficie la cual está dada por su forma y tamaño Tabla 1.4, las cuales influyen en sus aplicaciones. La forma de las nanopartículas puede ser relacionada a una longitud de onda específica de resonancia en el espectro UV-vis, en la figura 1.5. se muestra la relación forma de nanopartícula vinculada a una longitud de onda en el espectro visible [15].

**Tabla 1.4.** Relación de superficie nanopartícula a número de capas atómicas y número total de átomos. [15].

Numero de capas atómicas	Modelo de la partícula	Número total de átomos	Átomos en la superficie en porcentaje
1		13	92%
2		55	76%
3		147	63%
4		309	52%
5		561	45%
7		1415	35%

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las AgNPs la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie, que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células [16].



**Figura 1.5.** Lista de nanopartículas de oro y plata de diversas morfologías, composiciones y estructuras, junto con sus ubicaciones típicas de bandas SPR (resonancia de plasma de superficie) en la región visible [17].

Estas nanopartículas inorgánicas tienen una clara ventaja sobre agentes antimicrobianos químicos convencionales ya que un área de superficie más grande, como en el caso de las nanopartículas, garantiza un aumento en las interacciones probables con la superficie de las células en cuestión [18]. El mecanismo de los efectos inhibidores de los iones de  $Ag^+$  en microorganismos es parcialmente conocido. Algunos estudios han informado de que la carga positiva en el ion  $Ag^+$  es crucial para su actividad antimicrobiana a través de las atracciones electrostáticas entre la membrana celular de los microorganismos cargada negativamente y las nanopartículas cargadas positivamente [19].

En contraste, Sondi y Sondi [20]. Informaron que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sobre las bacterias Gram-negativas era dependiente de la concentración de las nanopartículas de  $Ag$  utilizado, y estaba estrechamente asociado con la formación de picaduras en la pared celular de las bacterias. Después de esto, las nanopartículas de  $Ag$  se acumulan en la membrana bacteriana y causa la permeabilidad, lo que resulta en la muerte celular.

### **1.5. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR MÉTODOS ECOLÓGICOS.**

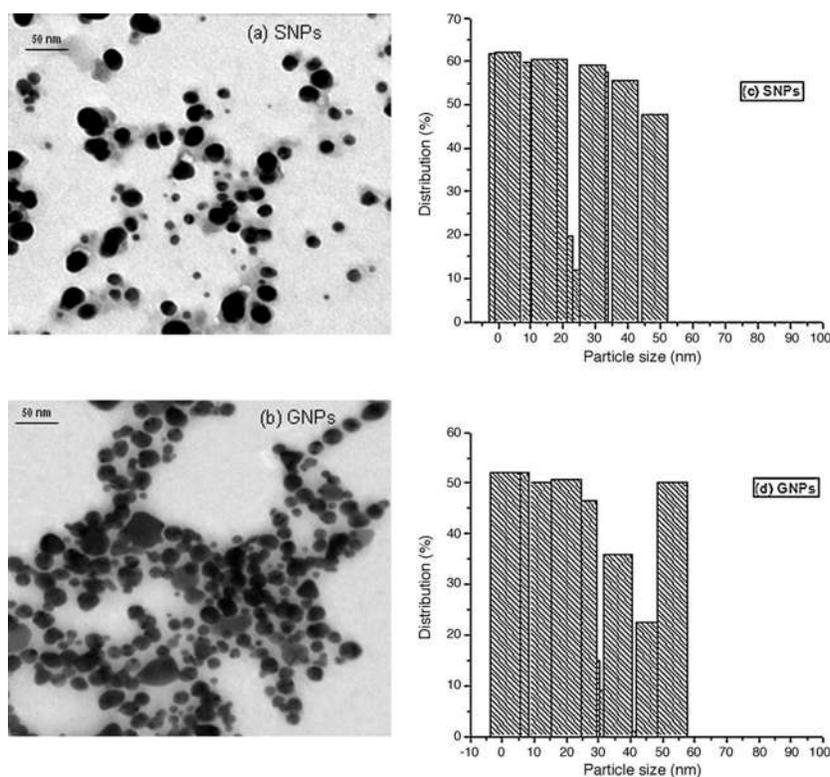
En la actualidad la aplicación de la síntesis ecológica en la investigación, ha crecido de una forma importante por lo que se han desarrollado varios procesos, gracias a estas alternativas se logra manipular o controlar los materiales a un nivel atómico o molecular. Estas técnicas, en la nanociencia son conocidas como “de abajo hacia arriba”, entre las cuales podemos encontrar la síntesis ecológica de muchas nanopartículas ( $Ag$ ,  $Au$ ,  $Cu$ ,  $Fe$ , entre otras.) empleando una diversidad de sustancias contenidas en las plantas. La Tabla 1.5 muestra el resumen de diferentes trabajos realizados en ésta síntesis ecológica.

**Tabla 1.5.** Trabajos reportados correspondientes a síntesis ecológica [21].

<b>Tipo de Planta</b>	<b>Tipo de NPs producidas</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Referencia</b>
<b>Azadirachta indica</b>	Ag, Au-Ag, Au	5-100 nm	Shankar 2004
<b>Sesbania drummondii</b>	Au	Au 6-20 nm	Sharma 2007
<b>Aloe vera</b>	Ag	15.2±4.2 nm	Chandran 2006
<b>Emblica officinalis</b>	Ag	10-20 nm	Ankamwar 2005
<b>Emblica officinalis</b>	Au	15-25 nm	Ankamwar 2005
<b>Brassica juncea</b>	Au, Ag	-	Lamb 2001
<b>Cinnamomum camphora</b>	Au & Ag	55-80 nm	Huang 2007
<b>Triticum aestivum</b>	Au	-	Armendariz 2004
<b>Carica papaya</b>	Ag	60-80 nm	Mude 2009
<b>Jatropha Curcas</b>	Ag	10-20 nm	Bar 2009
<b>Capsicum annum</b>	Ag	-	Li 2007
<b>Tamarindus indicus</b>	Au	20-40 nm	Ankamwar 2005
<b>Helianthus annus</b>	Ag	-	Leela & Vivekanandan
<b>Camellia sinensis</b>	Au	15-42 nm	Nune 2009

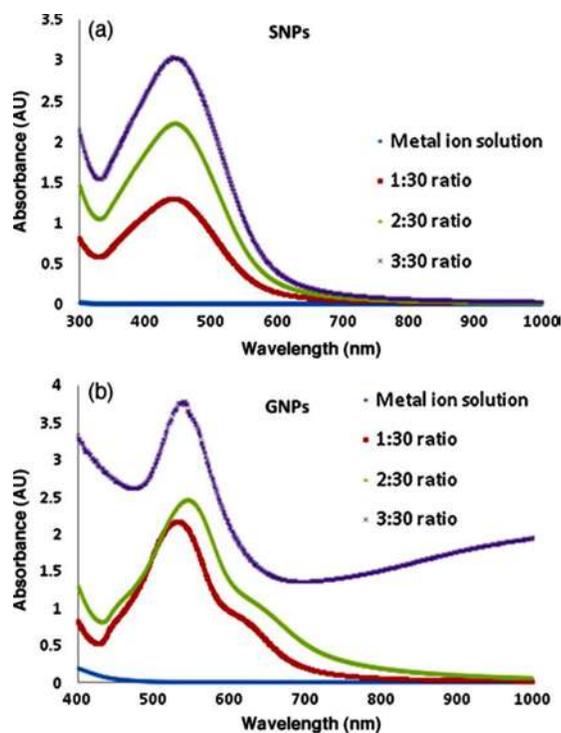
La síntesis de nanopartículas (AgNPs) de plata empleando plantas medicinales es un método eco amigable y eficaz, además que las nanopartículas tienden a conservar e incluso mejorar su actividad antimicrobiana contra las bacterias, virus y otros microorganismos. Hoy en día, estos métodos están siendo ampliamente aplicados en los campos de los medicamentos para los tratamientos del cáncer, SIDA, epilepsia, etc. [22]

Amarendra Dhar Dwivedi y Co. [23] realizaron una biosíntesis fácil y rápida de nanopartículas de plata y oro utilizando *Chenopodium*, la cual es una maleza dañina en la India. El extracto de la hoja de la hierba se utilizó como agente reductor suave para la síntesis de nanopartículas de plata y oro de sus soluciones precursoras. Se observaron formas cuasi-esféricas de nanopartículas biosintetizadas de Ag y Au, en un rango de 10 a 30 nm, respectivamente, tal y como es mostrado en la figura 1.6.



**Figura 1.6.** Imágenes de TEM: (a) nanopartículas de plata, (b) nanopartículas de oro y sus respectivos histogramas (c) y (d) [23].

Los espectros de UV-Vis dieron resonancia del plasmón superficial para las nanopartículas de plata y oro en 460 y 540 nm, respectivamente, como es ilustrado en la figura 1.7. la influencia de las cantidades de extracto de hoja, las concentraciones de metales, el tiempo de contacto, la temperatura de reacción y el pH fueron evaluados para encontrar sus efectos en la síntesis.



**Figura 1. 7.** Espectro del plasmón superficial a diferentes concentraciones de extracto de hoja / concentración de iones metálicos (1:30, 2:30, 3:30, tiempo de contacto: 30 min). (a) NPs de Ag y (b) NPs de Au.

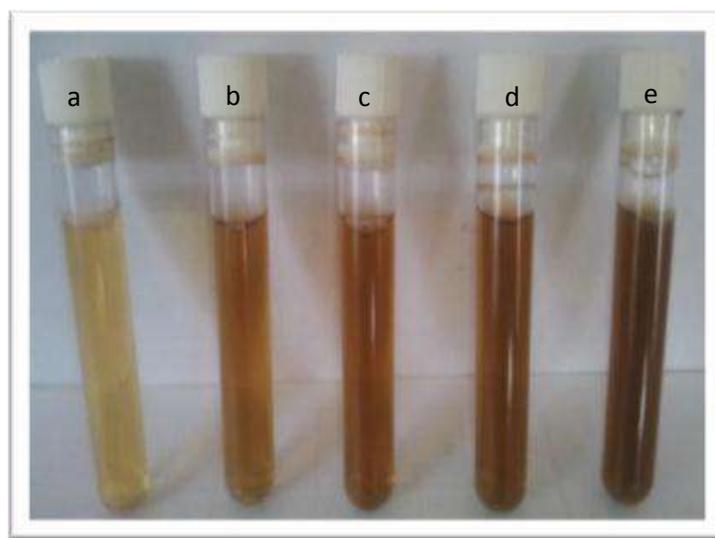
Los nanocristales producidos de plata y oro se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos X (XRD), energía dispersiva de rayos X (EDX) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La estabilidad de las NPs se evaluó a diferentes pH con potenciómetro zeta sin añadir agentes estabilizantes.

Por último, se estableció que sólo las partículas esféricas se observaron en mayor concentración en el extracto de hoja, los resultados de los análisis de las muestras por TEM y FTIR indican la posible participación del grupo carbonilo en el proceso de reducción y los iones carboxilato actúan como agente de blindaje que inducen la estabilidad biológica de las nanopartículas.

Dentro de las investigaciones realizadas empleando diferente tipo de planta y evaluando las propiedades antibacteriales, Ibrahim M El-Sherbiny y Col. [24] lograron la síntesis verde de

nanopartículas de plata densamente dispersas y estables utilizando extracto de mirra como agente reductor y fue investigada la estabilización del agente.

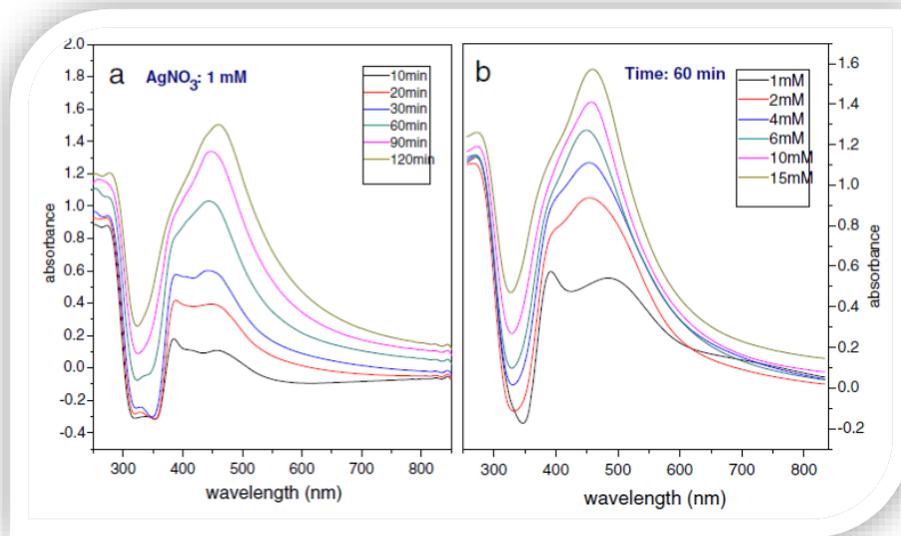
Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas mediante la exposición de una mezcla de  $\text{AgNO}_3$  a diferentes concentraciones del extracto de mirra, los cuales presentaron diferentes tonalidades de color marrón que indican la variación en la concentración de  $\text{AgNO}_3$  (ver figura 1.8.) a la radiación UV durante diferentes intervalos de tiempo.



**Figura 1.8.** Cambio de color del extracto de mirra. (a) Formación de NPs de Ag de diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ : (b) 1mM, (c) 4 mM, (d) 10 mM, y (e) 15 mM.

Los efectos de los parámetros tales como la concentración de la solución de  $\text{AgNO}_3$  y el tiempo de reacción sobre las características fisicoquímicas del desarrollo de las nanopartículas de Ag fueron estudiados. Se observó la formación de las NPs de Ag al presentarse el cambio en el color de la solución de amarillo pálido a marrón y fue confirmado por la aparición de picos de resonancia del plasmón de superficie alrededor de los 445 nm (figura 1.9.).

Las nanopartículas resultantes se caracterizaron por espectrofotometría UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión, espectroscopía de infrarrojo y difracción de rayos X. Las NPs demostraron una relativa alta actividad antibacteriana contra las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Pseudo monasaeruginosa* en comparación con las de extracto de mirra. La actividad antibacterial se incrementó con el aumento de la concentración de las NPs de Ag.



**Figura 1. 9.** Espectros UV-Vis de la formación de las NPs de Ag registradas como función de (a) el tiempo de la irradiación UV y (b) la concentración de  $\text{AgNO}_3$  [9].

Se demostró que el extracto de mirra se puede utilizar como reductor ecológico y agente de protección para la síntesis respetuosa del medio ambiente. Las NPs de Ag desarrolladas mostraron una buena estabilidad, y no se observaron cambios visibles incluso después de 6 meses. También demostraron una alta actividad bactericida contra las bacterias *B. thuringiensis* y *P. aeruginosa* en comparación con la de extracto de mirra, y la actividad antibacteriana se incrementó con el aumento de la concentración de las NPs de Ag. En conclusión, este estudio reveló que las NPs de Ag desarrolladas pueden ser adaptadas y utilizadas, como potencial agente antibacteriano para diversas aplicaciones biológicas y biomédicas.

Por otra parte el estudio de la síntesis de nanopartículas de plata a partir de extracto de hoja fresca de *Cardiospermum helicacabum* (figura 1.10) fue llevado a cabo por Bhaskar Mitra y Co. [25]. El extracto de hoja se preparó a dos temperaturas diferentes (65 °C 5 min, 10 min, 15 min) y 95 °C durante 5 min. Sin embargo, el extracto obtenido a 95 °C, mostró una mejor y precisa formación de nanopartículas con el tiempo de reacción. Por lo tanto, se mostró que la temperatura de extracción juega un papel importante en la formación de las nanopartículas.



**Figura 1.10.** Imagen de *Cardiospermum helicacabum*.

El desarrollo de la reacción con respecto al tiempo se presenta en la figura 1.11, en la cual se aprecia un cambio de tonalidad en las soluciones acuosas las cuales contienen una concentración de 1 mM del precursor. Los estudios de UV-Vis dieron como resultado un aumento gradual de la concentración de las nanopartículas con el tiempo, temperatura y características de la muestra (ver Tabla 1.6.).



**Figura 1.11.** Extracto acuoso de la hoja de *Cardiospermum* con una concentración fija de 1 mM con intervalos de tiempo de 0, 24 y 48 horas, respectivamente de izquierda a derecha [25].

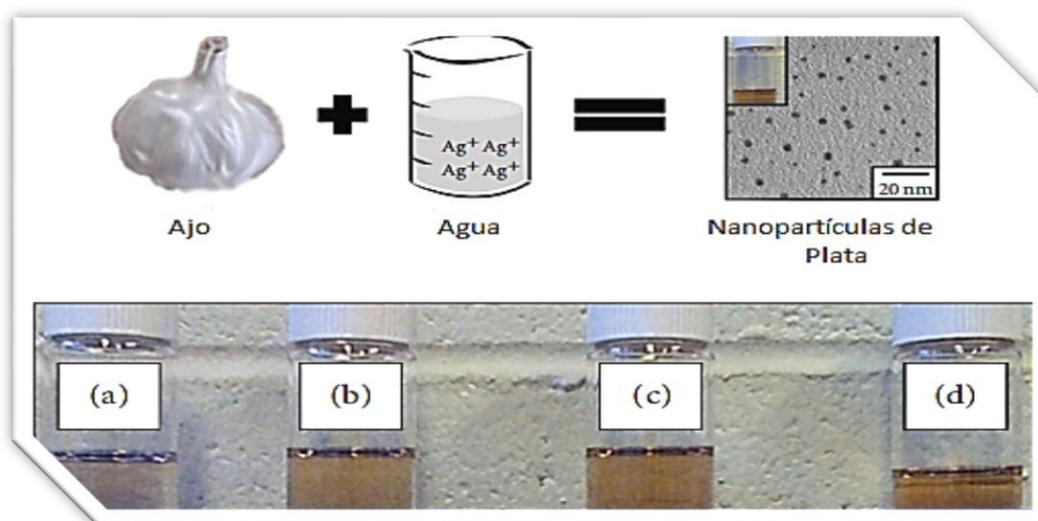
**Tabla 1.6.** Resultados del análisis espectrofotométrico de UV-vis [25].

No. de muestra	Extracto acuoso de la hoja de planta medicinal	Temperatura	Tiempo min	OD Resultados del pico en nm
1	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	65°C	5	440nm
2	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	65°C	10	448nm
3	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	65°C	15	450nm
4	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	65°C	5	445nm

A partir de estos resultados se puede concluir que el *Cardiospermum helicacabum* es una fuente potencial para la síntesis de nanopartículas además de haber sido identificada una temperatura óptima para su síntesis eficiente, la cual varía dependiendo del tamaño de partícula.

Gregory Von White II y Co. [26] detallan un método simple para la síntesis de nanopartículas de plata estables y monodispersas realizado a temperatura ambiente, donde el extracto de *Allium sativum* (ajo) cumplen las funciones, tanto de agente reductor de la sal de plata durante la síntesis de nanopartículas, así como la de agente estabilizante.

Cantidades variables de la solución del extracto de ajo (1,0 ml a 2,5 ml) se añadieron a 51 ml de una solución de agua destilada con una concentración correspondiente a 0.98 mM de  $\text{AgNO}_3$ . Se observó en un lapso de dos horas, un cambio de color naranja claro, lo que indicó la presencia de nanopartículas de plata (ver figura 1.12).



**Figura 1.12.** Imágenes representativas de las dispersiones de nanopartículas de plata sintetizadas con cantidades variables de la solución de extracto de ajo a 25 °C después de un tiempo de reacción de 48 horas (a) 1,0 ml, (b) 1,5 ml, (c) 2,0 ml, y (d) 2,5 ml [26].

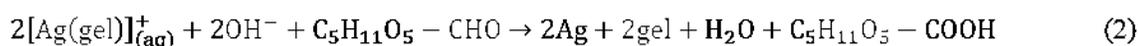
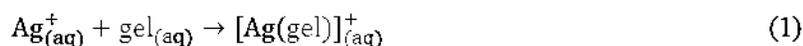
Al variar las condiciones de síntesis el tamaño de partícula varió, así como la distribución y la cinética de formación de las partículas. La espectroscopia de infrarrojo, el análisis químico de energía dispersa de rayos X y la cromatografía de líquido de alto rendimiento indicaron que la alicina y otros hidratos de carbono en el extracto de ajo son las sustancias activas que estabilizan las nanopartículas.

Las nanopartículas sintetizadas también demuestran potencial para aplicaciones biomédicas, debido a su mayor estabilidad en medios biológicos, la resistencia a la oxidación por la adición de H<sub>2</sub>O, la facilidad y la escalabilidad de la síntesis química. Lo que confirma que las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de ajo son potenciales candidatos para la futura experimentación y puesta en práctica en el campo biomédico.

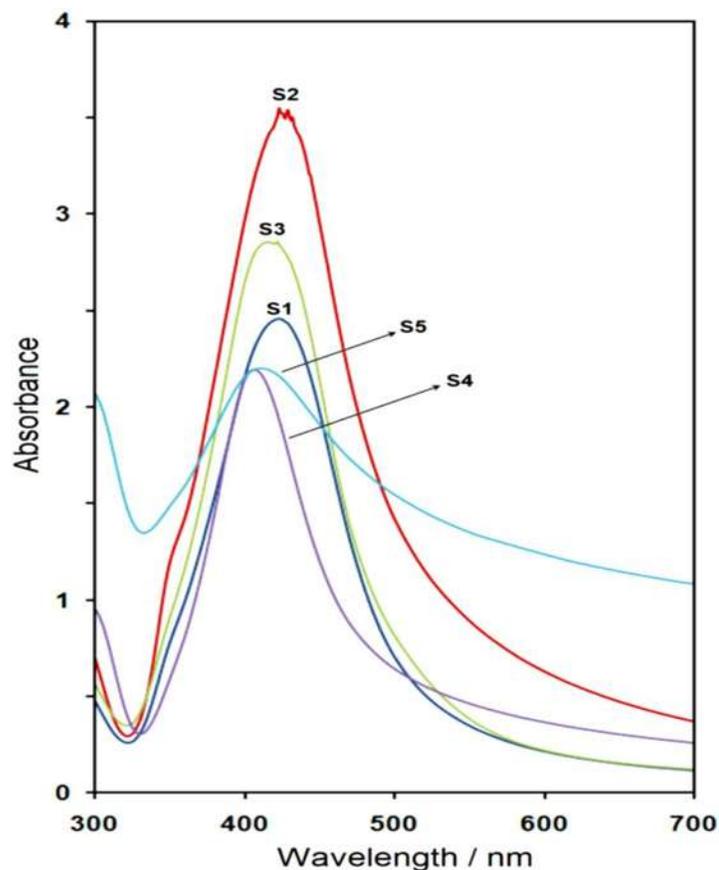
### 1.5.1. VELOCIDAD DE REACCIÓN.

La velocidad de reacción es un factor importante durante la síntesis de nanopartículas por un medio ecológico, ya que esto repercute directamente en el tamaño de las mismas y sus propiedades. Los estudios realizados por Majid Darroudi y Co. [27] sobre la velocidad de reacción en diferentes medios son muy representativos, en este trabajo las nanopartículas de plata fueron sintetizadas con éxito empleando un medio natural de matriz polimérica, y se empleó nitrato de plata, gelatina, glucosa, e hidróxido de sodio como precursor de plata, estabilizadores, agentes reductores, así como catalizador.

La gelatina se utiliza como estabilizador y matriz durante esta síntesis. La posible reacción química para la preparación fue:



En este estudio se investigó el papel del NaOH como acelerador de los resultados obtenidos, los cuales son mostrados por la técnica de UV-visible en la figura 1.13.



**Figura 1.13.** Espectros UV-vis de NPs de Ag preparadas a diferentes volúmenes de NaOH [27].

Como se ha indicado, la primera adición de NaOH condujo a la ampliación del pico de SPR en relación con la curva de la muestra S1. Mayores volúmenes de NaOH (S2) aumentaron la absorbancia debido al aumento en la concentración de plata. En la muestra S3, esto dio lugar a un fuerte cambio en la posición de la longitud de onda a 422 nm. En S4 se muestra un aumento del volumen del acelerador que considerablemente cambió a una menor longitud de onda (407 nm). Este cambio está relacionado a la disminución en el tamaño de las partículas de Ag [28]. Dado que la banda en las nanopartículas de metal muestra el desplazamiento sobre la base de la disminución del tamaño de las partículas. Para S5, la longitud de onda ( $\lambda$ ) máxima fue desplazada hacia el valor de 412 nm debido al aumento de tamaño nanopartícula [28, 29].

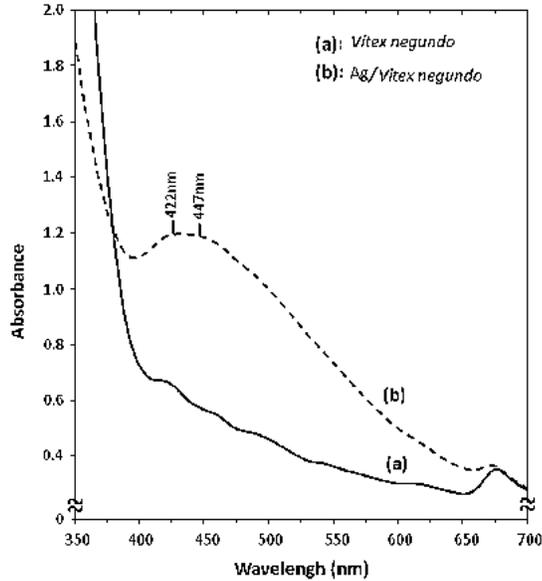
### 1.5.2 PROPIEDADES ANTIBACTERIALES.

Los iones  $\text{Ag}^+$  y sales de  $\text{Ag}$  se han utilizado como agentes antimicrobianos en varios campos debido a su capacidad inhibidora del crecimiento contra los microorganismos [30]. Las propiedades antibacteriales de las nanopartículas de plata fueron evaluadas en el trabajo de Mohsen Zargar y Co. [31], donde se llevó a cabo la síntesis ecológica de nanopartículas de plata utilizando concentraciones de  $10^{-1}$  M de  $\text{AgNO}_3$  las cuales se muestran en la figura 1.14. La suspensión de Vitex negundo fresco presentó un color verde amarillento. Sin embargo, después de la adición de la solución de  $\text{AgNO}_3$  y al agitar durante 48 horas a temperatura ambiente, la emulsión se volvió de color marrón oscuro.

La formación de nanopartículas de plata fue seguido por la medición de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) del Vitex negundo y la emulsión de  $\text{Ag} / \text{Vitex negundo}$ , dio como resultado un rango de longitud de onda de 300 a 700 nm (figura 1.15 a). Las bandas características de la plata se detectaron alrededor de 400 a 450 nm estos indican que corresponden a nanopartículas de plata extra finas más pequeñas a 25 nm. Los espectros de absorción UV-Vis (figura 1.15 b) mostraron que la banda ancha contenía dos picos, uno a 422 nm y el otro a 447 nm. Estos dos picos ilustran la presencia de dos distribuciones amplias de tamaño de nanopartículas de plata.

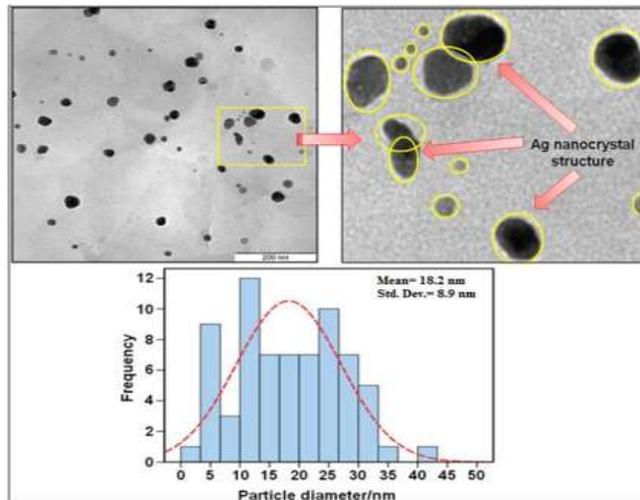


**Figura 1.14.** Fotografías de (a) Vitex negundo y (b) Emulsión de  $\text{Ag}/\text{Vitex negundo}$  después de 48 horas [31].



**Figura 1. 15.** Espectros de absorción UV-Vis de (a) Vitex negundo y (b) emulsión Ag/Vitex negundo después de 48 horas [31].

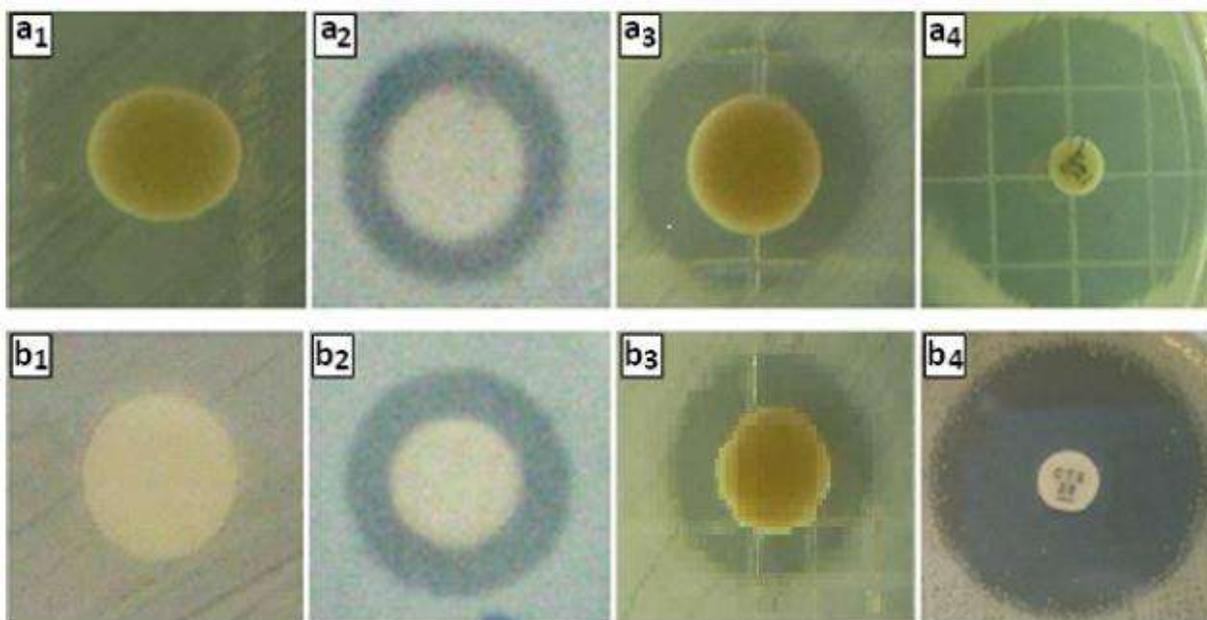
Para el estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM), una gota de la solución de nanopartículas de plata se depositó sobre una rejilla de TEM que se revistió con una película de carbono como soporte. Después del secado, esta red fue fotografiada utilizando TEM. figura 1.16. muestra una imagen representativa de TEM.



**Figura 1. 16.** Imagen TEM y distribución de tamaño correspondiente de Ag / Vitex negundo después de 48 horas [31].

El resultado mostró dos amplias distribuciones del tamaño de partículas, la primera con un diámetro en el rango de 10 a 20 nm y la segunda con un diámetro de 25-30 nm. Las nanopartículas de Ag sintetizadas con Vitex negundo mostraron propiedades contra el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados del estudio se presentan en la figura 1.17 y en la Tabla 1.7. El extracto de Vitex negundo (0.5 mg / ml) no tiene ningún efecto antibacteriano (figura 2.12 a1 y b1). Sin embargo, después de la formación de las nanopartículas, la solución de NPs de Ag / Vitex negundo demostró un alto efecto antibacteriano. Los resultados presentados en la figura 1.17 a3 y b3 mostraron los efectos antibacterianos de Ag / Vitex negundo contra *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

Los resultados obtenidos sugirieron que el extracto de Vitex negundo juega un papel importante en la reducción y estabilización de las nanopartículas de plata. El estudio también reveló que la emulsión de Ag / Vitex negundo muestra actividad antibacteriana para las bacterias *E. Coli* y *S. aureus*.



**Figura 1.17.** Ensayo de la actividad antibacteriana frente a *E. coli* (a1-a4) y *S. aureus* (b1-b4): (a1, b1) Vitex extracto negundo (0,5 mg / ml), (a2, b2)  $\text{AgNO}_3$  (0,17 moles/ L), (a3, b3) emulsión de Ag / Vitex negundo, (a4, b4) cefotaxima (30 mg) [31].

**Tabla 1.7.** Promedio de las zonas de inhibición con nanopartículas sintetizadas de Ag / Vitex negundo.

Bacteria	Zona de inhibición diámetro (mm)			Control
	Vitex negundo (0.5 mg/ml)	AgNO <sub>3</sub> (0.17 mol/lit)	Ag/Vitex negundo	positivo (mm) Cefotaxime (30 µg/disc)
<b>E. Coli</b>	0.0	9.0 ± 0.5	12.0 ± 0.7	28.0 ± 0.5
<b>S. aureus</b>	0.0	9.5 ± 0.5	11.0 ± 0.3	21.0 ± 1.5

### 1.5.3 RELACIÓN FORMA/PROPIEDAD ANTIBACTERIAL.

Las propiedades de las nanopartículas son altamente dependientes del tamaño así como de la forma, por lo que estudios relacionados con la comparación de la actividad antimicrobiana de las formas de nanoplatas; nanoplatos, nanorodillos y nanopartículas fueron realizados por Babak Sadeghi y Co. [32]. Formas de las NPs de plata se prepararon con un estabilizador, tal como el poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP).

El efecto antimicrobial de las nanopartículas de plata fue investigado mediante los métodos de difusión de disco y mínima concentración inhibidora (CMI) para las bacterias de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*). Los resultados correspondientes a los métodos de evaluación se presentan en las Tablas 1.8 y 1.9.

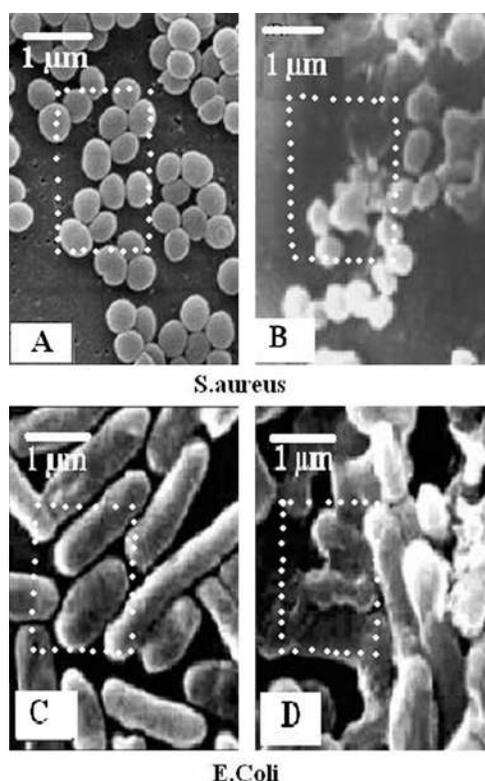
**Tabla 1.8.** Tasas de efecto inhibitorio sobre las formas de nanoplata frente a *S. aureus* y *E. coli*.

Muestra (10 ppm)	Tasa de inhibición de crecimiento (%)	
	<i>S. aureus</i> (Gram-positivo)	<i>E. coli</i> (Gram-negativo)
Nanopartículas de Ag	95.50	92.50
Nano rodillos de Ag	97.30	93.40
Nanoplatos Ag	98.50	94.20

**Tabla 1. 9.** Área superficial de la forma de las nanopartículas de plata determinadas por el método de BET (Brunauer, Emmitt and Teller).

Forma de nanopartícula	Área Superficial (m <sup>2</sup> /g)
Nanopartículas de Ag	17.8
Nano rodillos de Ag	38.8
Nanoplatos Ag	121.1

El crecimiento de las bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) y las bacterias Gram-negativas (*E. coli*) fueron inhibidas por las formas de nanoplata, lo cual fue corroborado por imágenes de microscopía electrónica de barrido (ver figura 1.18).



**Figura 1. 18.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando células normales de *S. aureus* y *E. coli*. (A, C) y células cultivadas en soluciones que contienen nanopartículas de plata en agar (10 ppm). (B, D).

Por último se encontró que la actividad anti-bacteriana es dependiente de la forma y tamaño de las partículas de plata. Asimismo, los nanoplatillos mostraron la mejor área superficial y propiedad antimicrobiana y esta es probablemente debida a su mayor área superficial.

En este trabajo, se pretende emplear diferentes sustancias activas, que como previamente se ha discutido, son obtenidas a partir de extractos con plantas para la posible obtención de nanopartículas de Ag. Los resultados anteriores son representativos entre mucha investigación realizada en esta área, en donde otros tipos de nanopartículas (Au, Fe, Cu, etc.) fueron sintetizadas. Las sustancias activas han demostrado comportarse como buenos agentes reductores y al mismo tiempo como agentes estabilizadores. Debido a la diversidad de especies moleculares presentes en la planta, aún no se han determinado los mecanismos y las sustancias que participan tanto en la bioreducción como estabilización. En este país, existe una diversidad de plantas no tóxicas que pueden ser candidatas para el proceso de bioreducción de nanopartículas a partir de sales. Esta diversidad se debe principalmente a las condiciones climáticas benignas que permiten el desarrollo de casi todo tipo de flora. Es por esto, que una investigación encaminada a evaluar, las sustancias activas en el chile, pirul y floripondio, plantas cuyas características químicas sobresalen, es muy factible de llevar a cabo.

#### **1.6. POSIBLES COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS EMPLEANDO PLANTAS.**

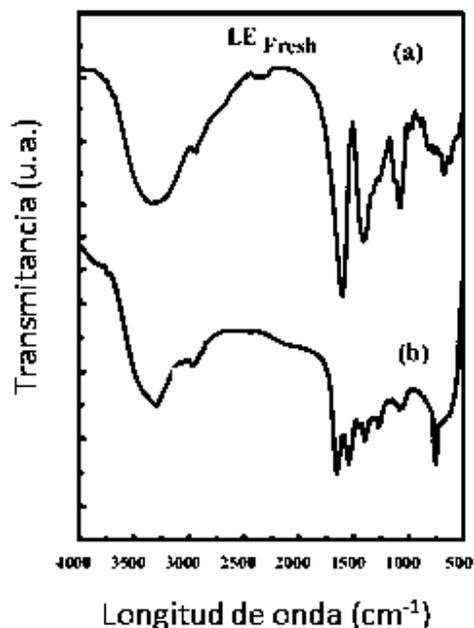
Debido a la naturaleza compleja y vasta diversidad de los sistemas de las plantas, es una tarea difícil identificar un compuesto particular que podría ser responsable de la formación de nanopartículas. Algunas biomoléculas tales como terpenoides, flavonoides, polisacáridos, proteínas y alcaloides son generalmente considerados como potenciales agentes bioreductores y estabilizadores que podrían hacer la formación de nanopartículas [33]. Es muy probable que el proceso de biorreducción de iones metálicos sea en realidad una interacción de varios componentes activos presentes en el extracto de la planta.

### 1.6.1 FLAVONOIDES.

Los flavonoides son moléculas polifenólicas solubles en agua que contienen 15 átomos de carbono, que pertenecen a la familia de los polifenoles. Los flavonoides se componen de 6 subgrupos: chalcona, flavona, flavonoles, flavanona, antocianinas e isoflavonoides. Junto con los carotenos, los flavonoides son responsables de la coloración de las frutas, verduras y hierbas. Los flavonoides son por lo general solubles en agua y fueron propuestos que son los principales componentes presentes en los extractos de plantas, los cuales han participado en el proceso de biorreducción [34].

Los flavonoides tienen la capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno. En la biosíntesis de nanopartículas de Ag a partir de albahaca como agente reductor, se propuso que la síntesis es iniciada por la luteolina, la cual es un flavona común que se encuentra en la planta de la albahaca la cual libera hidrógeno reactivo responsable de la conversión de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  [33]. Por lo tanto, el contenido de flavonoides en las plantas pudiera ser un índice para evaluar y seleccionar una planta para la síntesis de nanopartículas.

Jagajjanani [35] realizó la caracterización FT-IR del extracto de hojas de *Aegle marmelos* antes y después de la síntesis de nanopartículas de plata empleando  $\text{AgNO}_3$  como agente precursor. El espectro resultante se muestra en la figura 1.19 en el cual se observan los picos de los grupos funcionales presentes en ambas muestras. Al comparar ambos espectros se puede apreciar la supresión predominante en la región derecha ( $500\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ). Los cambios de intensidad observados en las regiones de  $1456\text{-}1600$ ,  $1315\text{-}1037$  y  $900\text{-}670\text{ cm}^{-1}$  indican la participación de los grupos fenólicos en las reacciones de intercambio iónico. Además, algunos nuevos picos pequeños fueron encontrados en el espectro del extracto después de la reacción de reducción, mientras que el pico de la banda de  $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ , perteneciente a los grupos hidroxilos libres, no muestra mucha variación comparado con el espectro del extracto puro debido a que estos grupos hidroxilo no participan en la reacción de reducción.



**Figura 1. 19.** Espectro FT-IR del extracto de hojas de *Aegle marmelos* a) antes y b) después de la reducción de AgNO<sub>3</sub> [35].

### 1.6.2 TERPENOIDES.

Los terpenoides pertenecen a la subclase de los prenolipidos, los cuales representan el grupo más grande de productos moleculares pequeños sintetizados por las plantas. Los terpenoides contribuyen al olor, sabor y color de algunas plantas, tales como la canela y el clavo [36]. Entre los terpenoides más comunes, presentes en las plantas, se encuentran el linalol y el eugenol. Este último es capaz de liberar un protón por medio del grupo <sup>-</sup>OH y transformarse a su forma aniónica. Además, se liberan dos electrones simultáneamente los cuales son los responsables de la reducción de los iones de oro y plata [33].

### 1.6.3 AZÚCARES REDUCTORES.

Los azúcares reductores tales como monosacáridos y oligosacáridos son polioles con grupos aldehídos disociados [34]. La habilidad de diferentes azúcares como agentes reductores para la

síntesis de nanopartículas metálicas fue demostrado por Panigrahi [37]. Su estudio mostró que se podían producir nanopartículas de tamaño uniforme si se usaba fructuosa mientras que cuando se usó glucosa y sucrosa se generaron partículas de tamaño variable. La función de los azúcares reductores se demostró cuando se usó sucrosa como agente reductor, observándose que no hubo producción de nanopartículas de plata cuando se empleó  $\text{AgNO}_3$  como agente precursor, mientras que las nanopartículas de oro si se sintetizaron empleando, en este caso,  $\text{HAuCl}_4$  como agente precursor. Este fenómeno sugiere que en lugar de la sucrosa no reductora, los compuestos realmente responsables de la bioreducción de nanopartículas fueron la glucosa y fructuosa producidas por la sucrosa después de ser hidrolizada por el ácido cloroaúrico.

#### **1.6.4 PROTEÍNAS.**

Debido a la estructura diversa de proteínas en comparación con polioles, el caso de biorreducción por las proteínas es generalmente más complicado. De acuerdo con el análisis FTIR de las nanopartículas biosintetizadas, la presencia de amida I y amida II, así como las bandas de estiramiento C-O se observan con frecuencia, lo que indica la presencia de grupos funcionales de proteínas [38]. Esto sugiere que las nanopartículas de Au se pueden unir a las proteínas a través de sus grupos amino libres o iones carboxilato de los residuos de aminoácidos. De hecho, los residuos de aminoácidos tales como arginina, cisteína, lisina y metionina se sabe que interactúan con los iones de Ag.

Das [39] realizó estudios de espectroscopía FTIR para determinar qué compuesto fue el responsable de la reducción de iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) en nanopartículas de plata ( $\text{Ag}^0$ ), empleando un extracto de hojas de *S. grandiflora*. Para ello obtuvo el espectro IR del extracto solo, en el cual se observaban distintos picos entre los cuales se localizó un pico que puede ser asignado al  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  o al  $-\text{C}-\text{O}-$ . Los picos más intensos fueron atribuidos a las vibraciones C-N así como a las bandas de las amidas I de las proteínas presentes en las hojas. Además, se observó un pico ancho a  $3419\text{ cm}^{-1}$ , el cual fue asignado a las vibraciones O-H, indicando la presencia de los grupos hidroxilo [40]. Posteriormente, se comparó el espectro del extracto con el obtenido de las nanopartículas de plata, mostrando solo cambios en la posición, así

como en las bandas de absorción. Lo anterior indica que las nanopartículas de plata sintetizadas empleando el extracto de hojas de *S. grandiflora* son cubiertas por las proteínas que tienen los grupos funcionales de aminos, alcoholes, cetonas y ácido carboxílico.

#### **1.6.5 ÁCIDOS ORGÁNICOS Y METABÓLICOS SECUNDARIOS.**

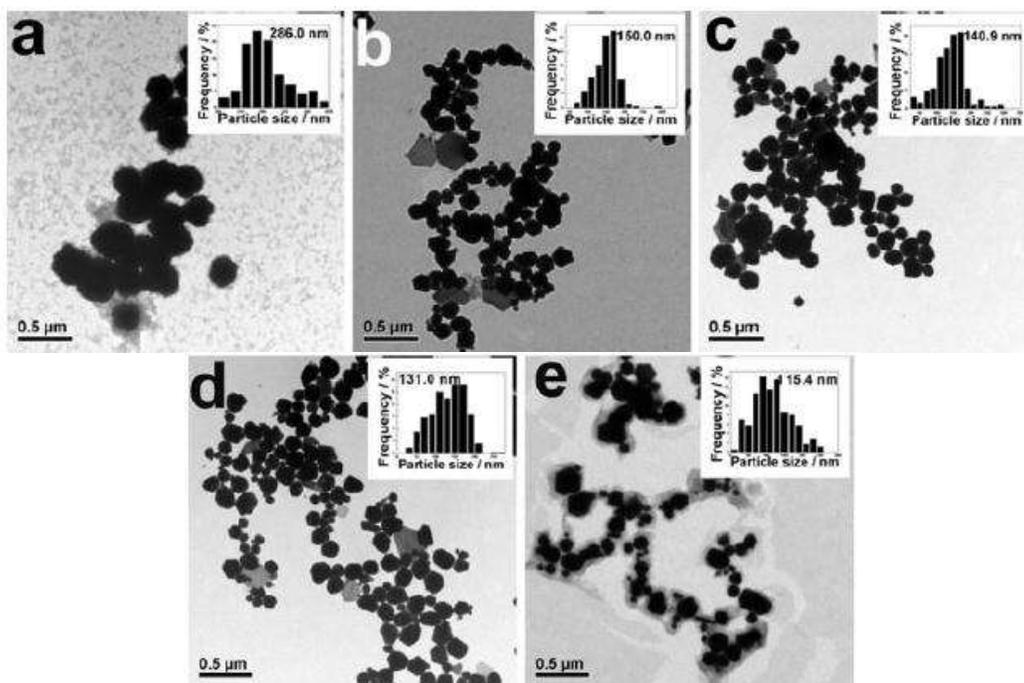
Las plantas son capaces de sintetizar una variedad de metabólicos al ser expuestas con metales. Estos metabólicos, particularmente amino ácidos tales como prolina e histidina, péptidos como glutadiona y ácidos murgineicos se acumulan a concentraciones en el rango milimolar, por lo que el contenido de estos metabólicos pueden funcionar como agentes reductores para la síntesis de nanopartículas. Bindhu et al [41], determinaron que el ácido ascórbico presente en el extracto de hojas de *H. cannabinus* fue el responsable de la reducción de nanopartículas de plata. Además, a medida que se incrementa el contenido de ácido ascórbico mayor número de nanopartículas de tamaños pequeños fueron sintetizadas. Otro tipo de ácido con la capacidad de reducir iones metálicos para formar nanopartículas es el ácido oxálico, el cual fue observado en el estudio realizado por Dwivedi [23], quienes emplearon un extracto de hojas de *Chenopodium álbum*, que es una planta con un alto nivel de ácido oxálico, el cual actúa como agente reductor para la conversión de nitrato de plata y ácido áurico en sus correspondientes nanopartículas.

#### **1.7 INFLUENCIA DE FACTORES EN LA FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR MEDIO DE PLANTAS.**

Existen varios factores que juegan un papel importante en la síntesis de nanopartículas. La concentración, forma y tamaño de ellas dependen en gran medida de dichos factores entre los que se encuentran el PH, la temperatura y concentración del extracto.

### 1.7.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA.

Varios estudios han encontrado que el control de la temperatura, durante el proceso de síntesis por medio de plantas es crítico en el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas. Lukman [38] reportó que exudados de semillas de *Medicago sativa* puede producir nanotriángulos de plata a temperaturas mayores de 30°C debido a la supresión de agentes controladores de la forma a temperaturas más bajas. Otro ejemplo que muestra el rol crucial de la temperatura de reacción en el proceso de control de forma fue demostrado en la formación de nanoalambres por medio del extracto de hojas de *Cassia fistula*, en donde se observó que los nanoalambres de plata se formaron a temperatura ambiente mientras que las nanopartículas esféricas y nanorodillos cortos se obtuvieron a una temperatura de 60°C. En este caso, los autores sugirieron que la interacción entre las biomoléculas y la plata pueden cambiar a elevadas temperaturas y por lo tanto, dificultar la coalescencia de nanopartículas en solución lo cual no es favorable en la formación de los nanoalambres de plata [40]. Con el objetivo de evaluar a detalle la influencia de la temperatura sobre las características de las nanopartículas de oro, Zhan [42] evaluó 5 diferentes temperaturas de reacción (30, 45, 60, 75 y 90°C), para lo cual mantuvo constante tanto el PH como la concentración del precursor ácido cloroaurico. Los resultados se muestran en la figura 1.20, los cuales revelan que la variación del tamaño tuvo una relación inversa con la temperatura de reacción ya que cuando se empleó una temperatura de 30 °C se obtuvieron nanopartículas mayores a 200 nm debido a la aglomeración. Por otro lado, cuando la temperatura de reacción fue de 90°C, el tamaño promedio de las nanopartículas de oro fue de 115 nm. Lo anterior se debe a que el incremento de la temperatura de reacción conlleva a la rápida reducción de los iones cloroauratos y la subsecuente nucleación homogénea, permitiendo la formación de nanopartículas de oro de tamaño pequeño y una distribución de tamaño estrecha.



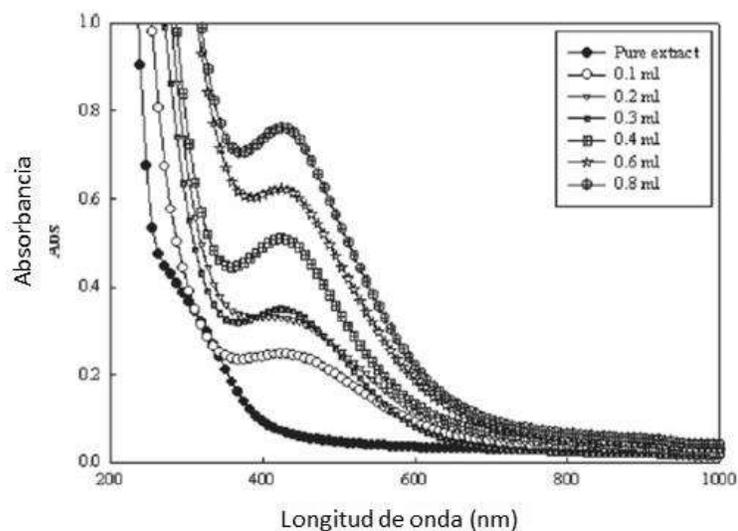
**Figura 1. 20.** Imágenes de MET que corresponden a las nanopartículas de oro sintetizadas a diferente temperatura de reacción de a) 30, b) 45, c) 60, d) 75 y e) 90°C [42].

### 1.7.2 RELACIÓN DE EXTRACTO DE PLANTA A CONCENTRACIÓN METÁLICA.

Como lo predice el modelo LaMer, la formación de nanopartículas pudiera pasar solo cuando la concentración del precursor está dentro de un rango apropiado para la nucleación. Sin embargo, es la disponibilidad de los agentes reductores y estabilizadores los que determinan si esos precursores metálicos pueden ser reducidos y finalmente conducir a la formación de nanopartículas [33]. Por lo tanto, la concentración del extracto de la planta usado durante la síntesis, no debe pasarse por alto ya que determina la extensión de la reducción y estabilización ejercida por las moléculas que pueden afectar las formas y tamaños finales de las nanopartículas. Esto fue demostrado por Prathna et al [43], quienes sintetizaron nanopartículas de plata empleando extracto de Citrus limón. Los resultados mostraron que se formaban nanopartículas más pequeñas al incrementar la relación entre el extracto y la

solución metálica, lo cual puede deberse al incremento de la cantidad de agentes bioreductores cuando se incrementa la dosis del extracto en el medio de reacción.

Similares observaciones fueron realizadas por Zayed et al [44], cuyos resultados se muestran en la figura 1.12, que es un espectro de absorción de UV-Vis de las nanopartículas de plata sintetizadas empleando diferentes cantidades de extracto de Malva parviflora que van de 0 a 0.8 ml. En primer lugar, no se observa ninguna banda de absorción para la muestra de extracto de Malva parviflora. Sin embargo, una pequeña banda de absorción a 438 nm comienza a aparecer en el espectro de la muestra con 0.1 ml del extracto. Esta banda de absorción crece y se mueve ligeramente de 438 a 425 nm a medida que se incrementa la cantidad del extracto empleado. El incremento de la intensidad de los picos indica que la concentración de nanopartículas de plata aumenta, mientras que la simetría y absorción estrecha del pico implica que la distribución de tamaño de las nanopartículas es estrecha para cuando se incrementa la cantidad de extracto de Malva parviflora. Además, el movimiento de la banda de absorción máxima indica que el tamaño de las nanopartículas de plata disminuye a medida que se incrementa la cantidad del extracto figura 1.21. Lo anterior se debe a que a medida que el contenido del extracto se incrementa, la velocidad de nucleación homogénea espontánea incrementa y un mayor número de núcleos son formados. Por lo tanto, el número final de partículas incrementa también y el tamaño de partícula disminuye.

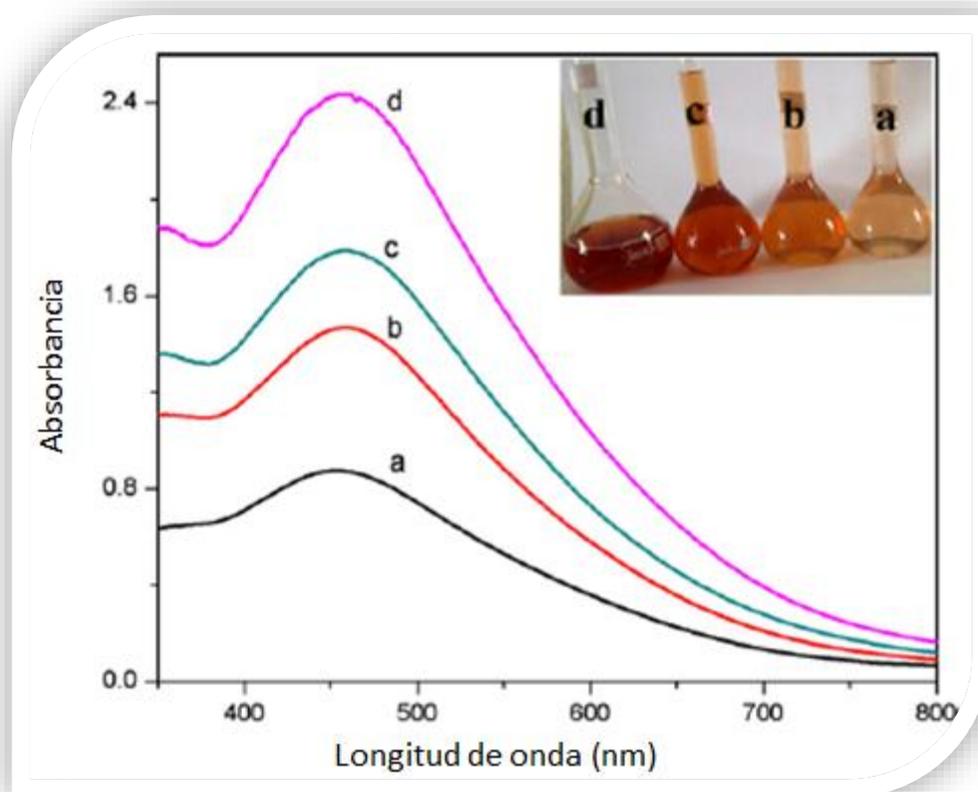


**Figura 1. 21.** Espectro de absorción de UV-Vis de las nanopartículas de plata en función de la cantidad de Malva parviflora con una concentración fija de  $\text{AgNO}_3$  [44].

Por otra parte, la forma de las nanopartículas también dependen de la cantidad de extracto empleado, tal y como lo demostró Song et al [36]. En este estudio se observó que la mayoría de las nanopartículas formadas al emplear una concentración de extracto >10% fueron esféricas mientras que cuando se usó 5% del extracto se observaron estructuras en forma de placas. Shukla et al [45] reportó que la relación de partículas esféricas a partículas triangulares o hexagonales incrementó con la cantidad del extracto. De estos hechos, se puede deducir que los iones metálicos prefieren formar nanopartículas esféricas cuando hay suficientes agentes estabilizadores disponibles en dosis altas de extractos. Cuando se emplearon altas dosis de extracto, la disponibilidad de biomoléculas en exceso resultó en una fuerte interacción entre los agentes protectores estabilizadores y las superficies de las nanopartículas, conllevando a la formación de partículas esféricas más estables. Además, si esta interacción se intensifica incrementando la concentración del extracto, el tamaño de las nanopartículas esféricas puede reducirse. Por otra parte, otras formas de nanopartículas tales como estructuras hexagonales y triangulares pueden formarse empleando concentraciones de extracto pequeñas. Se estima que las nanopartículas pueden alcanzar un estado mayor de estabilidad transformándose a otras formas o a través del alargamiento de las partículas si no hay suficientes biomoléculas para la reducción y estabilización [33].

Bindhu et. al [41], realizó un estudio a detalle del efecto de la concentración del extracto en las características de las nanopartículas de plata, para lo cual empleó un extracto de hojas de *Hibiscus cannabinus* como agente reductor y estabilizador y evaluó diferentes concentraciones del extracto. La figura 1.22 muestra el espectro de UV-Vis de las nanopartículas empleando 4 diferentes concentraciones del extracto. Como se puede observar, el pico de absorbancia depende de la concentración del extracto ya que se vuelve más definido a medida que la concentración incrementa. Además, a medida que la concentración del extracto aumenta, el ancho del pico disminuye y se aprecia un desplazamiento del pico del plasmón el cual indica que el diámetro medio de las nanopartículas de plata disminuye. Dicho desplazamiento y forma estrecha de la banda de resonancia de la superficie de plasmón indica la formación de nanopartículas esféricas, además de una distribución homogénea. Por lo tanto, la influencia de la concentración del extracto sobre la síntesis de las nanopartículas se debe a que a medida que la concentración aumenta, mayor cantidad de ácido ascórbico está disponible para reducir

iones de plata y formar un gran número de nanopartículas muy pequeñas, dando como resultado una fuerte e intensa banda de resonancia. Por otra parte, en la figura 1.22 se puede observar el cambio de color de las nanopartículas preparadas para las diferentes concentraciones del extracto de *H. cannabinus*. Dicho cambio se debe a que a medida que la concentración incrementa, mayor número de biomoléculas están disponibles en el extracto, las cuales serán útiles en el proceso de reducción, resultando en un color más intenso.



**Figura 1. 22.** Espectro de UV-Vis de nanopartículas de plata a diferentes concentraciones de extracto de hojas de *H. cannabinus* (a, b, c, d vs 1, 2, 4 y 5ml de extracto respectivamente). En el recuadro se observan los cambios de color en la solución para las diferentes concentraciones del extracto [41].

## 1.8 TAXONOMÍA DEL PIRUL.

Botánica y ecología.

Árbol de 15m de altura, siempre verde con ramas colgantes, aromático resinoso, con tronco grueso. Las hojas están divididas en hojitas como plumitas, las flores son pequeñas de color crema parecen encaje, con los frutos globosos y de color rojo rosa (figura 1.23).

Química.

Las hojas y frutos de *S. molle* contienen un aceite esencial rico en mono y sesquiterpenos. En el aceite obtenido del fruto, el mejor estudiado, se han identificado los monoterpenos alfa-cadineno, canfeno, carvacrol, para-gimeno, butirato de geraniol, limoneno, mirceno, hexanoato de nerol, alfa y beta-felandreno, alfa y beta-pineno, sabineno, alfa y gamma-terpineno, alfa terpineol y el éster del ácido fórmico y terpinoleno; y los sesquiterpenos trans-ene-alfa-bergamont, bouboneno, alfa, beta, y T-cadinol. En el aceite esencial de la hoja se han identificado los monoterpenos car-3-ene, carvacrol, alfa-fenandreno, y el lignano croweacín. Otros componentes de este órgano son el sesquiterpeno iso-precalamenediol, los flavonoides, quercetín y rutín y el esteroles, beta-sitosterol. En este grupo el compuesto alfa-amirina se ha detectado en toda la planta, así como el esteroles beta-sitosterol [46].



**Figura 1. 23.** Hojas y fruto de pirul (*Schinus molle*).

La síntesis ecológica de AgNps es controlada por diversas variables que influyen en el proceso de formación de las nanopartículas, los cuales a su vez son modificadores de forma y controladores de tamaño. La síntesis asistida por plantas para la reducción del  $\text{AgNO}_3$  es relativamente rápida, pero comprender los mecanismos de reacción es complejo ya que atribuir a una sola sustancia la reducción de las sales precursoras, requiere de una investigación más a fondo, por otra parte la biodiversidad de flora en México es muy amplia y cada planta contiene sustancias activas diferentes, por lo que en cada sistema la reducción será totalmente diferente. Debido a la complejidad de la reacción de reducción, la relevancia de una investigación bibliográfica previa es primordial para comprender los principios básicos que rigen el proceso de síntesis, además de identificar las sustancias que la planta contiene, esto con el fin de determinar teóricamente si la reacción procederá de una manera positiva. En el presente trabajo la síntesis se realizó a temperatura ambiente utilizando diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  y extracto de pirul, para determinar la influencia de las concentraciones en la forma y tamaño de las AgNPs sintetizadas.

## CAPÍTULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental consta de 4 etapas principales las cuales son mostradas de manera general en la figura 2.1. En primera instancia se encuentra la preparación del extracto de la planta usando el método de infusión, posteriormente se llevará a cabo la síntesis de las nanopartículas por reacciones de precipitación en disoluciones acuosas a diferentes concentraciones variando el agente reductor, seguido de la caracterización correspondiente a espectroscopía de absorción ultra-violeta-visible (UV-Vis), difracción de rayos-X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por último se evaluarán las propiedades antibacteriales de las nanopartículas de plata en cultivos de la bacteria E. Coli.



**Figura 2. 1.** Esquema experimental desarrollado

## 2.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE PLANTA.

En la primera etapa se llevó a cabo un tratamiento previo de las plantas en el cual se realizó un lavado con agua potable y otro con agua destilada, esto con el fin de eliminar los agentes externos tales como el polvo, organismos vivos y suciedad del medio ambiente que pudieran influir en el proceso de síntesis de las nanopartículas. Posteriormente, se llevó a cabo el secado de las plantas a temperatura ambiente en un cuarto fresco, con sombra y libre de los rayos UV para evitar la degradación de las sustancias activas.

Para tener un mejor manejo del peso y homogenización de las plantas se realizó una molienda mecánica de alta energía en seco a las hojas, tallos y frutos de las plantas con el equipo SPEX 8000-M. figura 2.2. Las condiciones de molienda se muestran de manera resumida en la Tabla 2.1.

**Tabla 2. 1.** Condiciones de molienda.

Tipo de molino	Vibratorio, Spex 8000M Mixer/Miller
Contenedor utilizado (Vial)	Acero endurecido
Numero de bolas	2 (Acero endurecido)
Cantidad de la muestra a moler	10 g.
Tiempo de molienda	8 min.



**Figura 2. 2.** Equipo de molienda SPEX 8000-M.

Los polvos obtenidos después de la molienda mecánica fueron almacenados en viales para su posterior uso en la preparación de las infusiones figura 2.3.



**Figura 2. 3.** Polvos de pirul pesados en balanza digital.

El método de preparación del extracto se realizó por infusión en una parrilla eléctrica figura 2.4, el cual consistió en hervir un volumen de agua destilada correspondiente a 100 ml variando los gramos de la planta añadida, a una temperatura de 70°C, por un lapso de 20 min y agitando magnéticamente a 900 rpm ver Tabla 2.2.

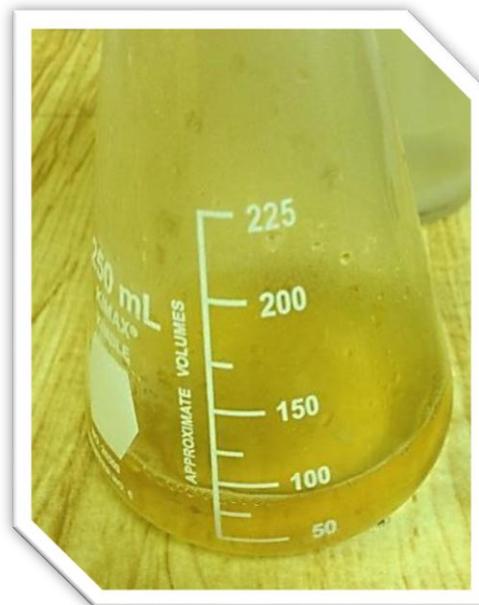
**Tabla 2.2.** Parámetros para la preparación de extractos.

Volumen de agua destilada en ml.	Polvos de la planta en g.	Temperatura °C.	Tiempo en min.
100	1	70	20
100	2		
100	3		
100	4		
100	5		



**Figura 2. 4.** Parrilla eléctrica thermo scientific sp131325.

Las infusiones obtenidas se filtraron con papel whatman n ° 41 para eliminar cualquier residuo de la planta y así se obtuvo el extracto final figura 2.5. Se determinó por los ensayos de disolución mencionados anteriormente que la cantidad de polvo de pirul adecuada para obtener el extracto corresponde a 2g en 100 ml.



**Figura 2. 5.** Extracto de pirul.

## 2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

Para la síntesis de NPs de Ag se utilizó un método ecológico, por lo que los materiales utilizados fueron:

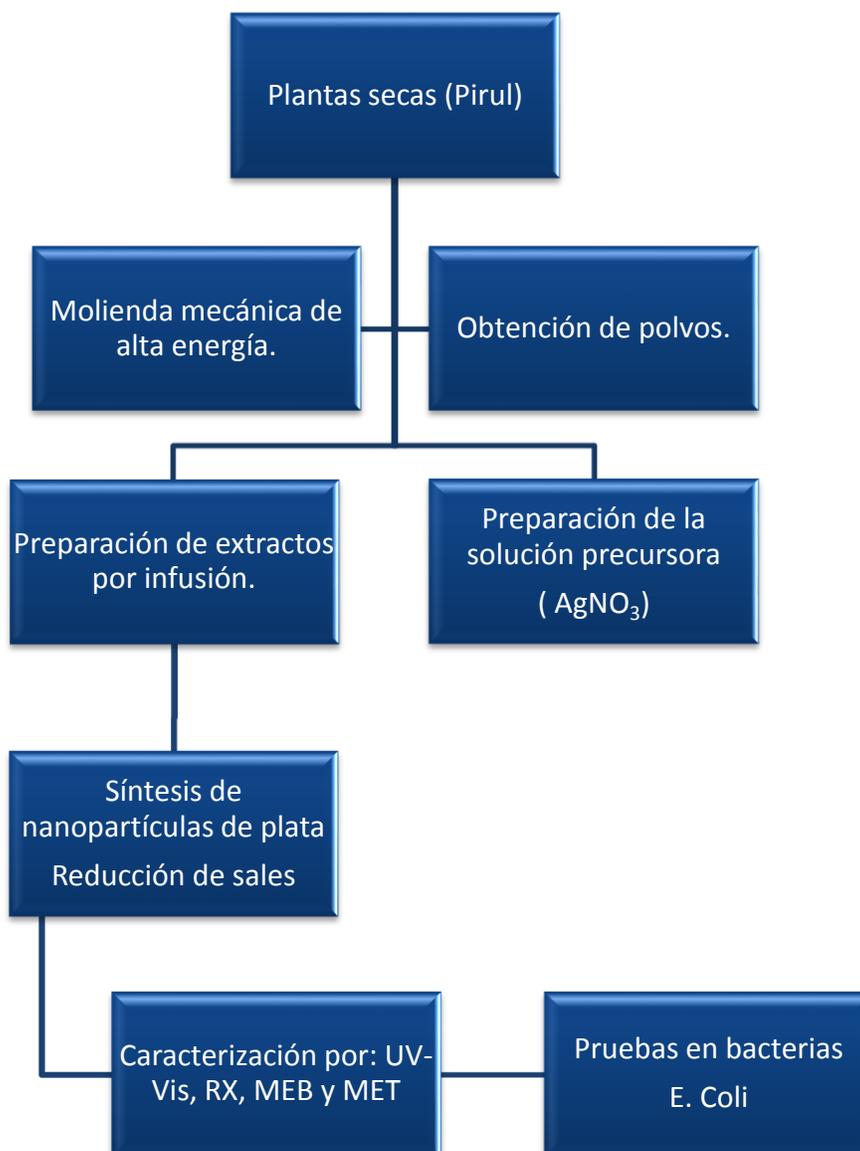


La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo al mezclar la disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  a diferentes concentraciones milimolares con la infusión del extracto de planta, debido a una reacción de precipitación, donde el precipitado sólido e insoluble fue correspondiente a las nanopartículas de plata. Se varió el volumen del extracto de pirul para determinar su efecto en la reducción de la sal precursora Tabla 2.3.

**Tabla 2. 3.** Reacciones de síntesis realizadas variando el volumen del extracto de pirul.

Volumen de la sal precursora ( $\text{AgNO}_3$ )	Concentración mM	Volumen de agente reductor en ml	Muestras Obtenidas
10 ml	3	5, 7, 9, 10	16
	5	5, 7, 9, 10	
	7	5, 7, 9, 10	
	9	5, 7, 9, 10	

Un indicador de que la reacción procedió, fue un cambio en la coloración de la solución, en la figura 2.6 se presenta de manera más extensa el procedimiento realizado para la obtención de las nanopartículas de plata por un método ecológico:



**Figura 2. 6.** Diagrama seguido para la síntesis ecológica de nanopartículas de Ag.

### **2.3. PRUEBAS EN BACTERIAS E. COLI.**

Para este propósito se prepararon 150 ml de medio de cultivo Mueller Hinton con agua, se calentó hasta disolver y hervir. El medio fue introducido a un autoclave para esterilizarlo a una temperatura de 121 °C y presión de 1.5 psi. Posteriormente se colocaron 15 ml del medio de cultivo en una caja de Petri. Se dejó enfriar y solidificar, hasta que una especie de gel se formó, todo esto se desarrolló en medio estéril. La caja fue sellada y se introdujo a una incubadora manteniendo la temperatura a 36 °C.

En el caso de la preparación de las bacterias, el asa bacteriológica se sumergió en el medio donde fueron proporcionadas las bacterias inoculadas y se sembró en una caja Petri por la técnica de estriado, en esta técnica una gota de cultivo es tomada mediante una asa bacteriológica estéril, después se distribuye la muestra sobre la superficie del medio dibujando estrías dejando de esta forma un gran número de bacterias y una baja cantidad de colonias aisladas. Se colocó el cultivo en la incubadora para el crecimiento de las bacterias durante 1 día. Después se tomó una colonia de bacterias aislada del cultivo anterior y se sembró en la caja de Petri con el agar, para obtener bacterias más jóvenes y aisladas.

Posteriormente se sumergió el asa bacteriológica en las bacterias previamente proporcionadas y en el medio Mueller Hinton líquido (sin mucho agar para que no solidifique, se puede adquirir de ésta forma) se coloca y se agita, a esto se le llama inoculación en medio líquido. Se dejó incubar por dos horas para que el medio alcance una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland, la cual se usa como referencia en las suspensiones bacteriológicas. En una caja de Petri con el medio se realizó un césped, es decir se coloca un hisopo estéril al inoculo líquido que se preparó anteriormente y se escurre un poco sembrando las bacterias que están en el hisopo en la caja. Se colocaron unos discos hechos de papel filtro y previamente esterilizados en las caja de Petri y sobre ellos se colocaron mediante una micropipeta 6 microlitros de las nanopartículas, el agua, el nitrato o el antibiótico, todos ellos para propósitos de comparación, las mediciones del diámetro del disco en caso de inhibición de crecimiento de bacterias fueron realizadas después de un día.

## 2.4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.

### 2.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRA-VIOLETA-VISIBLE (UV-Vis).

Esta técnica es de gran relevancia en el estudio de las nanopartículas suspendidas en solución (coloides), debido a que se puede realizar el análisis de muestras líquidas y las corridas son relativamente rápidas. Esta espectrofotometría utiliza radiaciones en el campo de UV entre 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, el equipo utilizado fue UV-VIS, Usb 4000 ver figura 2.7. En la espectroscopía UV-Vis, las muestras fueron colocadas entre una fuente de luz y un fotodetector, midiéndose la intensidad del haz de luz antes y después del paso del haz a través de la muestra. Cada espectro es corregido utilizando un “blanco”, es decir el espectro únicamente del medio de dispersión (agua destilada), para garantizar que las características espectrales de la muestra de estudio no estén alteradas por las del medio de dispersión. Las nanopartículas metálicas de plata, tienen la característica de que interactúan de manera muy importante con ciertas longitudes de onda de la luz, exhibiendo una banda de absorción característica en el UV-Vis, la cual no está presente en el espectro del metal a granel. Esta banda de absorción se encuentra en un rango de 380-450 nm para las nanopartículas de plata. Por lo tanto, esta técnica fue de gran importancia para determinar la formación de nanopartículas, además de que por medio de los cambios observados en los espectros se puede determinar cambios en la concentración, forma y tamaño de las nanopartículas metálicas.



**Figura 2.7.** Equipo de Ultra violeta visible Usb 4000.

## 2.4.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX)

Una vez que se obtuvieron las reacciones de precipitación se secaron a temperatura ambiente en sus vasos de precipitado para la obtención de los polvos los cuales fueron analizados por medio de difracción de rayos-X, para observar la presencia de la plata pura, y así corroborar que el precipitado correspondió efectivamente a las nanopartículas de plata. La figura 2.8 muestra el difractómetro de la marca SIEMENS D5000, que trabaja con una radiación  $K\alpha$  de Cu y una longitud de onda de  $1.5406\text{\AA}$ . Las muestras fueron colocadas en un portamuestra de vidrio esmerilado y corridas en un rango angular de  $20$  hasta  $70^\circ$  empleando un tiempo de 3 segundos por paso para obtener colección de datos durante el análisis, ya que los polvos se encuentra en el rango nanométrico las intensidades de los picos se pudieron ver deprimidas.



**Figura 2. 8.** Difractómetro de Rayos X Siemens D5000.

### 2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).

El análisis por microscopía electrónica de barrido se realizó para observar el tamaño y dispersión de las nanopartículas obtenida en las reacciones de reducción antes descritas, así como realizar un análisis químico para asegurar que sólo el elemento de interés esté presente. Los productos de la reacción (nanopartículas en suspensión), fueron secados a temperatura ambiente para obtener polvos, los cuales se analizaron por esta técnica para observar la morfología de los polvos y las nanopartículas de plata presentes en ellos. La preparación se realizó colocando una gota del coloide o una cantidad de polvo en cinta de carbono ya sea el caso para sólido o líquido, para evitar que las partículas se desprendan dentro del microscopio y principalmente asegurar la conductividad entre las mismas y el portamuestras, cuya geometría es cilíndrica y se introduce hasta la zona de observación después de someterse a una cámara de prevacío en el microscopio.

En la figura 2.9 se muestra el microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL JSM-7600F, el cual tiene un filamento de emisión termoiónica que se mantiene bajo una operación de 15 KeV. Este microscopio cuenta con un detector de EDS para efectuar un análisis químico puntual cuya sensibilidad es de alrededor de 1000 ppm.

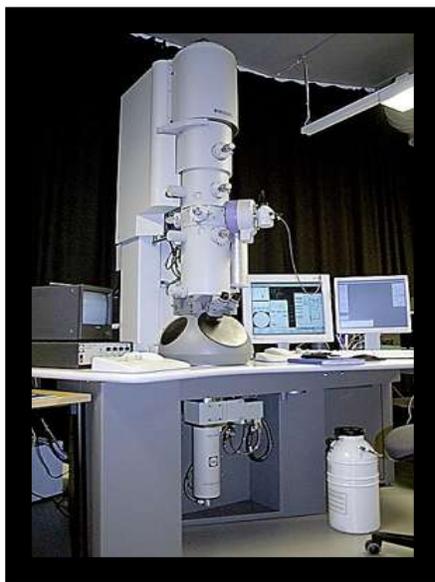


**Figura 2.9.** Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F.

#### **2.4.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET).**

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el estudio de los nanomateriales debido a su gran capacidad de resolución (0.21 nm), y a las ampliaciones con las cuales se puede trabajar ( $1 \times 10^3$ –  $2 \times 10^6$  X). Debido al tamaño tan pequeño del orden nanométrico de las nanopartículas de plata, imágenes que reflejan claramente la morfología y el tamaño de esta clase de partículas se obtuvieron haciendo uso del microscopio electrónico de transmisión fig. 2.10. Actualmente el microscopio electrónico de transmisión es una herramienta muy versátil que permitió no solamente obtener las características morfológicas de las partículas sino también el arreglo atómico de la red cristalina además de obtener información química de las nanoestructuras permitiendo así una caracterización más completa.

La preparación de las muestras se llevó a cabo depositando los polvos secos en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro la cual está cubierta con una película de carbono amorfo. Mediante esta técnica se pueden corroborar los resultados obtenidos por UV-Vis en lo referente al tamaño, forma y composición química de las nanopartículas.



**Figura 2.10.** Microscopio Electrónico de Transmisión Phillips Tecnai F20.

## CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

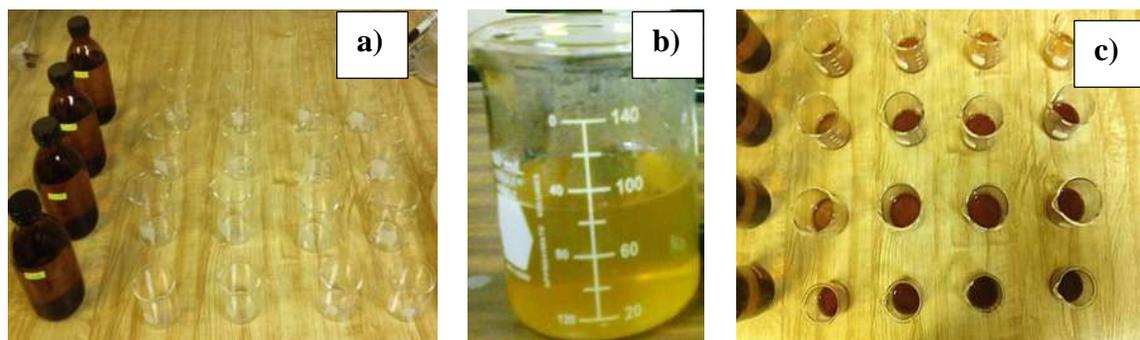
Este capítulo se centra en el desarrollo de un método de biosíntesis a temperatura ambiente, para la producción de nanopartículas de plata utilizando la química verde y su caracterización por los diferentes tipos de técnicas anteriormente mencionadas.

### 3.1 CARACTERIZACIÓN POR UV-VIS DE LAS MUESTRAS SUJETAS A REACCIÓN.

Es bien sabido que las nanopartículas de plata exhiben un color amarillento-marrón en solución acuosa debido a la excitación de las vibraciones plasmónicas sobre la superficie de las nanopartículas de plata. La reducción de los iones de plata a nanopartículas puede ser observada mediante un cambio de color y espectroscopía de UV-vis. La técnica de UV-Vis ha demostrado anteriormente ser muy útil para el análisis de las nanopartículas en general, no solo en las de este metal. Por lo tanto, la evolución de la reacción de reducción en este trabajo, fue monitoreada tanto por el cambio de color, además de las condiciones físicas de la reacción, así como por la técnica de UV-Vis. La figura 3.1 muestra las fotografías de izquierda a derecha de diferentes soluciones que contienen; a) el nitrato de plata, b) el extracto del Pirul y c) la solución después de la finalización de la reacción conteniendo la muestra con las mejores cantidades de soluciones extracto y nanopartículas (Nps). Se puede apreciar un color transparente en la primera de ellas, un color amarillo en la segunda y finalmente la aparición de un color que va de marrón a rojo en la solución después de la reacción, con esto se confirma el color típico de las Nps de Ag en solución coloidal, sin embargo, siempre es necesario presentar diferentes técnicas que hagan más evidente el éxito, en este caso de la reacción efectuada.

Las nanopartículas de plata también se caracterizaron por espectroscopía de UV-Vis, una de las técnicas indirectas más ampliamente utilizadas para la caracterización estructural de las nanopartículas de plata y de otros metales, tal y como ha sido previamente mencionado [17]. Las longitudes de onda de la luz entre 300-800 nm son generalmente utilizadas para la caracterización de diversas nanopartículas de metal en el rango de tamaño

de 2 a 100 nm. La biorreducción de plata en la solución de reacción filtrada se monitorió por toma de muestras periódica de la mezcla de reacción a intervalos regulares de tiempo mediante el uso de espectroscopía UV-Vis.



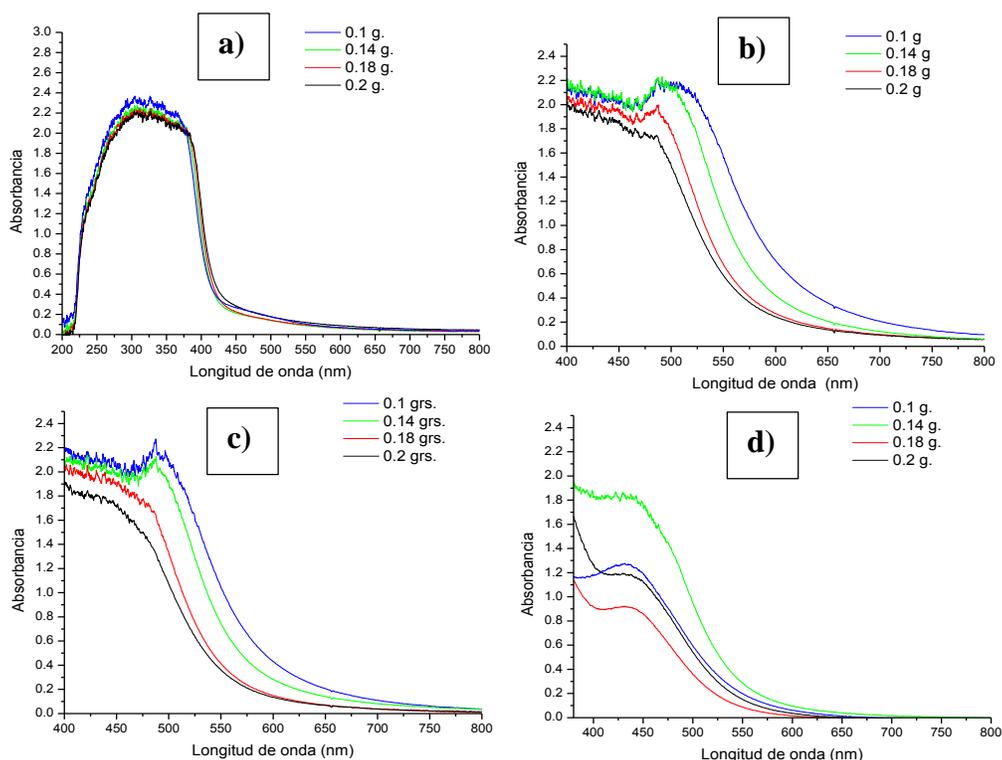
**Figura 3. 1.** Imágenes mostrando: a) nitrato de plata, b) el extracto del Pirul y c) solución después de la reacción de reducción.

La figura 3.2, ilustra los espectros de absorción de las Nps de Ag como función del tiempo de reacción desde 0.25, 2, 4 y 6 hrs., respectivamente, para una concentración de plata de 3mM  $\text{AgNO}_3$  y diferentes cantidades en gramos del extracto de pirul que van desde 0.1, 0.14, 0.18 hasta 0.2 g. La figura 3.2a, indica que para un tiempo inmediato de reacción (0.25 hrs) e independientemente de la cantidad variada de agente reductor (extracto del pirul), ningún pico característico de la absorción de plata es observado, lo que indica que la reacción no es inmediata, en cambio un pico difuso de amplias longitudes de onda se presenta como resultado de las diversas sustancias que contiene el Pirul. Sin embargo, una señal de absorción sobre el ruido de fondo se observa en la figura 3.2b entre los 490 y 525 nm que puede ser caracterizada por la presunta presencia de las Nps plata, estos espectros corresponden a un tiempo de reacción de 2 hrs.

Es importante señalar que la plata en forma nanoparticulada, cuando es analizada por la técnica de UV-Vis, muestra un pico del plasmón de absorción en su superficie con un máximo de aproximadamente 430 nm [47]. En este caso el desplazamiento espectral se debe principalmente a la constante dieléctrica del medio, ha sido reportado que incluso variaciones en la posición de los picos de absorción de la plata van desde los 340, 380, 420, 460, 500, 540,

580 y hasta 620 nm, presentándose debido a las diferentes mezclas de sustancias participantes en el extracto de reacción.

De esta figura 3.2b, otra tendencia que se debe señalar de la evolución de la reacción es que ese pico de absorción (475 nm) se presenta con más intensidad para cuando la cantidad de extracto utilizada es menor, siendo este fenómeno anómalo con respecto a lo reportado en la literatura, en donde a medida que el agente reductor crece la reducción procede con mejor eficiencia, esto se puede deber a que a mayor extracto de pirul el tamaño de las nanopartículas también incrementa siendo menos perceptible a esta técnica de caracterización.



**Figura 3. 2.** Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0.25, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 3mM de  $\text{AgNO}_3$  variando los gramos de pirul añadidos.

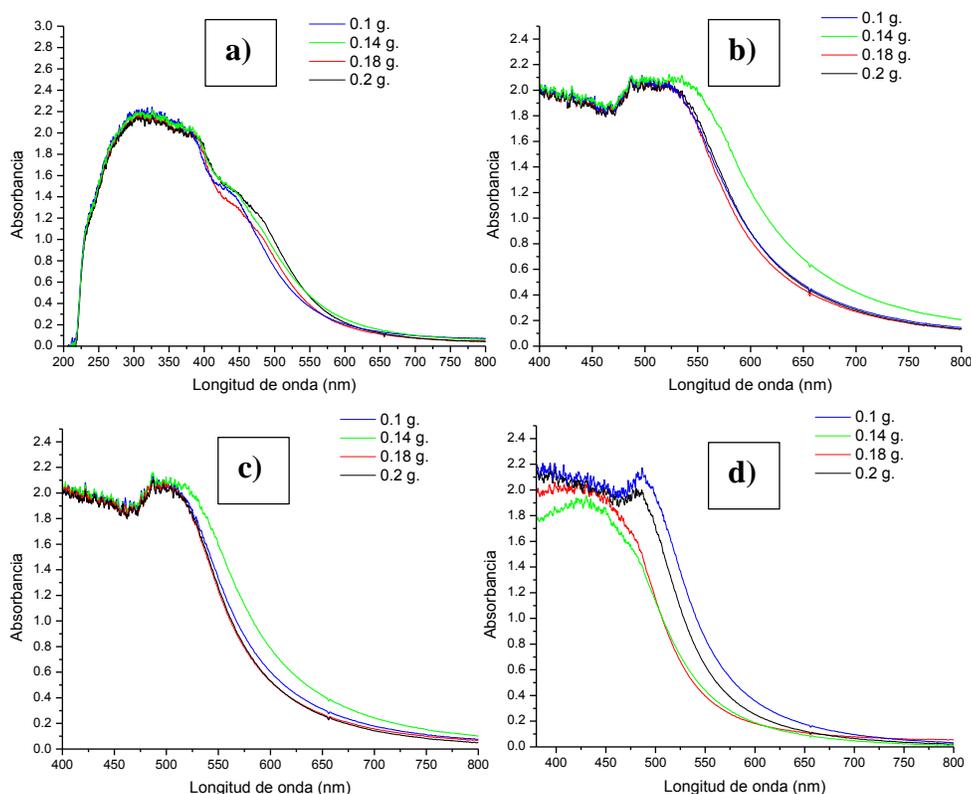
La figura 3.2c, correspondiente a las curvas de UV-vis de las muestras ensayadas para un tiempo de reacción igual a 4 hrs., indican la misma tendencia que la muestra anterior en donde, hacia menor cantidad agregada de pirul el pico de absorción presumiblemente asignado

a la plata se incrementa. Esa posición del pico de absorción sigue estando entre los 475 y 525 nm. Debe señalarse que este comportamiento es atípico dado que en la síntesis por reducción química convencional, siempre a medida que el agente reductor se incrementa la cantidad de nanopartículas se incrementa y el tamaño de las mismas se reduce [48]. En la investigación realizada mediante extractos de plantas, aunque existe aún poca información acerca de la variación de la concentración del extracto (agente reductor) en la cantidad de nanopartículas formadas, en general se ha observado el mismo comportamiento, es decir, a medida que la concentración del extracto se incrementa la cantidad de nanopartículas se incrementa en solución [49]. Aunque este comportamiento se repite en ambas muestras (2 y 4 hrs.), una razón probable a la que se pueda atribuir este comportamiento es difícil hasta este momento de encontrar, por tanto continuemos con el análisis de los demás resultados.

Cuando se observan las curvas de UV-vis (figura 3.2d) después de 6 hrs. de reacción e independientemente de la cantidad del extracto utilizado, el pico del plasmón de plata se encuentra mejor ubicado entre los 475 nm, sin embargo, no existe una clara correlación entre la intensidad del pico de absorción con la concentración del extracto utilizada, resultados que serán posteriormente discutidos al término del análisis de todas las muestras ensayadas por UV-vis. Se aprecia que estas curvas presentan una forma más definida entre todos los experimentos expuestos, encontrándose con menos ruido de fondo, esto puede estar correlacionado con la formación de las nanopartículas en mayor cantidad y con una distribución de tamaño mejor, según previos resultados [50].

La figura 3.3 muestra los datos obtenidos para la reacción empleando una cantidad de 0.007 g. de  $\text{AgNO}_3$  (5 mM) y diversas, pero las mismas cantidades de extracto de pirul, empleadas en los experimentos anteriormente mostrados en la figura 3.2 (0.1, 0.14, 0.18 y 0.2 g. de pirul). La figura 3.3a, corresponde a las curvas registradas inmediatamente después de agregar el extracto a la sal para la reacción de reducción. Como se logra observar se presenta aproximadamente el mismo comportamiento correspondiente a la figura 3.2a, en donde independientemente de la cantidad de pirul, un gran pico difuso se presenta. Sin embargo, en esta muestra otro ligero pico difuso en el rango aproximado de los 425 a 475 nm se observa, la aparición de este pico en esa región se está atribuyendo en este trabajo, a la presunta presencia

de plata metálica en la solución y el ensanchamiento del mismo, se ha reportado previamente [51] el ensanchamiento se debe a una amplia distribución de tamaños de partícula.

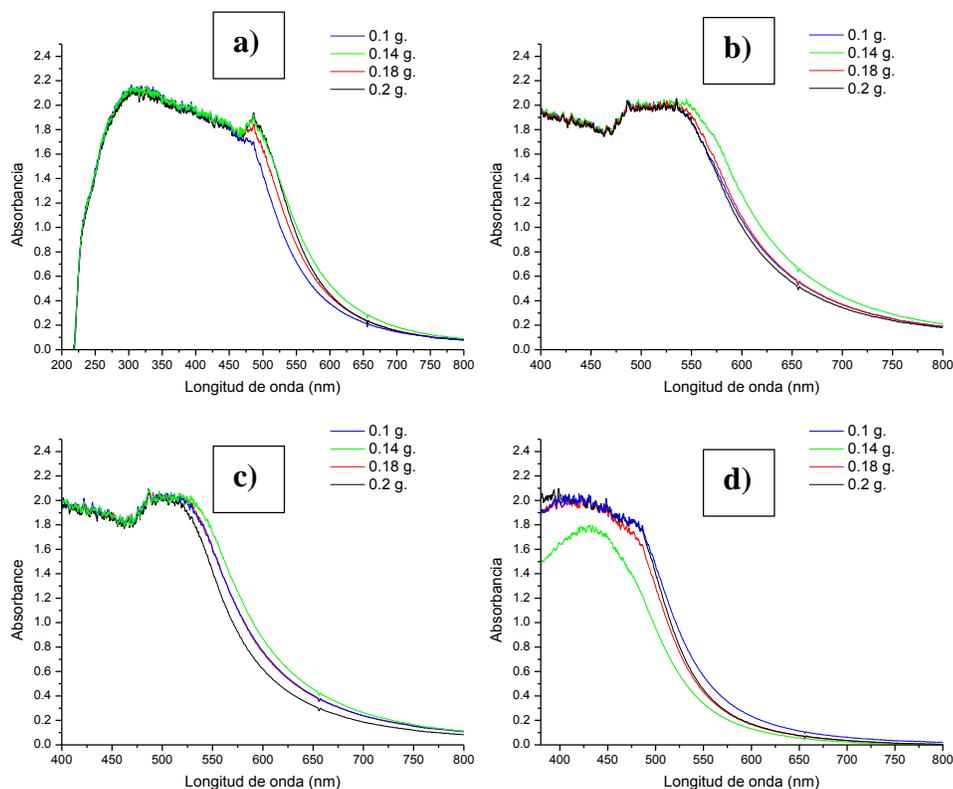


**Figura 3.3.** Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0.25, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 5mM de  $\text{AgNO}_3$  variando los gramos de pirul añadidos.

Las figuras 3.3 b-c, corresponden a las mismas concentraciones anteriores de sal de plata y pirul, empero, evaluadas después de un tiempo de reacción igual a 2 y 4 horas. Como se logra notar, independientemente de la cantidad de pirul y de plata en la reacción, ambos conjuntos de curvas ilustran el mismo comportamiento, es decir, un pico difuso presente en el rango de longitudes de onda de absorción entre 475 y 575 nm para la muestra de 2 horas de reacción (figura 3.2b) y de 475 a 550 nm para la muestra de 4 horas de reacción (figura 3.2c). Es importante mencionar que este comportamiento fue idéntico para las muestras de 3 mM de plata (figuras 3.2 b-c), en donde el pico difuso atribuido a la nanopartículas de plata se desplaza hacia la derecha con el tiempo de reacción y se vuelve más estrecho. Además, hacia concentraciones menores el resultado de la reacción es mejor.

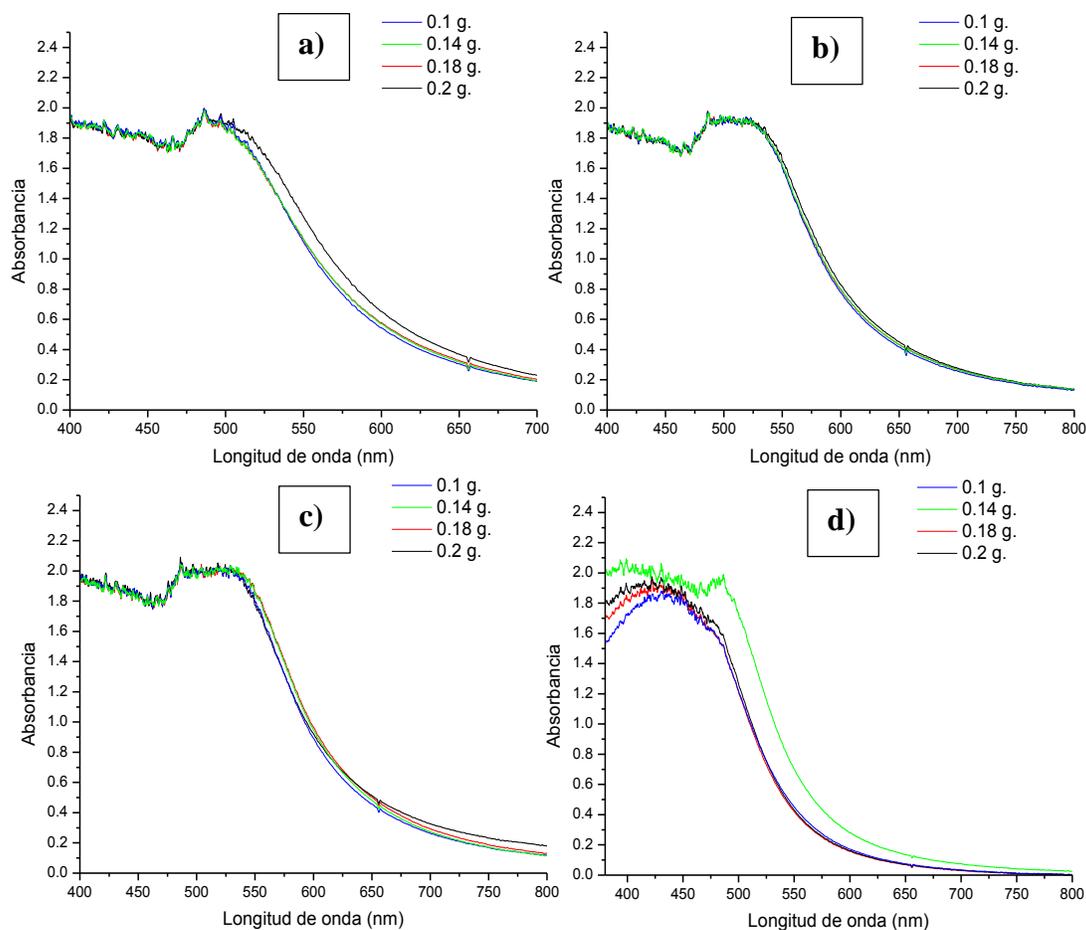
Para un tiempo de reacción de 6 horas el comportamiento observado indica que los picos referidos a la presencia de Nps de Ag, se desplazan hacia la izquierda estando ahora en el rango de longitudes de onda de 415 hasta 525 nm. Esta situación es similar a la observada para la muestra de 3 mM de  $\text{AgNO}_3$  en donde también los picos se desplazan a medida que el tiempo de reacción se incrementa. Sin embargo, no existe una clara correlación entre la cantidad de Nps formadas.

Las figuras 3.4 y 3.5 ilustran de igual forma los resultados obtenidos para una concentración de nitrato de plata de 7 y 9 mM, para las diferentes adiciones de pirul, siendo las mismas que en los experimentos anteriores y para los diferentes tiempos de reacción. Aproximadamente, los mismos resultados por UV-vis son obtenidos de estas muestras, en donde, la figura 3.4a, correspondiente a un tiempo inmediatamente después de la reacción (0.25 hrs.), indica que un pico de absorción entre los 475 y 550 nm., el cual no manifiesta relación alguna con la concentración del extracto utilizado. El mismo comportamiento es observado para las figuras 3.4 b-c-d, con diferencia que esta última presenta un pico bien definido para concentración de 0.14 mM.



**Figura 3.4.** Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0.25, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 7mM de  $\text{AgNO}_3$  variando los gramos de pirul añadidos.

Con lo que respecta a las muestras usando 9mM de  $\text{AgNO}_3$ , las figuras 3.5 a-b-c-d muestran el mismo comportamiento ya descrito en las anteriores concentraciones usadas de  $\text{AgNO}_3$ , en donde a medida que el tiempo de reacción se incrementa el pico atribuido a la presencia de las Nps de Ag se recorre y se vuelve más estrecho, aunque ningún comportamiento es detectado en forma clara como función de la cantidad de extracto adicionada.



**Figura 3. 5.** Espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos de reacción: a) 0.25, b) 2, c) 4 y d) 6 horas para una concentración de 9mM de  $\text{AgNO}_3$  variando los gramos de pirul añadidos.

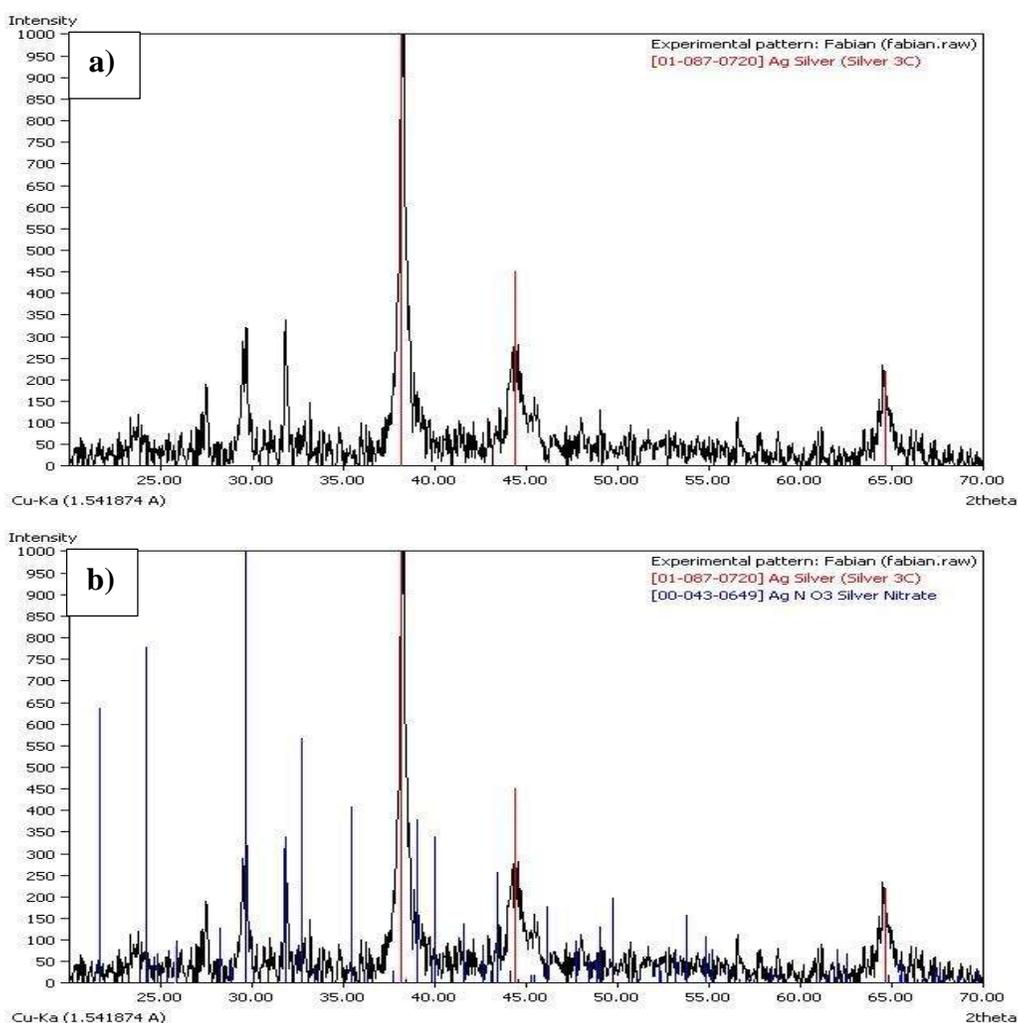
Como se ha venido mencionando en la presentación de estos experimentos en donde las tres variables manejadas fueron tiempo de reacción, variación de la cantidad de extracto para concentraciones fijas de  $\text{AgNO}_3$  utilizada y variación de la concentración de  $\text{AgNO}_3$  en la reacción se puede expresar que: en primer lugar, con respecto al tiempo de reacción se aprecia que en la medida que aumento desde las 0.25 horas hasta 6 horas la reacción en todos los

casos fue evolucionando para presentar mejores resultados dada la obtención de un pico atribuido a la presencia de Nps de Ag el cual va siendo cada vez más estrecho en rangos de longitudes de onda, en segundo lugar, no existe ninguna correlación entre la cantidad de extracto y la evolución de la reacción, aunque como se menciona previamente en la medida que la cantidad de extracto crece la reducción a Ag metálica debe acentuarse. Estos resultados azarosos tal vez se quieran atribuir a errores en la preparación de las muestras, empero, todos los resultados tienen la misma tendencia. Por último, con respecto a la cantidad agregada de  $\text{AgNO}_3$ , se puede asegurar que en la medida que se incrementó la cantidad de sal los picos de difracción son más estrechos y definidos lo que en este caso es consistente con los resultados en la literatura [52]. De cualquier forma, los presentes resultados indican que picos cercanos en longitud de onda a la característica de absorción de Nps de Ag se presentan en general, por lo que se puede deducir que el pirul actúa como un agente reductor para la obtención de nanocristales de plata.

### **3.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X.**

Las nanopartículas de Ag sintetizadas utilizando extractos de las hojas y el tallo del pirul fueron confirmadas adicionalmente mediante la técnica de difracción de rayos X, las figuras 3.6a y 3.6b, muestran en su conjunto las fases localizadas. Para realizar estos análisis dada la poca cantidad de material fabricado, fue necesario dejar secar varias muestras durante algunos días para recolectar el polvo y montarlo sobre un vidrio esmerilado. El patrón de XRD mostró diferentes picos intensos en todo el espectro de valores de  $2\theta$  que fue de  $20-70^\circ$ . El patrón típico de difracción de rayos X, reveló que la muestra contiene una estructura compuesta de dos fases. Se observaron reflexiones de Bragg correspondientes a los ángulos  $38.1^\circ$ ,  $44.3^\circ$ , y  $64.4^\circ$  que pertenecen a los planos del tipo (111), (200) y (220) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc) de plata. Además, fueron localizados picos correspondientes a la sal  $\text{AgNO}_3$ , picos que corresponden a la estructura del sólido aún sin reaccionar de acuerdo al patrón mostrado en la figura 3.6b. Estos resultados indican en primer lugar, la efectividad del pirul para la reducción de la sal de plata a nanopartículas de plata, en segundo

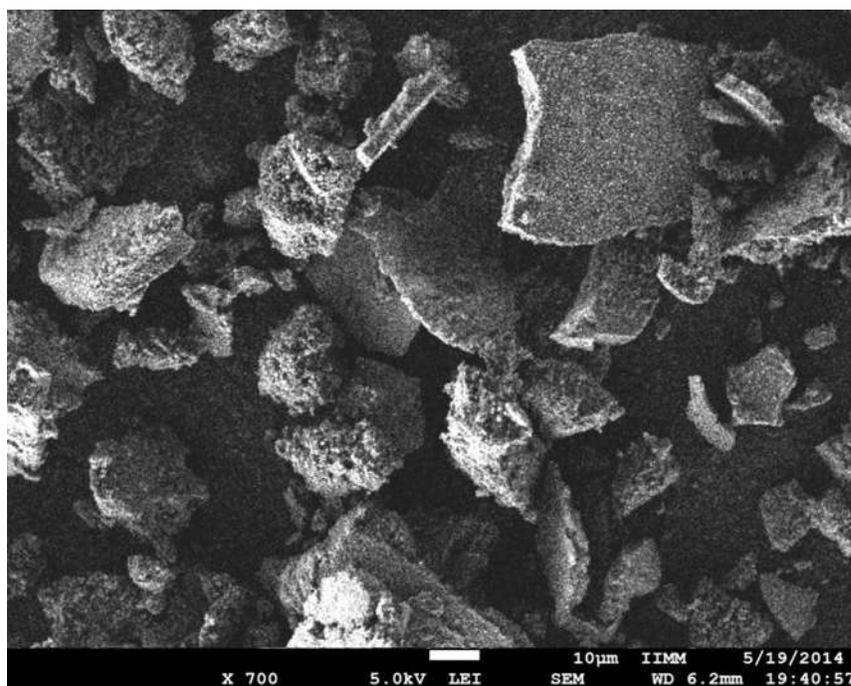
lugar, los picos de UV-vis (técnica arriba descrita) observados con algunos desplazamientos pertenecen a la presencia de Nps de Ag, la reacción como fue indicado procede hasta las 6 horas, en tercer lugar, la cantidad encontrada de nitrato de plata, por supuesto aún sin reaccionar, sugiere que las cantidades de extracto fueron insuficientes, sin embargo, en los resultados obtenidos por UV-vis, se encontró que el incremento del extracto no influye en la reducción de las nanopartículas de plata lo que es inconsistente con los resultados normales encontrados por otros investigadores, de tal forma que se requiere aquí una investigación más detallada sobre todo por debajo de las concentraciones utilizadas de extracto.



**Figura 3.6.** Patrones de difracción de rayos X en donde se muestran las fases indexadas: a) plata y b) nitrato de plata.

### 3.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

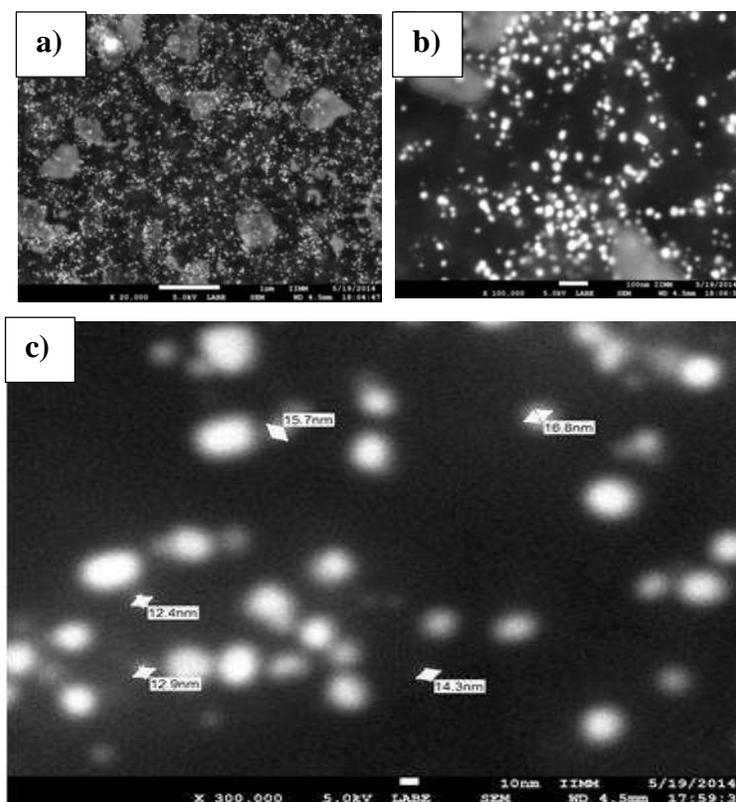
Con la finalidad de estudiar la morfología, tamaño y análisis químico de las nanopartículas obtenidas, toda vez comprobados los resultados mediante la técnica de difracción de rayos X, diferentes composiciones fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de energía dispersiva (EDS). La figura 3.7, corresponde a una imagen de barrido en donde se pueden apreciar los polvos obtenidos después de tratar las hojas y tallo del extracto.



**Figura 3.7.** Imagen de barrido en donde se muestran los polvos obtenidos del extracto de pirul a 700X.

La figura 3.8a muestra una imagen representativa obtenida por la técnica de Labe (por sus siglas en inglés electrones retrodispersados de bajo ángulo) a 20000 X de los productos obtenidos correspondientes a la muestra con 5 mM de  $\text{AgNO}_3$ . Siendo esta técnica específica de alto contraste por número atómico y alta resolución, se observan pequeños puntos brillantes correspondientes a la presencia de una alta densidad de partículas, además de unos residuos

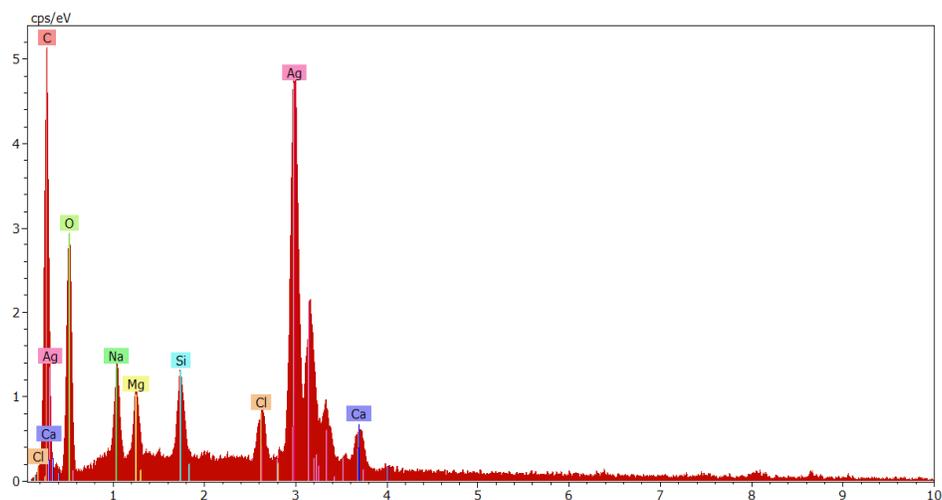
sólidos de partículas grandes presumiblemente de nitrato de plata (fig. 3.8a). La figura 3.8b, obtenida a 100,000 ampliificaciones constata la presencia de partículas esféricas con tamaños nanométricos y partículas grandes con otro contraste, por último la figura 3.8c, muestra una imagen representativa a 300,000 ampliificaciones en donde se midieron directamente algunas nanopartículas encontrándose en el rango de tamaño de 12 a 17 nm.



**Figura 3. 8.** Micrografías electrónicas de barrido mostrando las nanopartículas obtenidas para una concentración de 5mM de  $\text{AgNO}_3$  a diferentes ampliificaciones: a) 20000, b) 100 000 y c) 300 000.

Con el fin de conocer la composición química de estas entidades se realizaron análisis químicos puntuales por EDS, la figura 3.9, muestra los resultados obtenidos en donde se pueden apreciar varios elementos como consecuencia de la presencia de los residuos sólidos del extracto, así como del elemento plata que puede estar contenido tanto en las nanopartículas esféricas, como en residuos no reaccionados de  $\text{AgNO}_3$ , de acuerdo a los estudios de DRX. sin embargo, observamos aquí de la figura 3.8, la presencia clara y abundante de partículas

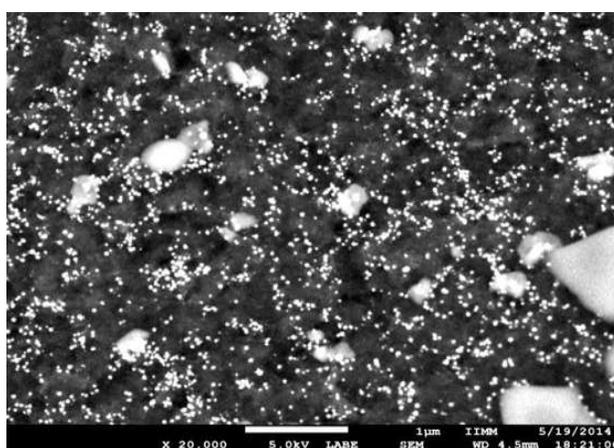
esféricas del metal reducido. Estos resultados comprueban los obtenidos mediante UV-Vis y DRX, para concluir que las hojas y tallo del pirul es una planta que puede utilizarse para la síntesis económica y efectiva de Nps de Ag.



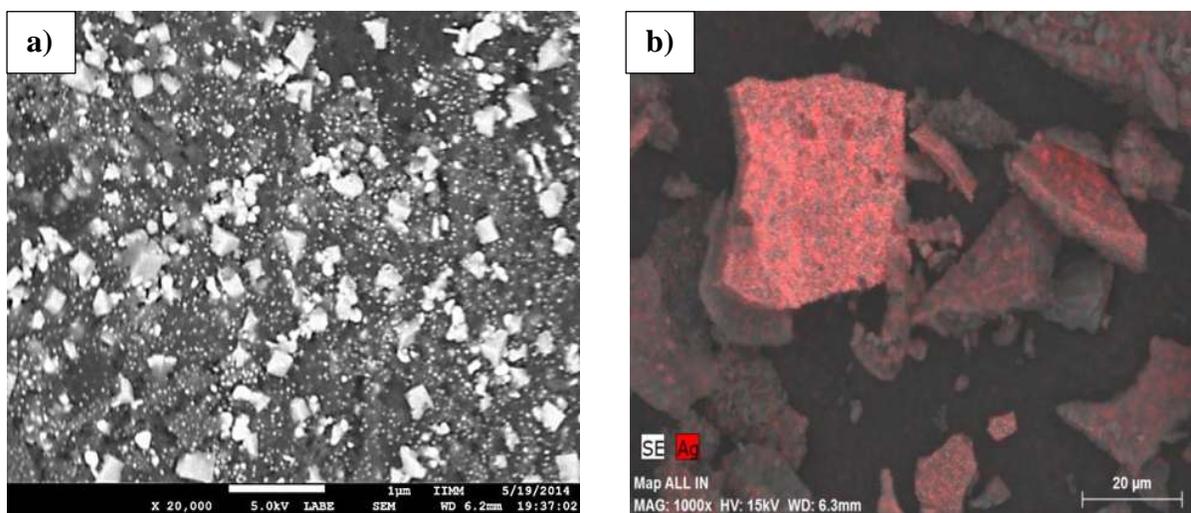
**Figura 3. 9.** Análisis químico puntual por EDS de los productos obtenidos correspondientes a la muestra con 5 mM.

Con el fin de tratar de comparar los resultados después de la observación directa de las nanopartículas de plata entre las diferentes concentraciones de nitrato de plata utilizadas, también fueron estudiadas mediante microscopía de barrido las concentraciones de 7 y 9 mM de  $\text{AgNO}_3$  empleadas durante la reacción de síntesis. La figura 3.10, muestra los resultados obtenidos de la primera de estas muestras, en donde la micrografía corresponde a una imagen representativa a 20000 X. En esta se puede observar una densidad menor de nanopartículas en comparación con la imagen de la figura 3.8a, además de los mismos residuos sólidos los cuales pueden corresponder a  $\text{AgNO}_3$ , sin reaccionar. Las partículas son esféricas y presentan un radio de tamaño parecido a las obtenidas con una concentración de 5 mM, encontrándose entre 12 y 20 nm. Estos resultados sugieren que la efectividad del pirul es mejor a medida que la relación cantidad de extracto a sal precursora es mayor, esta situación converge con los resultados obtenidos mediante UV-vis, en donde a medida que la concentración de plata fue menor la forma del pico de absorción fue mejor, indicando una presencia mayor de Nps con rangos de tamaño más estrechos.

La figura 3.11, muestra ahora los resultados obtenidos para la concentración de 9 mM de nitrato de plata empleada. En la micrografía de la figura 3.11a, registrada a 20000 X se ilustra, en comparación a las muestras anteriores, un regular cantidad de Nps las cuales aparecen junto al residuo sólido atribuido al  $\text{AgNO}_3$ . Para comprobar esto se realizaron estudios de mapeo químico presentados en la fig. 3.11b, en donde se puede observar que las partículas acirculares corresponden a nitrato de plata. Se debe recordar que en esta muestra es en donde se tiene la mayor cantidad de sal agregada con respecto a la cantidad de extracto. Estos resultados coinciden tanto con los obtenidos por DRX, como los obtenidos por UV-vis.

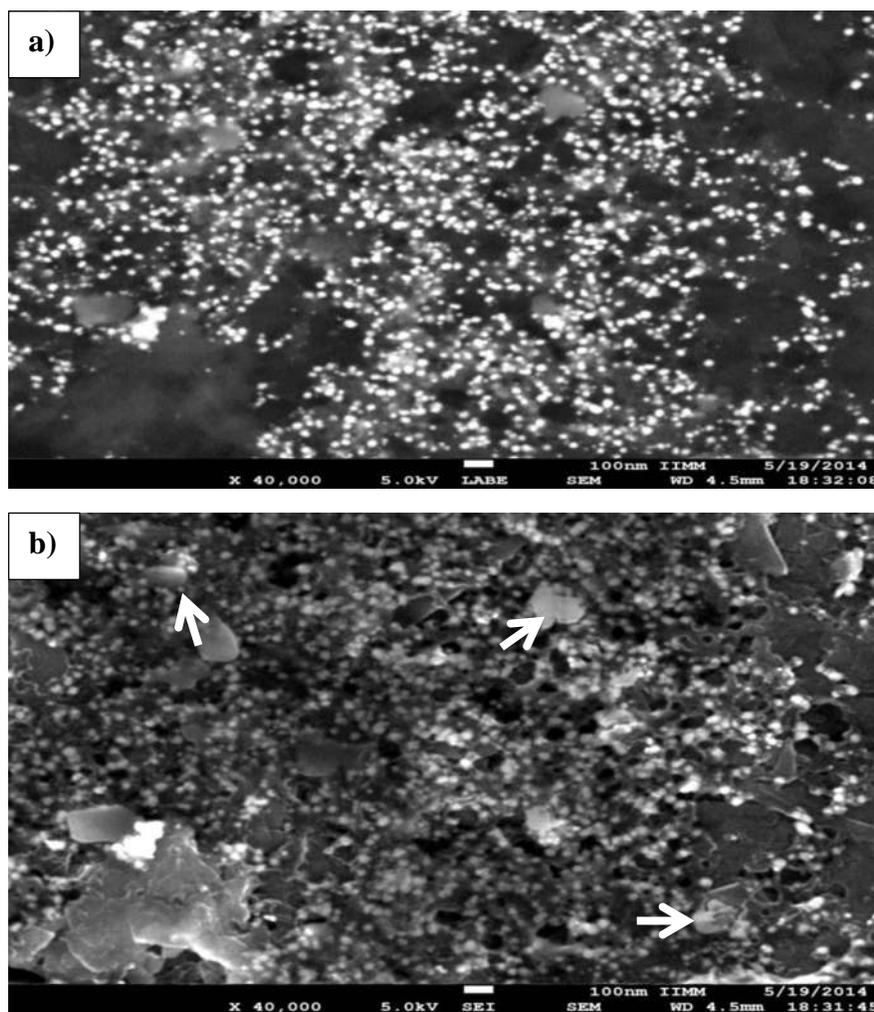


**Figura 3.10.** Micrografía electrónica de barrido a 20000 X mostrando los resultados para la reacción de 9mM de  $\text{AgNO}_3$ .



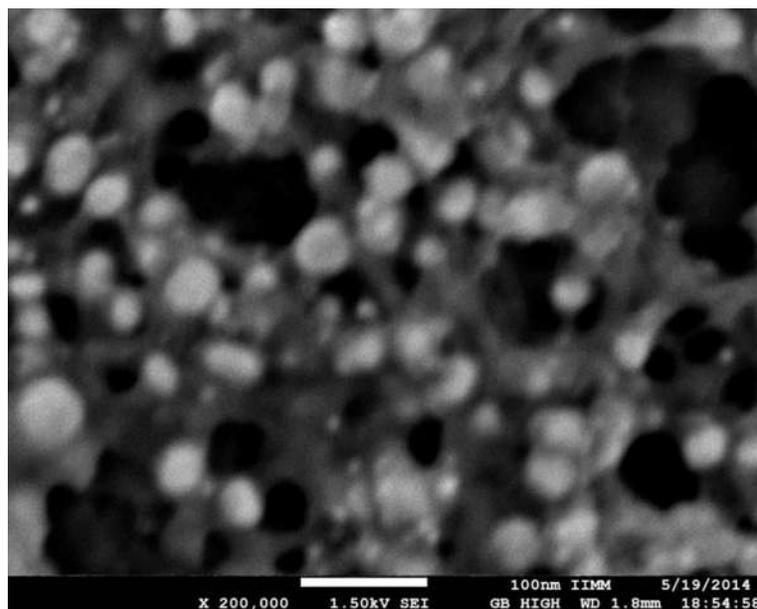
**Figura 3.11.** Resultados obtenidos para la concentración de 9 mM de nitrato de plata empleada a) 20 000X y b) mapeo químico.

La imagen de la figura 3.12a, obtenida a 40000X presenta otra zona con alta densidad de nanopartículas registradas por la técnica de Labe-MEB, la misma zona fue registrada también mediante la técnica de electrones secundarios (Sei-MEB) y se presenta en la figura 3.12b. Comparando ambas micrografías se puede señalar la presencia de los diferentes residuos participantes en la muestra después de la reacción, esto es, las nanopartículas de plata que por contraste presentan una mayor intensidad, los residuos de plata que se observan con poco contraste en Labe, dada su composición a base de plata y finalmente los residuos orgánicos cuya intensidad en Labe casi es nula sin embargo en Sei-MEB, se pueden reconocer estos residuos como hojuelas aglutinadas siendo sus tamaños de partícula los más grandes.



**Figura 3.12.** Micrografías de barrido obtenidas a 40000X de la misma zona por dos técnicas: a) Labe-MEB y b) Sei-MEB.

La figura 3.13 muestra una imagen obtenida por Sei-MEB en la que se observa que las nanopartículas presentes en esta composición tienen rangos de tamaño mayores que van desde partículas con 5 nm hasta Nps con 40 nm, siendo estos resultados consistentes con los obtenidos mediante UV-vis.



**Figura 3. 13.** Imagen obtenida por Sei-MEB mostrando nanopartículas obtenidas de diferentes tamaños.

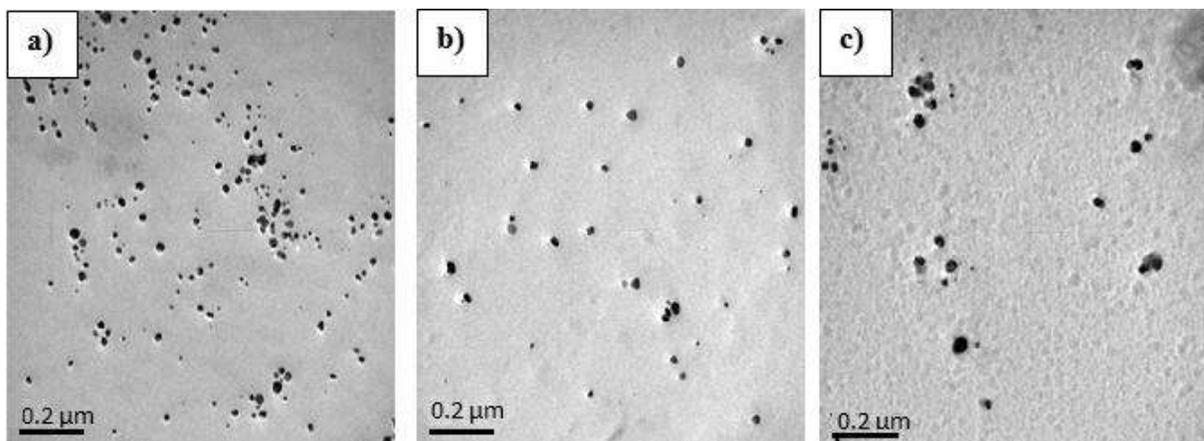
#### **3.4. RESULTADOS OBTENIDOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.**

La técnica de microscopía electrónica de transmisión fue realizada, empleando las metodologías de campo claro, EDS y alta resolución, con la finalidad de conocer de forma directa los resultados obtenidos de la reducción de  $\text{AgNO}_3$  empleando un extracto de pirul, en cuanto a la morfología, tamaño y estructura de las nanopartículas.

La figura 3.14a muestra una imagen representativa de campo claro en donde se aprecia y comprueba la presencia de nanopartículas después de la síntesis mencionada. Las partículas

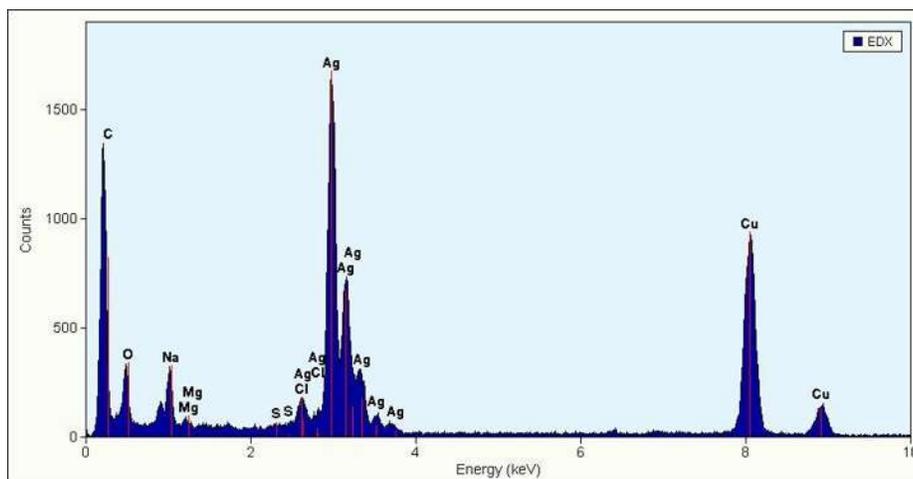
medidas directamente presentan un rango de tamaño de 5 a 40 nm, con un tamaño promedio de 18 nm tal y como es ilustrado del histograma anexo al final del capítulo figura 3.26. Estos resultados confirman directamente que el pirul es una planta que contiene sustancias que actúan como agentes reductores para la síntesis de Nps de plata metálica. De igual forma estos resultados confirman los obtenidos tanto por la técnica de UV-vis, como por microscopía de barrido.

Las figuras 3.14b y 3.14c, junto a la figura del inciso a, representan los resultados para cuando se utilizaron; 3, 5 y 7 mM de  $\text{AgNO}_3$  en la reacción de síntesis. Como puede apreciarse en la medida que la cantidad de  $\text{AgNO}_3$  se incrementa la concentración de Nps disminuye, lo que es consistente con la teoría de la síntesis química por reducción de nanopartículas obtenidas por técnicas convencionales.



**Figura 3.14.** Imágenes de campo claro en donde se muestran las nanopartículas obtenidas a diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ : a) 3, b) 5 y c) 7mM.

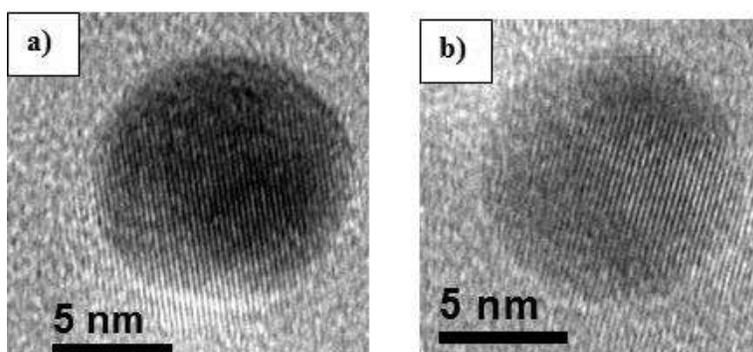
La figura 3.15, muestra un espectrograma obtenido por EDS, del análisis químico realizado a las Nps de Ag en su condición de 3 mM, en donde se aprecian los elementos Cu, proveniente del encuadrado de metal el cual soporta una película de carbón amorfo, cuyo elemento también aparece en el espectro, Cl, Mg y Na, como resultado de los elementos en la solución del extracto, O que puede estar asociado a los residuos del nitrato de plata y finalmente Ag, proveniente también de las Nps de metal.



**Figura 3.15.** Análisis químico realizado a las nanopartículas obtenidas a una concentración de 3mM de  $\text{AgNO}_3$

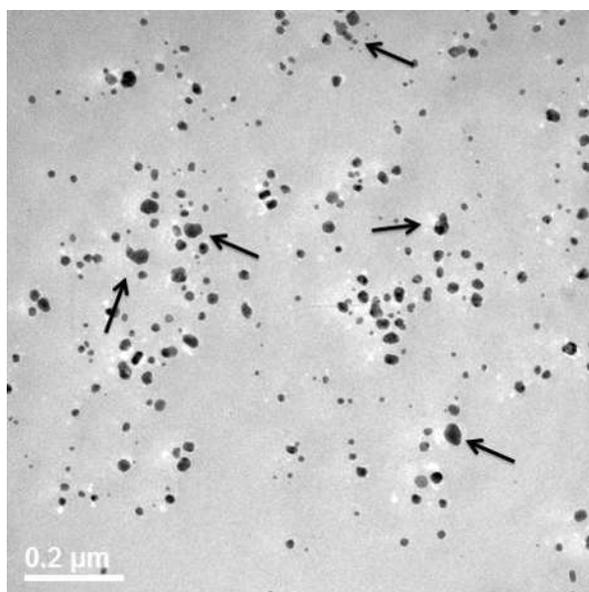
Los resultados del análisis químico demuestran que las nanopartículas de metal obtenidas por esta técnica de síntesis verde, podrán si acaso, (depende de lavados posteriores a la muestra), contener elementos que de ninguna manera son tóxicos para el ser humano y medio ambiente, lo que hace a esta técnica potencialmente útil para la fabricación de Nps de Ag las cuales puedan ser utilizadas en varias aplicaciones, tales como, antibacteriales, médicas y de la industria textil, en donde no se requiere de un control excesivo en la distribución de tamaño de las Nps.

Continuando con el análisis de las Nps obtenidas por MET, ahora se presenta en la figura 3.16 a-b dos partículas amplificadas del tipo fcc, en donde la medición entre las líneas indica una distancia interplanar de  $2.02 \text{ \AA}$ , que corresponde a los planos (200) de la estructura cristalina del tipo fcc de la plata cuya tarjeta de DRX es 01-087-0720, comprobando con esto que las partículas efectivamente se producen por reacción de reducción química mediante el extracto del pirul.



**Figura 3.16.** a-b: Nanopartículas de plata observadas por MET donde se percibe alta resolución.

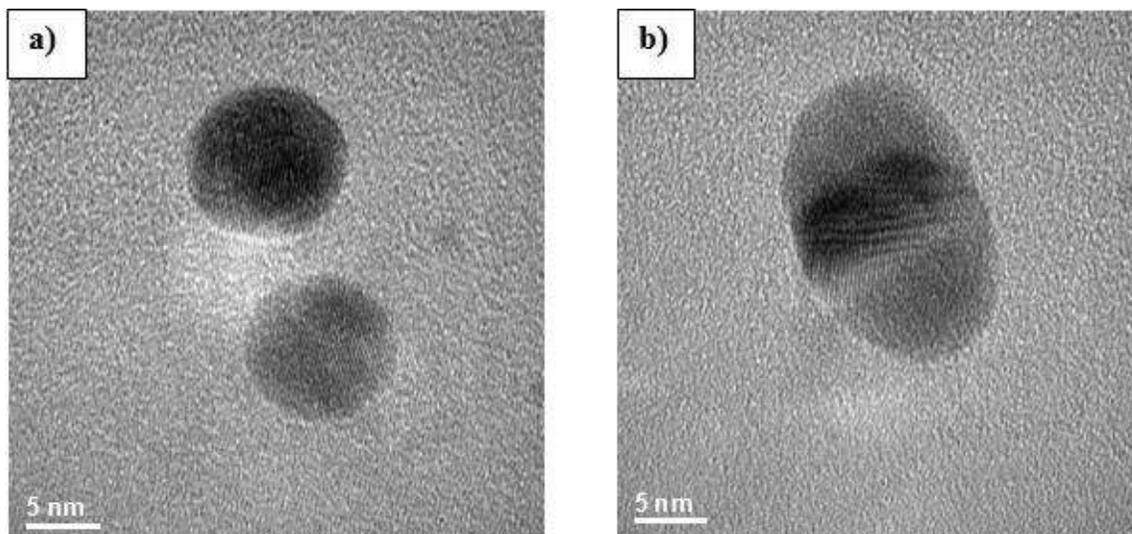
Por otro lado, la imagen de campo claro en la figura 3.17, presenta la influencia de los componentes del pirul como agentes desaglomerantes, es decir, las sustancias que permiten estabilizar la solución coloidal. Como se podrá notar indicado con las flechas existen varias regiones en donde dos o más partículas aparecen coalesciendo, es decir, la unión de dos o más para formar una mayor. Aunque en general, las partículas aparecen dispersas en las varias muestras analizadas este comportamiento fue observado, esto quiere indicarnos que las sustancias que contienen el pirul no son completamente efectivas como agentes desaglomerantes.



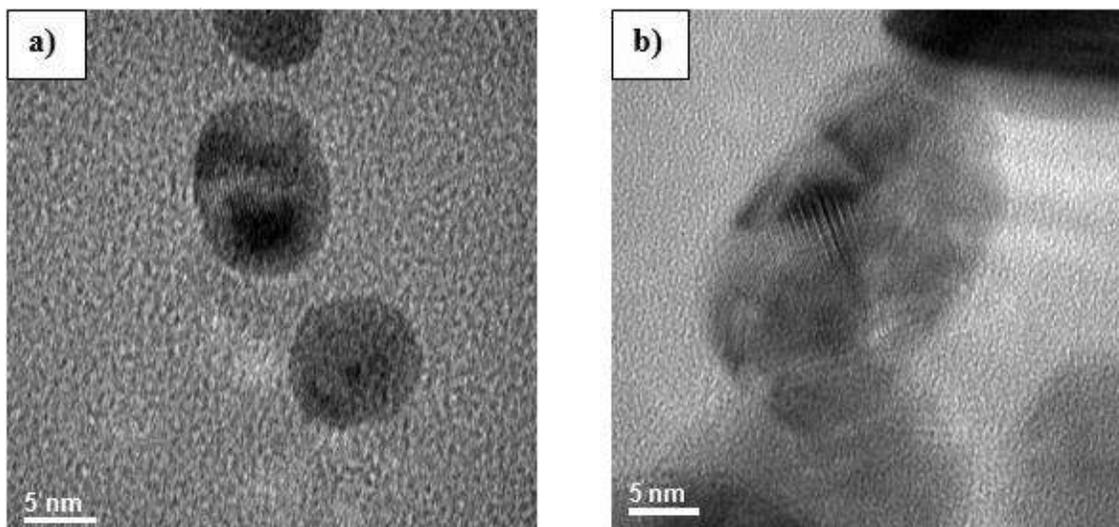
**Figura 3.17.** Imagen de campo claro mostrando nanopartículas de plata dispersas por la influencia del pirul como agente desaglomerante.

Las figuras 3.18 a y b, ilustran micrografías de campo claro de la posible coalescencia entre dos partículas de aproximadamente 8 nm. originalmente las partículas de estructura fcc, se encuentran separadas y con el envejecimiento de la solución, ambas se unirán para formar una partícula mayor. Esto también podría suceder con tres o más partículas como se ilustra en la figura 3.19 a, en donde estas nanopartículas siendo de estructura fcc, podrían en un momento agruparse con el envejecimiento para formar la partícula alargada en la figura 3.19 b que es

llamada policristalina y que presenta sus planos en diferentes orientaciones siendo ella muy probablemente el resultado de la coalescencia entre varias partículas.

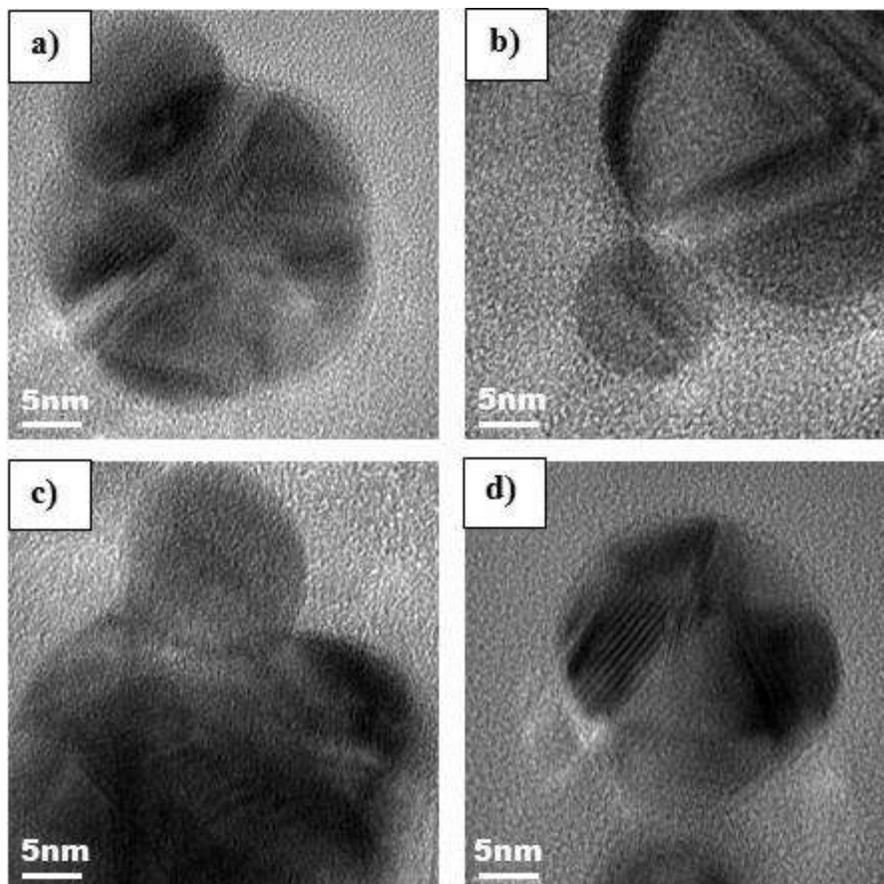


**Figura 3. 18.** Micrografías de campo claro de la posible coalescencia de nanopartículas correspondiente a una concentración de 3mM: a) nanopartículas separadas y b) coalescencia de Nps.



**Figura 3. 19** micrografías de campo claro de la posible coalescencia de 3 nanopartículas: a) nanopartículas individuales y b) nanopartícula policristalina alargada

Este fenómeno también puede estar sucediendo entre partículas relativamente grandes (figura 3.20 a-d), las cuales son del tipo mtp (por sus siglas en inglés multiply twinnig particles), cuyos tamaños oscilan entre los 25 y 30 nm, en donde otra partícula de 6, 7 u 8 nm se adjunta para coalescer y formar la partícula más grande como se aprecia de la figura 18d, en donde encontramos una partícula maclada con sobresalientes hacia la flecha, señal de coalescencia entre partículas.

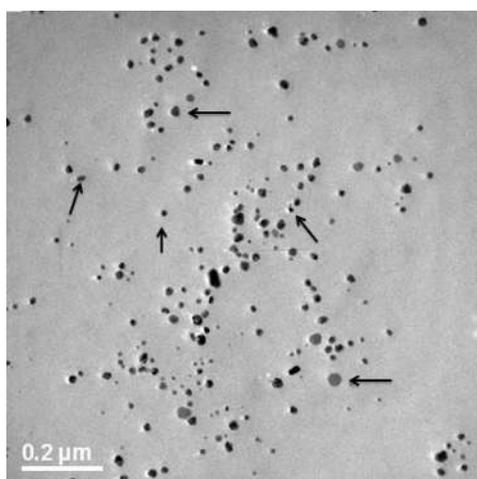


**Figura 3.20.** Micrografías de campo claro mostrando nanopartículas de múltiple maclado obtenidas a diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ : a-b 7mM y c-d 9mM.

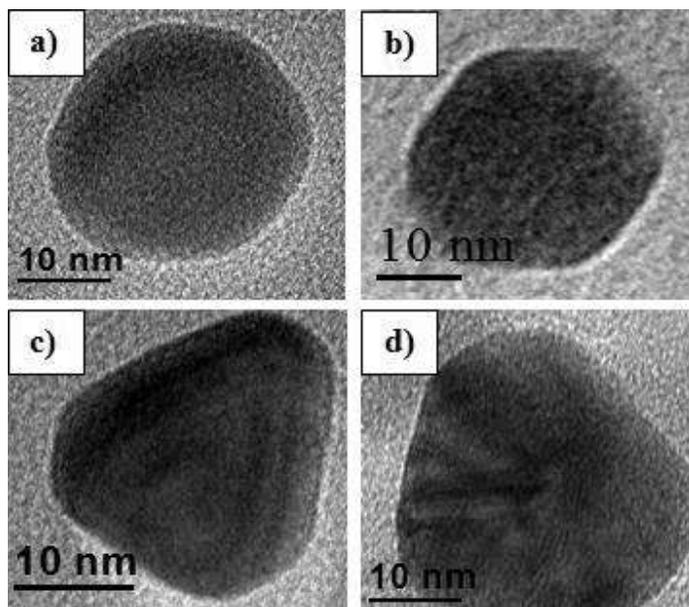
Ha sido reportado en el pasado [53] que la forma de las nanopartículas sintetizadas por técnicas ecológicas, también puede variar dependiendo del extracto, es decir, las sustancias contenidas en el extracto también sirven de modificadores de forma. Este fenómeno puede parcialmente ser observado en la figura 3.21, en la cual señalando mediante flechas se puede apreciar además de las nanopartículas semiesféricas, algunas partículas con formas triangulares y hexagonales, cuya característica principal es que aparecen hacia mayores

tamaños y presumiblemente estas partículas ya son el resultado del acomodo de los átomos después de la coalescencia de partículas pequeñas.

Realizando algunos acercamientos a las nanopartículas podemos constatar las diferentes formas encontradas, por ejemplo en la figura 3.22a observamos nanopartículas semiesféricas, en la figura 3.22b una partícula hexagonal y en las figuras 3.22c-d, formas triangulares o tetrahedrales.

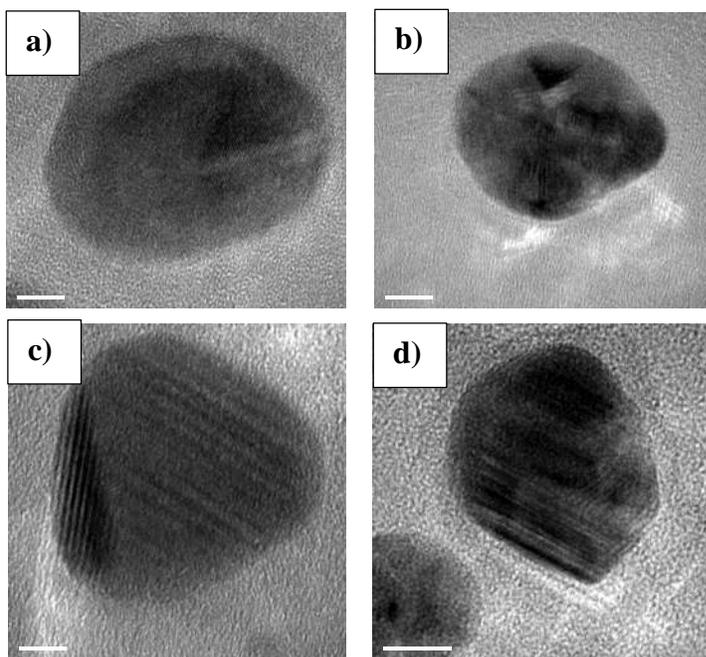


**Figura 3. 21.** Imagen de MET donde se aprecia una variedad de formas de las nanopartículas



**Figura 3. 22.** Imágenes de transmisión mostrando diferentes formas de las nanopartículas obtenida por síntesis ecológica a) nanopartículas semiesféricas, b) partícula hexagonal, c) y d) formas triangulares.

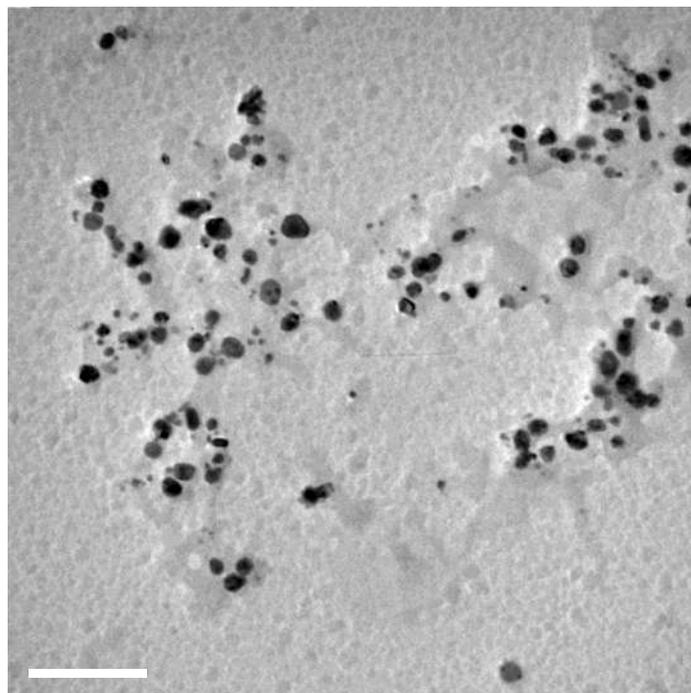
En este trabajo también fueron encontradas diferentes estructuras de las nanopartículas, por lo que la figura 3.23 a-d muestra un resumen de todas las estructuras encontradas. Además de la estructura fcc mostrada ya en algunas figuras anteriores, encontramos en la figura 3.23a, partículas de simple macla o por sus siglas en inglés STP (single twinning particle), en la figura 3.23b, de maclado preferencial quinario MTP piramidal (multiple twinned particle) y en las figuras 3.23c y d, de maclado múltiple lineal. De acuerdo a las observaciones la estructura fcc de las nanopartículas fue encontrada tanto en partículas pequeñas como en grandes, las partículas MTP quinarias fueron encontradas en pequeñas proporciones mientras que la mayor proporción de las nanopartículas grandes son del tipo de múltiple macla ya sea lineal o desorientadas, por lo que indica que la coalescencia de las nanopartículas es un fenómeno muy ordinario lo que implica que el pirul no es un buen agente desaglomerante.



**Figura 3. 23.** Clasificación de las nanopartículas obtenidas por sus maclas: a) partículas STP, b) MTP piramidal, c) y d) maclado múltiple lineal.

En alguna otra zona de la pieza (figura 3.24) observamos la falta de dispersión de las nanopartículas que se va a dar a medida que la demanda de recubrimiento de la superficie crezca lo que puede ser con partículas relativamente pequeñas, justamente en esta imagen

observamos partículas de tamaño intermedio en donde se aprecia que antes de dispersión hay aglomeración.

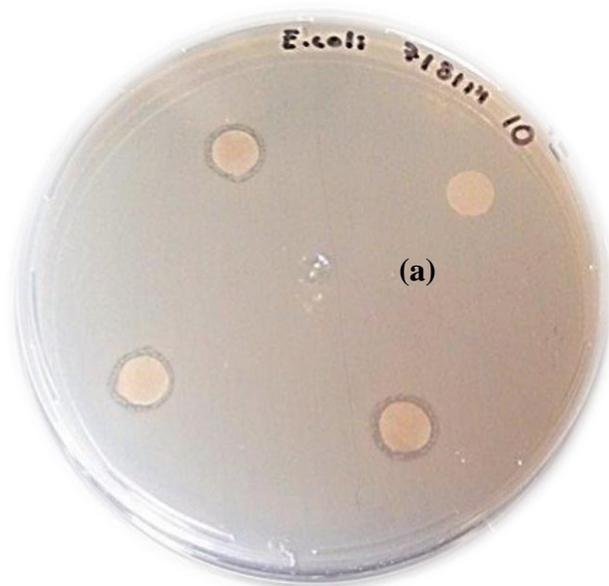


**Figura 3.24.** Imagen de campo claro mostrando aglomeración de las nanopartículas.

### **3.5. RESULTADOS OBTENIDOS EN EVALUACIÓN ANTIBACTERIAL DE NPs EN *ESCHERICHIA COLI*.**

Con el objeto de darles una aplicación a las NPs de Ag se evaluó su comportamiento antibacterial contra *E.Coli*, la cual es una bacteria muy común. La figura 3.25, muestra los resultados obtenidos utilizando el método de disco descrito en la parte experimental. Las pruebas fueron realizadas por triplicado y un disco (a) muestra solo el extracto sin Nps. También se presentan los datos en la tabla 3.1, que corresponde a los controles positivo (cefatoxima 35.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), negativo (agua) y nitrato de plata, (-) significa que no dio ninguna inhibición.

Como se aprecia en cada uno de los discos existe inhibición en el crecimiento de las bacterias, lo cual indica que las Nps de Ag presentan propiedades antibacteriales ante *E. Coli*. El promedio del halo de inhibición de las nanopartículas fue de 9.66 mm que en comparación con el antibiótico es de aproximadamente 3 veces menor de acuerdo a la tabla 3.1. Como se observa de la tabla también el nitrato de plata inhibe, pero esto se debe a la diferencia de concentraciones empleadas durante la prueba. En cuanto a esto se deben tomar en cuenta que la concentración de las Nps de Ag no fue la misma del antibiótico, esto se debió a las limitaciones de tiempo y restricciones del laboratorio. Aunque el volumen de trabajo utilizado en todas las muestras para la prueba fue de 6 microlitros, en el caso del antibiótico, nitrato en solución fueron utilizados a una concentración de 5 mM. La concentración del  $\text{AgNO}_3$  utilizada en la preparación de las Nps fue igual (5 mM), sin embargo, ésta fue diluida aún más cuando se mezcló con el extracto para la reacción y síntesis de las Nps, en la proporción de 1 a 2, además, de que la muestra ensayada fue con una dilución de 2 a 1. De cualquier manera se comprobó que las Nps de Ag son efectivas y podrían en alguna instancia sustituir al antibiótico, sobre todo en aquellos casos donde la cantidad de plata se use por debajo de la concentración tóxica, por ejemplo, para aplicaciones dentro del ser humano. Estos resultados también sugieren recurrir a nuevas pruebas con concentraciones bien establecidas y que se puedan comparar directamente.



**Figura 3. 25.** Pruebas de inhibición realizadas por triplicado con las AgNps en contra de la bacteria *E.Coli*, el disco en (a) correspondiente al extracto no presenta halo de inhibición.

**Tabla 3. 1.** Valores en mm de las distancias de inhibición de las AgNps y controles.

<b>MUESTRA</b>	<b>DISTANCIA DE INHIBICIÓN mm.</b>
Extracto	-
Agua	-
Antibiótico (Cefatoxima)	33.25
AgNO <sub>3</sub>	10.75
AgNps Disco # 1	9.75
AgNps Disco # 2	10
AgNps Disco # 3	9.25

### **3.6. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.**

En base a los diferentes resultados de caracterización antes mencionados, las nanopartículas de Ag sintetizadas ecológicamente a partir de AgNO<sub>3</sub>, como sal precursora y extracto de pirul como agente reductor presentaron varias características favorables en lo que concierne a su tamaño, forma, dispersión.

La cantidad de nanopartículas presentes en las soluciones coloidales fue abundante, esto es un indicador de que el pirul como agente reductor tiene una buena eficiencia. El tamaño promedio de partícula varió, desde 18 a 22 nm para los diferentes experimentos realizados, este resultado comparado con los reportados en la literatura [54], se encuentra en un puesto prometedor ya que se han reportado tamaños de partículas incluso de hasta 100 nm, por otro lado la dispersión de las mismas se encuentra un poco comprometida, debido a que algunas regiones mostradas en imágenes de microscopía de transmisión, se observó una aglomeración de las nanopartículas, lo cual puede ser un fenómeno importante en este método de síntesis, ya que esta aglomeración pudo conllevar a una coalescencia de partículas pequeñas en unas de mayor tamaño, esto nos lleva a cuestionar la eficiencia del pirul como agente estabilizante, no obstante estos resultados en la síntesis ecológica de nanopartículas de plata, son alentadores ya

que las diferentes plantas y métodos reportados no han logrado obtener, partículas dispersas en su totalidad [55].

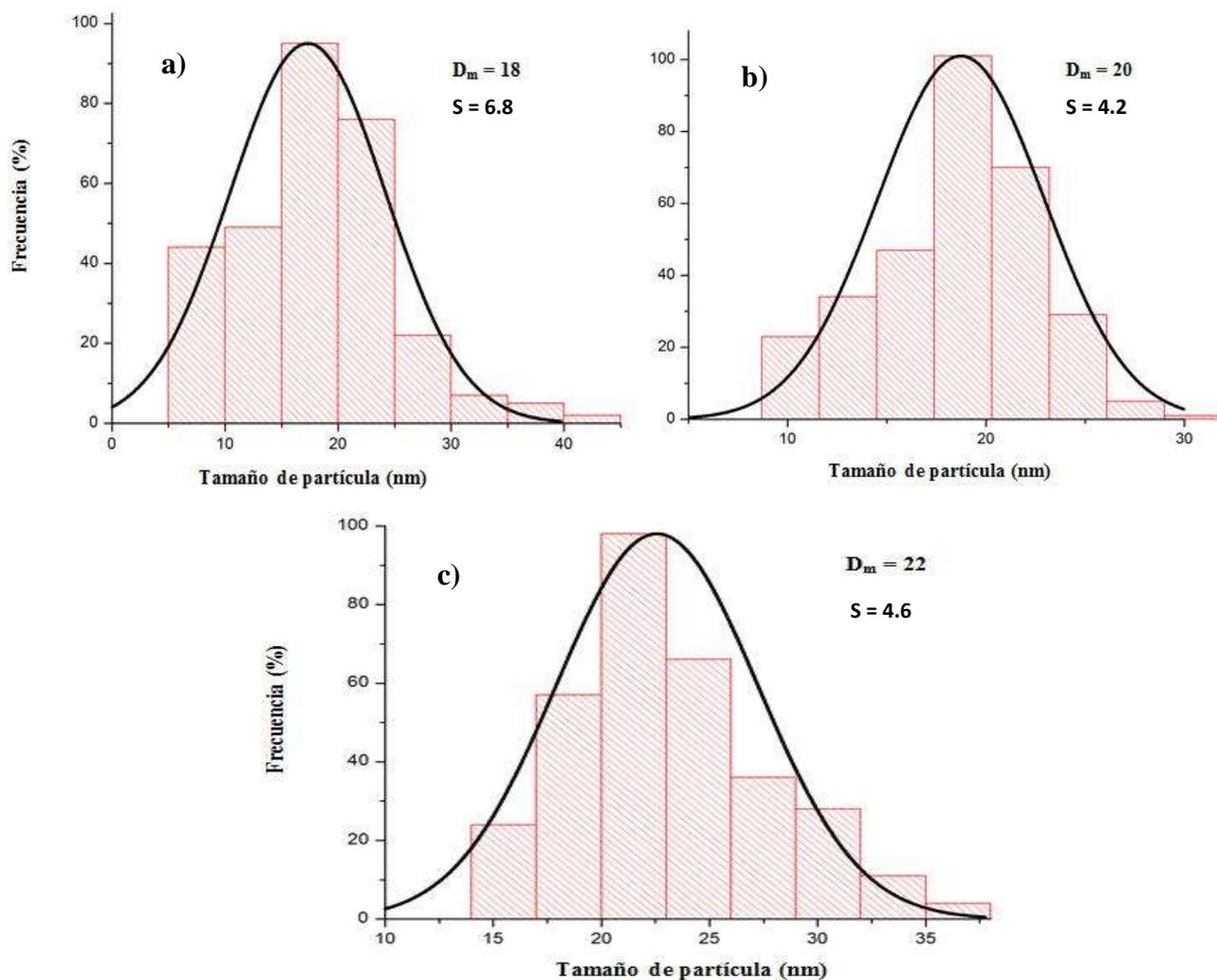
Con respecto a la forma de las nanopartículas, se puede destacar que en su mayoría la tendencia fue cuasiesférica, pero también se presentaron formas triangulares y hexagonales en menor cantidad, esto puede ser atribuido a varios factores, entre los que se encuentran: pH, temperatura, concentración de extracto y contenido del extracto [56-61]. Para este caso en particular, las variables que pudieron jugar un papel importante en la forma final de las partículas, fueron la variación y las propiedades del pirul, por ende basados en los resultados obtenidos, podemos decir que a mayor relación de extracto a sal precursora, la forma de las partículas metálicas de Ag será más uniforme. Debido a los muchos factores y variables que influyen en la síntesis de nanopartículas se propone realizar una investigación posterior para la optimización del proceso de síntesis ecológica utilizando el pirul como agente reductor y estabilizante.

En la figura 3.26 a-b-c, se presentan los histogramas de distribución del tamaño de partícula, correspondientes a los experimentos de biorreducción de nanopartículas realizados para diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  (3, 5 y 7 mM), se puede observar claramente en las imágenes abc la naturaleza polidispersa de las nanopartículas de plata.

Con respecto a la figura 3.26a que contiene menor cantidad de nitrato de plata, presenta un rango amplio de tamaño de nanopartícula, el cual oscila entre 5 a 40 nm, tal distribución de tamaño es la más amplia obtenida en los experimentos antes mencionados. Del mismo histograma se calculó el tamaño promedio de partícula, el cual corresponde a 18 nm con una frecuencia mayor de tamaños en el rango de 15 a 25 nm.

La figura 3.26b corresponde al histograma obtenido para la biorreducción, llevada a cabo con una concentración de 5mM de  $\text{AgNO}_3$ , presentando un cambio en el rango de distribución de tamaño el cual se encuentra de 10 a 30 nm, con una alta frecuencia de tamaños de nanopartículas de 18.5 nm, de tal manera que la distribución se ve más acotada, que en el experimento anterior. Con respecto al tamaño promedio de partícula, se obtuvo un resultado

de 20 nm, lo cual indica un aumento de 2 nm conforme a la reducción correspondiente a 3mM de  $\text{AgNO}_3$ .



**Figura 3.26.** Histogramas de distribución de tamaño de partícula correspondientes a las nanopartículas obtenidas por biorreducción a diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  = a) 3, b) 5 y c) 7 mM.

En la figura 3.26c se observa el histograma correspondiente a la reducción de nanopartículas empleando 7mM de  $\text{AgNO}_3$ , se observa una distribución de tamaño de partícula de 15 a 35 nm, en comparación con la figura 3.25b el rango de tamaño es proporcional pero el tamaño de

partícula se ve incrementado, el diámetro promedio de partícula corresponde a 22 nm el cual es 2 nm más grande que en el histograma anterior.

Al comparar los resultados obtenidos correspondientes al tamaño de partícula con los reportados en literatura [62, 63], podemos decir que el rango de tamaños obtenidos por métodos de síntesis ecológica, es relativamente amplio, se debe mencionar que los tamaños promedios y el rango de distribución mostrados en este trabajo, son similares e incluso un poco más bajos a los observados en la literatura.

Podemos decir en base a los histogramas que conforme se incrementa la cantidad de nitrato de plata el rango de distribución de partículas disminuye, pero su tamaño promedio aumenta, lo cual indica un aumento proporcional en el tamaño promedio con respecto a la concentración de sal precursora, esto se puede deber a que al incrementar cantidad de  $\text{AgNO}_3$ , la velocidad de agregación de los átomos a las partículas ya existentes, se incrementa, lo cual indica que las nanopartículas pueden formar una partícula de mayor tamaño.

## CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

Después de los estudios del presente trabajo analizados mediante UV-vis, MEB, DRX y MET, podemos concluir lo siguiente:

Nanopartículas de plata pueden ser reducidas a partir del precursor  $\text{AgNO}_3$  y extracto de la hoja y tallo del pirul, empleando un tiempo de reacción de aproximadamente 6 horas.

Los tamaños de las nanopartículas obtenidas oscilan entre 8 y 30 nm, siendo mejor el tamaño promedio a medida que la cantidad del extracto fue mayor.

Los resultados indicaron que las sustancias del pirul no son muy adecuadas como agentes estabilizantes de la solución coloidal, puesto que domina la coalescencia entre las partículas.

Fue comprobada la propiedad antibacterial de las Nps de Ag, contra la bacteria de E. Coli, en donde al igual que el antibiótico y la sal precursora, inhiben el crecimiento de las bacterias.

## REFERENCIAS.

- [1]. G Geoprincy, BN VIDHYA SRRI, U Poonguzhali, N NAGENDRA GANDHI y S Renganathan. A REVIEW ON GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES. *Asian Journal of Pharmaceutical & Clinical Research*,2013.
- [2]. Jerzy Rzedowski. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Ciencias*,006), 1991.
- [3]. Anal K. Jha, K. Prasad, Kamlesh Prasad y A. R. Kulkarni. Plant system: Nature's nanofactory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,73(2), 219-223. 2009.
- [4]. Victor Sanchez-Mendieta y Alfredo Rafael Vilchis-Nestor. Green synthesis of noble metal (Au, Ag, Pt) nanoparticles, assisted by plant-extracts. *Noble Metals, INTECH*,391-408. 2012.
- [5]. Qilin Li, Shaily Mahendra, Delina Y. Lyon, Lena Brunet, Michael V. Liga, Dong Li y Pedro J. J. Alvarez. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *water research*,42(18), 4591-4602. 2008.
- [6]. Balaprasad Ankamwar, Chinmay Damle, Absar Ahmad y Murali Sastry. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Embllica officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution. *Journal of nanoscience and nanotechnology*,5(10), 1665-1671. 2005.
- [7]. Chintamani Nagesa Ramachandra Rao, Achim Müller y Anthony K Cheetham. The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications. 2006.
- [8]. Vincenzo Turco Liveri. Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems. 2006.
- [9]. Yury Gogotsi. Nanomaterials handbook. 2006.
- [10]. NGÔ, Christian; VAN DE VOORDE, Marcel H. Nanomaterials: Doing More with Less. En *Nanotechnology in a Nutshell*. Atlantis Press, p. 55-70. 2014.
- [11]. Miguel Monge. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *An. Quím*,105(1), 33F41. 2009.
- [12]. MARIA GUADALUPE IZAGUIRRE LOPEZ. *Obtención de Nanopartículas de Ag, Mediante dos Diferentes Métodos Químicos*. 2012.
- [13]. X Chen y HJ Schluesener. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology letters*,176(1), 1-12. 2008.

- [14]. A Ávalos, AI Haza y P Morales. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*,7(2), 1-23. 2013.
- [15]. Kenneth J Klabunde. *Nanoscale Materials in Chemistry*. 2004.
- [16]. S Kittler, C Greulich, J Diendorf, M Koller y M Epple. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials*,22(16), 4548-4554. 2010.
- [17]. Yugang Sun y Younan Xia. Gold and silver nanoparticles: a class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *Analyst*,128(6), 686-691. 2003.
- [18]. W. Rizwan, Young-Soon, K., Amrita, M., Soon-Il, Y., Hyung-Shik, Sh. Formation of ZnO-micro flowers prepared via solution process and their antibacterial activity. *Journal of Nanoscale Research Letters*,5(1675-1681). 2010.
- [19]. Pavel Dibrov, Judith Dzioba, Khoosheh K Gosink y Claudia C Häse. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,46(8), 2668-2670. 2002.
- [20]. Ivan Sondi y Branka Salopek-Sondi. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*,275(1), 177-182. 2004.
- [21]. Shelly Sinha, Ieshita Pan, Pompee Chanda y Sukanta K Sen. Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. *J Appl Biosci*,19(1113-1130). 2009.
- [22]. Humberto H Lara, Nilda V Ayala-Nuñez, Liliana Ixtapan-Turrent y Cristina Rodriguez-Padilla. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J nanobiotechnology*,8(1), 1-8. 2010.
- [23]. Amarendra Dhar Dwivedi y Krishna Gopal. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,369(1-3), 27-33. 2010.
- [24]. Ibrahim M El-Sherbiny, Ehab Salih y Fikry M Reicha. Green synthesis of densely dispersed and stable silver nanoparticles using myrrh extract and evaluation of their antibacterial activity. *Journal of Nanostructure in Chemistry*,3(1), 1-7. 2013.

- [25]. D Vishnudas, Sudhindra B Sant, A Annamalai y Bhaskar Mitra. Green-synthesis and characterization of Silver Nanoparticles by aqueous Leaf extracts of *Cardiospermum helicacabum* leaves. *Drug Invention Today*,4(2), 2012.
- [26]. Gregory Von White, Petra Kerscher, Ryan M Brown, Jacob D Morella, William McAllister, Delphine Dean y Christopher L Kitchens. Green synthesis of robust, biocompatible silver nanoparticles using garlic extract. *Journal of Nanomaterials*,2012(55). 2012.
- [27]. Majid Darroudi, Mansor Bin Ahmad, Abdul Halim Abdullah, Nor Azowa Ibrahim y Kamyar Shameli. Effect of accelerator in green synthesis of silver nanoparticles. *International journal of molecular sciences*,11(10), 3898-3905. 2010.
- [28]. JR Heath. Size-dependent surface-plasmon resonances of bare silver particles. *Physical Review B*,40(14), 9982. 1989.
- [29]. Craig F Bohren y Donald R Huffman. Absorption and scattering of light by small particles. 2008.
- [30]. M Vijayakumar, K Priya, FT Nancy, A Noorlidah y ABA Ahmed. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products*,41(235-240). 2013.
- [31]. Mohsen Zargar, Azizah Abdul Hamid, Fatima Abu Bakar, Mariana Nor Shamsudin, Kamyar Shameli, Fatemeh Jahanshiri y Farah Farahani. Green Synthesis and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Using *Vitex Negundo L.* *Molecules*,16(8), 6667-6676. 2011.
- [32]. Babak Sadeghi, Farshid S. Garmaroudi, M. Hashemi, H. R. Nezhad, A. Nasrollahi, Sima Ardalan y Sahar Ardalan. Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. *Advanced Powder Technology*,23(1), 22-26. 2012.
- [33]. PeiPei Gan y SamFongYau Li. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*,11(2), 169-206. 2012.
- [34]. Yao Zhou, Wenshuang Lin, Jiale Huang, Wenta Wang, Yixian Gao, Liqin Lin, Qingbiao Li, Ling Lin y Mingming Du. Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Foliar Broths: Roles of Biocompounds and Other Attributes of the Extracts. *Nanoscale Research Letters*,5(8), 1351 - 1359. 2010.

- [35]. K. Jagajjanani Rao y Santanu Paria. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous Aegle marmelos leaf extract. *Materials Research Bulletin*,48(2), 628-634. 2013.
- [36]. Song JY, Jang HK y Kim BS. Biological synthesis of gold nanoparticles using magnolia kobus and diopyros kaki leaf extracts. *Process Biochem*,44(10), 1133-1138. 2009.
- [37]. Panigrahi S, Kundu S, Ghosh S, Nath S y Pal T. General method of synthesis for metal nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*,6(4), 411-414. 2004.
- [38]. Lukman AI, Gong B, Marjo CE, Roessner U y Harris AT. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using Medicago sativa seed exudates. *Journal of Colloid and Interface Science*,353(2), 433-444. 2011.
- [39]. J. Das, M. Paul Das y P. Velusamy. Sesbania grandiflora leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,104(0), 265-270. 2013.
- [40]. L. Lin, W. Wang, J. Huang, Q. Li , D. Sun, X. Yang, H. Wang, N. He y Y. Wang. Nature Factory of Silver Nanowires: Plant Mediated Synthesis using Broth of Cassia Fiatula Leaf. *Chemical Engineering Journal*,162(852-858). 2010.
- [41]. M. R. Bindhu y M. Umadevi. Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Hibiscus cannabinus leaf extract and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,101(0), 184-190. 2013.
- [42]. Guowu Zhan, Jiale Huang, Liqin Lin, Wenshuang Lin, Kamana Emmanuel y Qingbiao Li. Synthesis of gold nanoparticles by Cacumen Platycladi leaf extract and its simulated solution: toward the plant-mediated biosynthetic mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*,13(10), 4957-4968. 2011.
- [43]. Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM y Mukherjee A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*,82(1), 152-159. 2011.
- [44]. Mervat F. Zayed, Wael H. Eisa y A. A. Shabaka. Malva parviflora extract assisted green synthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,98(0), 423-428. 2012.
- [45]. Shukla VK, Singh RP y Pandey AC. Black pepper assisted biomimetic synthesis of silver nanoparticles. *J Alloy Compd*,507(1), 13-16. 2010.

- [46]. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Pirul&id=7925>. 2014.
- [47]. P Logeswari, S Silambarasan y J Abraham. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica*,20(3), 1049-1054. 2013.
- [48]. Rodrigo Alonso Esparza Muñoz. *Estudio de Materiales Nanoestructurados para su Aplicación en una Celda de Combustible del tipo PEM*. 2007.
- [49]. MR Bindhu y M Umadevi. Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Hibiscus cannabinus leaf extract and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,101(184-190). 2013.
- [50]. Amit Kumar Mittal, Yusuf Chisti y Uttam Chand Banerjee. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*,31(2), 346-356. 2013.
- [51]. Pei Pei Gan y Sam Fong Yau Li. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*,11(2), 169-206. 2012.
- [52]. Aniket Gade, Swapnil Gaikwad, Nelson Duran y Mahendra Rai. Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata*. *Micron*,59(52-59). 2014.
- [53]. Virender K Sharma, Ria A Yngard y Yekaterina Lin. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*,145(1), 83-96. 2009.
- [54]. Elham Abbasi, Morteza Milani, Sedigheh Fekri Aval, Mohammad Kouhi, Abolfazl Akbarzadeh, Hamid Tayefi Nasrabadi, Parisa Nikasa, San Woo Joo, Younes Hanifepour y Kazem Nejati-Koshki. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*,0), 1-8. 2014.
- [55]. J Das, M Paul Das y P Velusamy. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,104(265-270). 2013.
- [56]. Liqin Lin, Wenta Wang, Jiale Huang, Qingbiao Li, Daohua Sun, Xin Yang, Huixuan Wang, Ning He y Yuanpeng Wang. Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. *Chemical Engineering Journal*,162(2), 852-858. 2010.

- [57]. Audra I Lukman, Bin Gong, Christopher E Marjo, Ute Roessner y Andrew T Harris. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of colloid and interface science*, 353(2), 433-444. 2011.
- [58]. TC Prathna, N Chandrasekaran, Ashok M Raichur y Amitava Mukherjee. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 152-159. 2011.
- [59]. Muthuswamy Sathishkumar, Krishnamurthy Sneha y Yeoung-Sang Yun. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource technology*, 101(20), 7958-7965. 2010.
- [60]. Vineet K Shukla, Ravindra P Singh y Avinash C Pandey. Black pepper assisted biomimetic synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 507(1), L13-L16. 2010.
- [61]. Mervat F Zayed, Wael H Eisa y AA Shabaka. Malva parviflora extract assisted green synthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98(423-428). 2012.
- [62]. N Jayachandra Reddy, D Nagoor Vali, M Rani y S Sudha Rani. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. *Materials Science and Engineering: C*, 34(115-122). 2014.
- [63]. N Vigneshwaran, RP Nachane, RH Balasubramanya y PV Varadarajan. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate research*, 341(12), 2012-2018. 2006.