

Síntesis de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de hojas de cacao fino de aroma *Theobroma cacao linneu* (Malvaceae): caracterización y determinación de la actividad antioxidante mediante técnicas electroquímicas

Synthesis of silver nanoparticles using the aqueous extract of fine aroma cocoa leaves *Theobroma cacao linneu* (Malvaceae): characterization and determination of antioxidant activity by electrochemical techniques

Patricio Herrera Marín¹, Lenys Fernández ¹

¹ Escuela de Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito 17-01-2184, Ecuador

Palabras claves: Biorreducción, Capacidad antioxidante, Nanopartículas de plata, Técnicas Electroquímicas

Keywords: Antioxidant capacity, Bio reduction, Electrochemical Techniques, Silver nanoparticles,

RESUMEN

En este estudio se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs, por sus siglas en inglés), mediante biorreducción utilizando extracto acuoso de hojas de *Theobroma cacao linneu* (HThCL) y la evaluación de la actividad y/o capacidad antioxidante, del extracto y la suspensión coloidal AgNPs- HThCL por técnicas electroquímicas. Las hojas de HThCL utilizadas son productos de desechos de la cosecha de cacao, para las cuales se ha encontrado la aplicación descrita en esta investigación. Los análisis electroquímicos se llevaron a cabo mediante voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV) y se contrastaron con análisis espectrofotométricos tradicionales utilizando los métodos DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) y Folin Ciocalteu; encontrando que las técnicas electroquímicas son efectivas para evaluar poder antioxidante por su rapidez y operatividad. Las AgNPs sintetizadas se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis, difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y voltamperometría cíclica (CV). El tamaño promedio de las AgNPs obtenidas fue de $10,3 \pm 1,7$ nm. El índice antioxidante (AI50) para el extracto de HThCL y en la suspensión coloidal AgNPs-HThCL fue de $0,6981 \pm 0,0519$ mg/mL y $0,7383 \pm 0,0085$ mg/mL, respectivamente; mientras el índice electroquímico (EI) fue de 0,0735 mA/V para el extracto y -0,3545 mA/V para la suspensión AgNPs-HThCL. Los resultados de los análisis por las técnicas electroquímicas

concuerdan con los valores obtenidos para el EC50 y contenido fenólico total obtenido por espectrofotometría. El estudio reveló que el extracto de las HThCL posee capacidad como agente antioxidante e igualmente la suspensión coloidal de las AgNPs biosintetizadas a partir de este extracto posee esta misma característica.

ABSTRACT

In this study, silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by bioreduction using aqueous extract of *Theobroma cacao linneu* leaves (HThCL) and the evaluation of the activity and/or antioxidant capacity of the extract and the colloidal suspension. AgNPs- HThCL by electrochemical techniques. The HThCL leaves used are waste products from the cocoa harvest, for which the application described in this research has been found. Electrochemical analyzes were carried out by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) and were contrasted with traditional spectrophotometric analyzes using the DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and Folin Ciocalteu methods; finding that electrochemical techniques are effective to evaluate antioxidant power due to their speed and operability. The synthesized AgNPs were characterized by UV-Vis spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), and cyclic voltammetry (CV). The average size of the AgNPs obtained was 10.3 ± 1.7 nm. The antioxidant index (AI50) for the HThCL extract and the AgNPs-HThCL colloidal suspension was 0.6981 ± 0.0519 mg/mL and 0.7383 ± 0.0085 mg/mL, respectively; while the electrochemical index (EI) was 0.0735 mA/V for the extract and -0.3545 mA/V for the AgNPs-HThCL suspension. The results of the analyzes by electrochemical techniques agree with the values obtained for the EC50 and total phenolic content obtained by spectrophotometry. The study revealed that the HThCL extract has the capacity as an antioxidant agent and also the colloidal suspension of AgNPs biosynthesized from this extract has this same characteristic.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de metales nobles como el oro (Au), la plata (Ag), el platino (Pt) y el paladio (Pd) se han utilizado de forma destacada en aplicaciones medicinales y catalíticas (Royji Albeladi, Malik, & Al-thabaiti, 2020, A. Shankar et al., 2020). Entre las aplicaciones se encuentra la administración, protección encapsulada, biodisponibilidad y administración dirigida y controlada de agentes antioxidantes (Khalil et al., 2020). Particularmente, debido a sus propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y optoelectrónicas únicas, increíbles e intrínsecas (Bilal, Rasheed, Iqbal, Hu, & Zhang, 2017), las nanopartículas de Ag se consideran de gran importancia en los campos como la medicina (Sable, Kawade, Ranade, & Joshi, 2020), farmacología, nanosensores (Royji Albeladi, Malik, & Al-thabaiti, 2020), envasado de alimentos, agricultura (Morales-Luckie et al., 2016), cosmética, textiles (Khalil et al., 2020) y catálisis (K. Do Kim, Han, & Kim, 2004).

Existen varios métodos para sintetizar nanopartículas que incluyen reducción química, síntesis mecánica y métodos biológicos. Se ha reportado la síntesis de nanopartículas de Ag covalentes por todos estos métodos (Ponsanti, Tangnorawich, Ngernyuang, & Pechyen, 2020); sin embargo, en los últimos años ha ganado importancia la bio-reducción de iones plata con extractos de plantas con el fin de minimizar los impactos negativos de los procedimientos sintéticos tradicionales y desarrollar en esta área procedimientos ambientalmente benignos (Dada et al., 2019; Fu et al., 2006; Judith Vijaya et al., 2017; Sable, Kawade, Ranade, & Joshi, 2020). El uso de bio-reductores no requiere equipos costosos o reactivos químicos y comulgan con los principios de la química verde “diseño de productos y procesos respetuosos con el medio ambiente” (Morales-Luckie et al., 2016).

Debido a la presencia natural de metabolitos secundarios, aminoácidos, proteínas y vitaminas en los extractos de plantas, durante el proceso de bio-reducción se ha logrado un mejor control de tamaño y forma de nanopartículas (Sable, Kawade, Ranade, & Joshi, 2020). En este tipo de procesos, son varios los factores de importancia a fin de lograr el tamaño nanométrico deseado: concentración del precursor (comúnmente nitrato de plata), tipo de extracto, temperatura y tiempo de reacción (Dada et al., 2019; Fu et al., 2006; Judith Vijaya et al., 2017; Sable, Kawade, Ranade, & Joshi, 2020). Las interrelaciones entre los factores anteriores, para lograr optimizar métodos de bio-síntesis son complejas (K. Do Kim, Han, & Kim, 2004); sin embargo, las escalas de tiempo cortas que generalmente se requiere en la bio-reducción hacen de este método una vía alternativa, atractiva y viable a los métodos de síntesis química tradicionales (S. S. Shankar, Ahmad, & Sastry, 2003).

El cacao fino de aroma pertenece a la clase *Magnoliopsida*, orden *Malvales*, familia *Malvaceae*, género *Theobroma* y especie *Cacao* (Argout et al., 2011), es originario de las regiones selváticas

de América tropical, donde hasta hoy se encuentra en estado salvaje desde Perú a México. Charles de L'Ecluse, fue el primero en citar el cacao en la literatura botánica como *Cacao fructus*; más tarde en 1737 Linneu lo describió como *Theobroma fructus*. Sin embargo, en 1753, el mismo Linneu propuso el nombre específico de *Theobroma cacao*, que permanece hasta el día de hoy (de Souza, Moreira, Sarmiento, & da Costa, 2018).

En granos secos, sin fermentar, las células de pigmento de este fruto constituyen alrededor del 11 al 13 % del tejido; estas células son ricas en compuestos polifenólicos, en particular catequinas, aunado al característico color púrpura de los granos que se debe a las antocianinas (J. Kim, Lee, & Lee, 2011). Los productos a base de cacao se clasifican en altamente energéticos, estimulantes y antioxidantes (Nasrollahzadeh, Sajadi, Rostami-Vartooni, & Bagherzadeh, 2015; Schewe, Kühn, & Sies, 2002). Particularmente, los polifenoles del cacao exhiben fuerte actividad de eliminación de radicales libres, donde las epicatequinas monoméricas y las procianidinas oligoméricas son eficaces para inhibir tanto la dioxigenasa como la 5-lipoxigenasa y prevenir la oxidación. Además, tienen una gran capacidad para donar electrones (actividad antioxidante) en la reducción de radicales piróxilos por transferencia de átomos de hidrógeno (Cádiz-Gurrea et al., 2014).

Para evaluar la actividad antioxidante de especies químicas se utilizan varios métodos, siendo los más tradicionales por espectrofotometría (José Jara-Palacios, Hernanz, Escudero-Gilete, & Heredia, 2014); métodos que pueden considerarse bien establecidos, pero presentan algunas limitaciones como el tiempo de preparación de la muestra, tiempos largos de análisis y el uso de reactivos costosos (Hoyos-Arbeláez, Vázquez, & Contreras-Calderón, 2017). Técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial se han reportado como alternativas para evaluar la actividad antioxidante de agentes químicos (Lima, dos Santos, Nossol, Richter, & Munoz, 2020). Estas técnicas consideran parámetros de intensidad de corriente (I/A) y potencial (E/V), que se correlacionan directamente con la capacidad y/o actividad antioxidante, mostrándose más eficaces, y algunos casos más sensibles, que los métodos espectrofotométricos (Alves, David, David, Bahia, & Aguiar, 2010). Dichas técnicas se basan en ensayos de características simples, rentables y fáciles de interpretar, que muestran el poder específico y directo de reducción o inhibición de radicales libres a través de la medida de un valor de potencial (Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011).

Por toda la fundamentación anterior, en el presente trabajo de investigación se reporta la síntesis y caracterización de nanopartículas de Ag utilizando extracto acuoso de las hojas de cacao fino de aroma, *Theobroma cacao linneu* (*Malvaceae*), y el uso de técnicas electroquímicas como alternativas para seleccionar el extracto más adecuado para la síntesis por bio-reducción y la

evaluación de la capacidad y/o antioxidante del extracto en presencia y en ausencia de las nanopartículas. Las hojas de HThCL utilizadas son productos de desechos de la cosecha de cacao, para las cuales, y hasta nuestros presentes conocimientos, es primera vez que se ha encontrado la aplicación descrita en el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y soluciones

Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (Sigma Aldrich), dimetilsulfóxido (Merck Millipore), ácido acético glacial (Merck Millipore), hidróxido de potasio (Merck Millipore), nitrógeno gaseoso (Linde), 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (Sigma Aldrich), metanol 99,8 % (Merck Millipore), reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), carbonato de sodio (Merck Millipore), ácido gálico (Sigma Aldrich), nitrato de plata (Thermo Fisher Scientific), hidróxido de sodio (Merck Millipore). Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico y se utilizaron sin mayor purificación.

Preparación de extractos acuosos de hojas de cacao fino de aroma *Theobroma cacao linneu*

Las hojas de *Theobroma cacao linneu* (HThCL), *Malvaceae*, fueron recolectadas mediante un muestreo aleatorio simple entre los principales productores/exportadores de la provincia de Zamora Chinchipe. Las hojas se sometieron a un examen visual para eliminar las partes deterioradas y posibles impurezas adheridas. Luego se lavaron, desecaron y se pulverizaron para su posterior análisis. Las condiciones para la preparación de extractos acuosos a partir de las HThCL, *Malvaceae*, se seleccionaron con el software Statgraphics Centurion XVI.I, a través de un diseño de cribado de tipo factorial 2K completamente aleatorizado (grados de libertad: 1,85). Siguiendo el protocolo de preparación de extractos reportado por Morejon et al. (2018), se varió la cantidad de masa vegetal, temperatura de reacción y tiempo de agitación. Para la preparación del extracto, se empleó una placa de calentamiento Velp Scientific modelo Single-Position Heating Plate: Round (Usmate Velate, Italia). Se realizaron un total de seis (06) ensayos, de los cuales se codificaron los extractos obtenidos de E1 a E6 (Tabla 1), según la variación de los parámetros previamente mencionados. Luego de la preparación y previo a ser usados en la bio-reducción de iones plata, los extractos se filtraron al vacío y se almacenaron a 4 °C.

Tabla 1.- Condiciones experimentales para la obtención de los extractos acuosos de HThCL

ENSAYO	EXTRACTO	MASA VEGETAL (g)	VOLUMEN (mL)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE AGITACION (min)
1	E1	3,0010	60	60	40
2	E2	3,0015	60	30	60
3	E3	2,9995	60	60	60
4	E4	1,5011	60	30	40
5	E5	1,4992	60	60	40
6	E6	1,4990	60	30	60

Evaluación de actividad y poder antioxidante por voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial, respectivamente

La selección de los extractos con mayor y menor actividad antioxidante se realizó por el ensayo de generación *in situs* del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en un medio electrolítico utilizando Voltamperometría Cíclica (CV, por sus siglas en inglés) y siguiendo el protocolo propuesto por Pérez-Cruz et al., (2018) para el cálculo el índice AI50.

El índice AI50, se define como la concentración requerida para reducir el pico de corriente anódica (I_{pa}) en un 50 %. El AI50 se obtiene ubicándose en la mitad de la recta de una gráfica del parámetro adimensional $[(I_{pa(0)} - I_{pa(s)}) / I_{pa(0)}]$ vs. la concentración del extracto en la solución electrolítica; donde $I_{pa(0)}$ es la intensidad de corriente de pico obtenida en el medio electrolítico (blanco) e $I_{pa(s)}$ es la intensidad de corriente de pico obtenida en el medio electrolítico en presencia de la muestra (extracto). Un menor valor de AI50 corresponde a una mayor actividad antioxidante del analito en estudio contra el anión radical $O_2^{\cdot-}$ generado electroquímicamente en el medio (Pisoschi et al., 2015).

Utilizando voltamperometría de pulso diferencial (DPV, por sus siglas en inglés), se calculó de índice electroquímico (EI, por sus siglas en inglés) de acuerdo con lo reportado por Kinyua Muthuri et al (2021), parámetro que proporciona una medida eficaz del poder antioxidante (capacidad y/o actividad) de una especie química, aplicando la siguiente ecuación:

$$EI = \frac{I_{pa\ 1}}{E_{pa\ 1}} + \frac{I_{pa\ 2}}{E_{pa\ 2}} + \dots + \frac{I_{pa\ n}}{E_{pa\ n}} \text{ Ec. (1)}$$

Donde I_{pa} corresponde a la corriente pico anódica y E_{pa} al potencial de pico anódico, obtenidos en el voltamperograma respectivo (Lino et al., 2014).

Para ambos ensayos, se empleó un Potenciostato CH Instruments modelo 700D (Tennison Hill Drive Austin, TX, EE. UU.) y una celda electroquímica, de 20 mL, de un compartimiento y tres electrodos: carbón vítreo (electrodo de trabajo, 3 mm de diámetro), grafito (contraelectrodo) y Ag/AgCl (KCl, 3M) como electrodo de referencia. Antes de cada medida el electrodo de trabajo se pulió con polvo de alúmina (utilizando consecutivamente tamaños de grano de 1,0 µm, 0,3 µm y 0,05 µm) y posteriormente se lavó con agua desionizada a 18m Ω.

Para los ensayos por CV se utilizó como electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio a una concentración de 0,05 M en dimetilsulfóxido (DMS). Se obtuvieron voltamperogramas cíclicos en ausencia y en presencia del extracto a evaluar (extracto sin y con solución coloidal de nanopartículas), en un intervalo de potencial de -0,2 a -1,0V (vs. Ag/AgCl) y velocidad de barrido de 0,1 V/s. Previo a cada lectura la solución electrolítica se agitó durante 1 minuto.

Para los análisis por DPV se utilizó como electrolito soporte buffer acetato, pH=5, obteniendo voltamperogramas en un intervalo de potencial de -1,2 a 1,5V (vs. Ag/AgCl). Antes de cada medida se burbujeo el medio de reacción por 5 minutos con nitrógeno gaseoso para eliminar oxígeno disuelto.

Evaluación de la actividad antioxidante por el método 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

Para comparar los resultados obtenidos mediante los ensayos electroquímicos, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos seleccionados mediante el método tradicional 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). Para este procedimiento, se siguió el protocolo sugerido por Lino et al., (2014) con pequeñas modificaciones: la solución de control estuvo compuesto por una mezcla de 0,5 mL de etanol y 2,5 mL de solución etanólica de DPPH (0,1 mM), la absorbancia se midió a una longitud de onda de 517 nm en un en el espectrofotómetro UV-Vis de doble haz Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) operado con el software Cary WinUV 3.1, con un valor final de A = 0,6. Todas las muestras se analizaron en una celda de 1 cm de longitud a temperatura ambiente (~ 25 °C). El etanol, solvente utilizado para preparar todas las soluciones, se utilizó para ajustar la línea base (A = 0,000). La actividad antioxidante se expresó como EC50, que representa la cantidad (L) de solución de ensayo para cada extracto para producir el 50 % de decoloración de DPPH en relación con el control en blanco. De acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \text{ Ec. (2)}$$

Donde A corresponde a la absorbancia. El EC50 se obtiene al ubicarse en la mitad de la recta de una gráfica de % de inhibición vs. concentración de la especie a analizar (mL) (Sridhar & Charles, 2019).

Cuantificación de contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu

Para cuantificar el contenido fenólico total se seleccionaron los extractos con menor y mayor actividad antioxidante (según los resultados y los códigos en la Tabla 1, E1 y E6, respectivamente) y las soluciones coloidales de nanopartículas de plata con menor y mayor capacidad antioxidante (según los resultados y los códigos en la Tabla 2, EN3 y EN7, respectivamente). Se siguió el protocolo propuesto por García, Fernández, & Fuentes (2015), con pequeñas modificaciones: se tomaron 20 μL de la muestra y se le añadieron 1580 μL de agua destilada, 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 300 μL de una solución de carbonato sódico al 10 %; se dejó reposar la mezcla por 1 hora y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) operado con el software Cary WinUV 3.1. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico para preparar la curva de calibración en un intervalo de concentración de 20 a 120 mg L^{-1} .

Síntesis de nanopartículas de plata por bioreducción con extracto acuoso de HThCL

La síntesis de nanopartículas (AgNPs, por sus siglas en inglés) en solución acuosa de HThCL, se realizó utilizando el protocolo propuesto por Pilaquinga et al. (2021), con ligeras modificaciones. Para el proceso de bioreducción se seleccionaron los extractos con menor y mayor actividad antioxidante (según los resultados y los códigos y los Tabla 1, los ensayos E1 y E6, respectivamente). En la Tabla 2 se presentan las condiciones para la síntesis: se utilizaron 20 mL de solución AgNO_3 1 mM y 1 mL del extracto acuoso de HThCL; a pH 8 (ajustando con NaOH 1 % (Merck 99,9 %), variando el tiempo y potencia del horno microondas MWI 28BL Indurama (Cuenca, Ecuador) utilizado para la síntesis.

Tabla 2.- Condiciones experimentales para la síntesis de AgNPs utilizando los extractos de HThCL con menor y mayor actividad antioxidante

Código del extracto de HThCL	Suspensión coloidal de AgNPs	Volumen de extracto (mL)	Volumen de AgNO_3 (mL)	pH del medio	Potencia (W) del horno microonda	Tiempo (seg)
E1	EN1	1	20	8	4	60
	EN2	1	20	8	4	30
	EN3	1	20	8	8	60
	EN4	1	20	8	8	30
E6	EN5	1	20	8	4	60
	EN6	1	20	8	4	30
	EN7	1	20	8	8	60
	EN8	1	20	8	8	30

Caracterización las nanopartículas de plata

Para la caracterización de las AgNPs por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) operado con el software Cary WinUV 3.1. El rango de longitud de onda utilizado fue de 350 a 800 nm con una resolución de 1 nm.

Para la caracterización de las AgNPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) se utilizó un microscopio Tecnai G20 Spirit, marca Field Electron and Ion Company (FEI) (New York, Estados Unidos). Para calcular el tamaño promedio de las nanopartículas, se tomaron 100 mediciones utilizando el software ImageJ.

El análisis por difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) de las AgNPs se realizó en un difractómetro marca PANalytical modelo EMPYREAN (Nevada, Estados Unidos), operando en una configuración θ - 2θ (geometría Bragg-Brentano) equipado con un tubo de rayos X de cobre ($K\alpha$ radiation $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) a 45 kV y 40 mA. Previo al análisis, la muestra se secó a 30 °C en un portaobjetos, lo que genera una capa fina evitando la degradación orgánica. Para obtener el difractograma final se tomó el promedio de 4 patrones XRD de 5 ° a 90 ° (configuración 2θ).

RESULTADOS

Evaluación de la actividad antioxidante por CV de extractos de HThCL obtenidos en los diferentes ensayos

La actividad antioxidante de los extractos de HThCL obtenidos variando las condiciones de preparación, de acuerdo con lo reportado en la Tabla 1, se evaluó mediante el cálculo del parámetro AI50 por CV. Un ejemplo de los voltamogramas para la evaluación de cada extracto se presenta en la Figura 1 y el resumen de los resultados obtenidos a partir de gráficas como la presentada en la Figura 2 se presentan en la Tabla 3.

De acuerdo con los resultados, Tabla 3, para el extracto E6 se obtuvo el valor de AI50 más bajo, por ende, es el extracto con mayor actividad antioxidante; mientras que el valor más alto de AI50 fue para el extracto E1, por lo cual es el de menor actividad antioxidante. El primer extracto, se logró utilizando 1,4990 g de muestra vegetal, tiempo de agitación de 60 min y temperatura 30° C mientras que el segundo extracto, con 3,0010 g de muestra vegetal, tiempo de agitación de 40 min y temperatura 60° C.

Para fines de comparación, para sintetizar AgNPs mediante biorreducción fueron seleccionados los extractos de HThCL codificados como E1 (menor valor de AI50) y E6 (mayor valor de AI50).

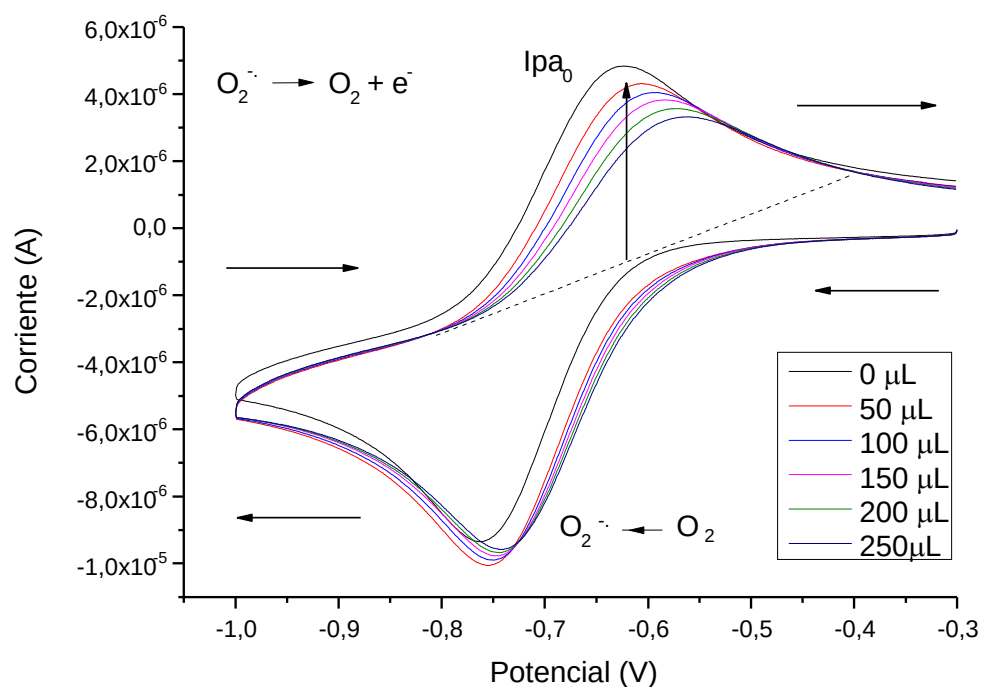


Figura 1: Ejemplo de los voltamperogramas obtenidos para la formación del anión radical $O_2^{\bullet-}$ sobre la superficie de un electrodo de carbono vítreo, después de aumentar sucesivamente la concentración del extracto acuoso E6, volumen de extracto adicionado indicado en el inserto en la figura, en una solución de DMS+ Bu_4NPF_6 0,05 M a una velocidad de barrido 0,1 V/s

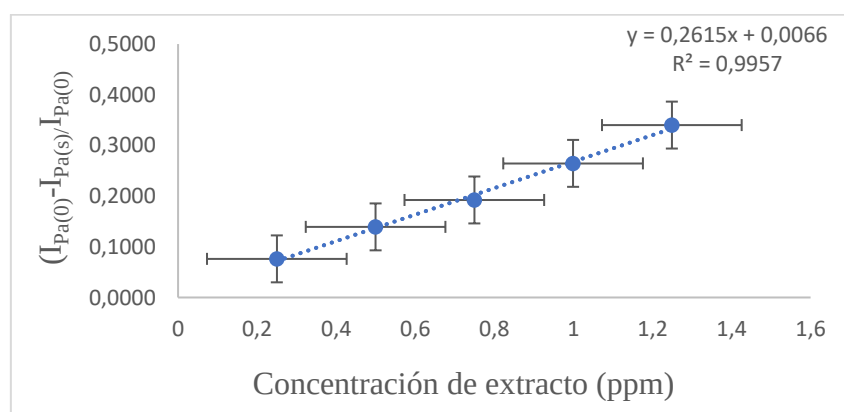


Figura 2: Gráfica del parámetro adimensional $(I_{pa}^0 - I_{pa}^s / I_{pa}^0)$ vs. concentración de extracto (mg/mL) en solución, obtenida para el extracto acuoso de HThCL de mayor actividad antioxidante (codificado como E6)

Tabla 3. Índice antioxidante (AI50) de los extractos acuosos de HThCL obtenidos en los diferentes ensayos

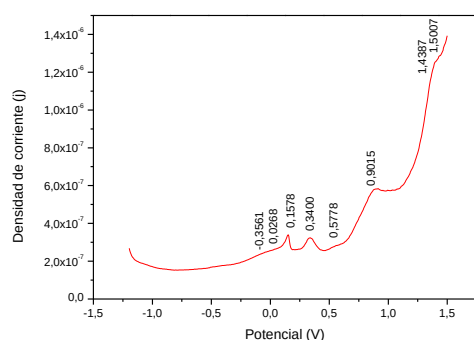
EXTRACTO	AI50 (ppm)	DESVIACIÓN ESTANDAR
E1	1,4178	0,0930
E2	1,3941	0,0520
E3	1,3354	0,0892
E4	0,6631	0,1333
E5	0,7015	0,0421
E6	0,6981	0,0519

Evaluación del poder antioxidante por DPV de extractos de HThCL obtenidos bajo los diferentes ensayos

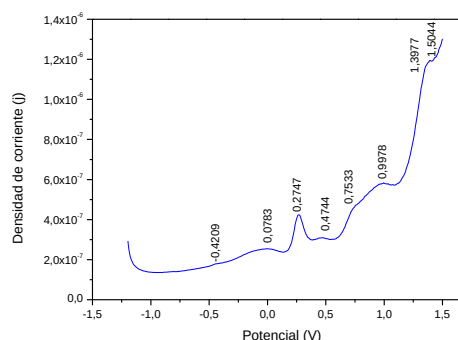
La evaluación del poder antioxidante (capacidad y/o actividad) de los extractos obtenidos, de acuerdo con las condiciones de preparación reportadas en la Tabla 1, se llevó a cabo mediante la obtención del EI por DPV. Los voltamogramas para la evaluación de cada extracto se presentan en la Figura 3 y los valores calculados de EI en Tabla 5.

En la Figura 4, se compara los voltamogramas para los extractos de HThCL con mayor (E6) y menor (E1) actividad antioxidante. El EI proporciona una medida eficaz del poder antioxidante (capacidad y/o actividad) de una especie química y suele estar correlacionado con el contenido de compuestos fenólicos en la muestra analizada. Para el extracto E1 se obtuvo el EI más alto y para el E6 el más bajo (Tabla 4). De acuerdo con este resultado se mantuvo la selección de los extractos E1 y E6 para las síntesis por bioreducción de AgNps.

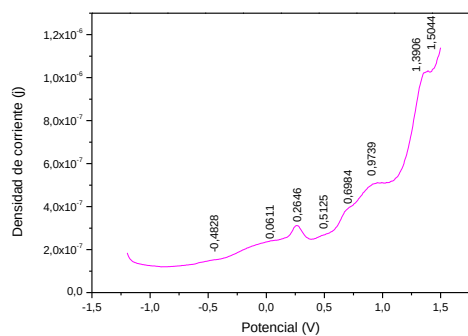
E1



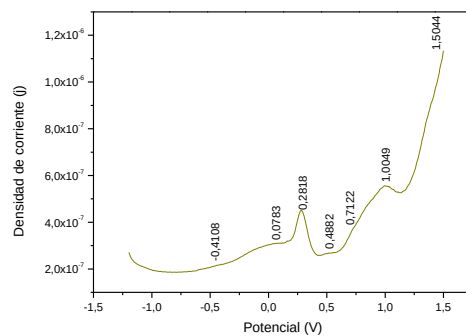
E2



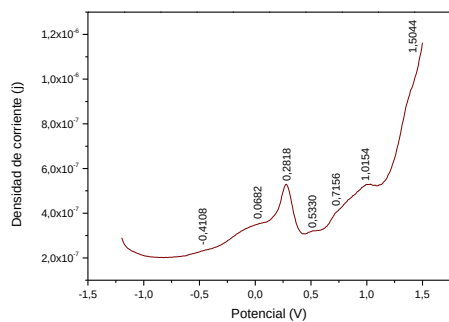
E3



E4



E5



E6

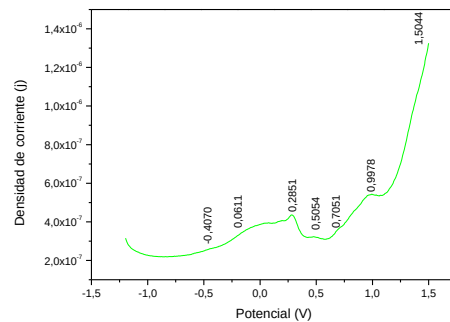


Figura 3: Voltamperogramas de pulso diferencial de los extractos de HThCL en buffer acetato, pH=5, a una velocidad de barrido 0,1 V/s

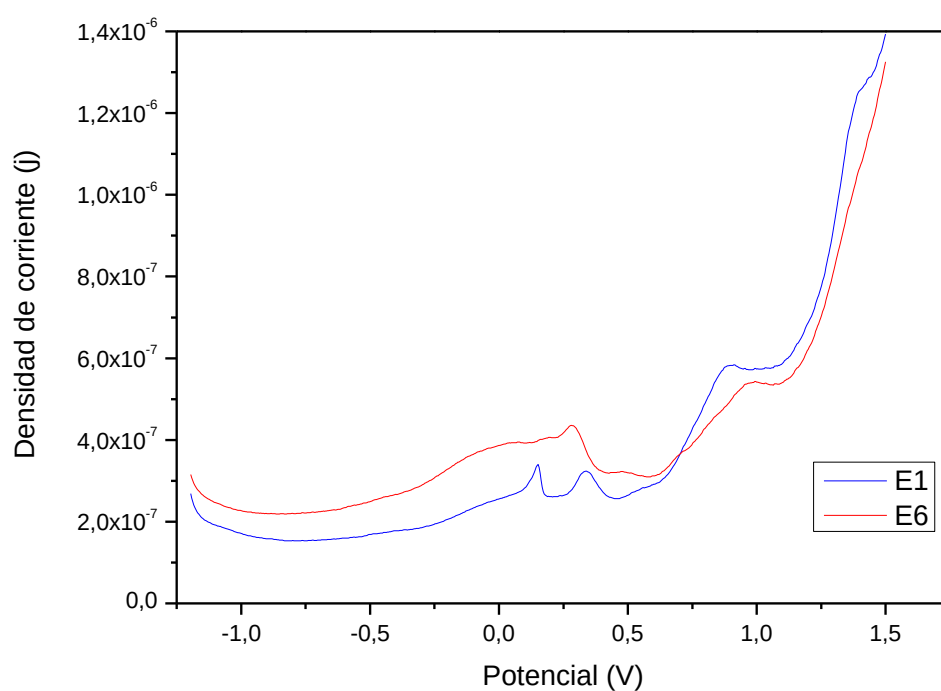


Figura 4: Voltamperograma de pulso diferencial del extracto acuoso de HThCL con mayor (rojo) y menor (azul) actividad antioxidante en buffer acetato pH=5, a una velocidad de barrido de 0,1 V/s

Tabla 4.- Índice electroquímico (EI) de los extractos acuosos de HThCL obtenidos en los diferentes ensayos

EXTRACTO	EI (mA/V)	DESVIACIÓN ESTANDAR
E1	0,1256	0,0127
E2	0,0588	0,0015
E3	0,0572	0,0014
E4	0,0528	0,0022
E5	0,0648	0,0032
E6	0,0735	0,0036

Caracterización de AgNPS sintetizadas por bioreducción utilizando extractos HThCL

Caracterización por espectroscopia UV-VIS

La evaluación del plasmón de superficie mediante la espectroscopia UV-Vis, de las nanopartículas obtenidas variando las condiciones de preparación de acuerdo con lo reportado en la Tabla 3, se presentan en la Figura 5.

La longitud de onda promedio obtenida para las soluciones coloidales de AgNps fue de 410 nm, valor que de acuerdo con la estimación del tamaño de nanopartícula por espectrofotometría UV-Vis propuesta por Pradeep (2012), sugiere un valor aproximado de 30 a 50 nm con el recubrimiento orgánico.

El valor de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de AgNps presentes en el medio. Para las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL identificadas en la Tabla 2 como EN3 y EN7, se obtuvieron los mayores valores de absorbancia, por lo cual fueron seleccionadas para llevar a cabo los análisis por TEM.

De acuerdo con los valores de AI50, reportados en la Tabla 3, las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL etiquetadas como EN3 se sintetizaron con un extracto de HThCL de menor actividad antioxidante que el extracto utilizado para obtener las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL etiquetadas como EN7. Se resalta que las AgNps EN3 se sintetizaron utilizando extractos de HThCL con el doble de masa vegetal, temperatura y tiempo de agitación que los extractos utilizados para sintetizar las AgNps EN7.

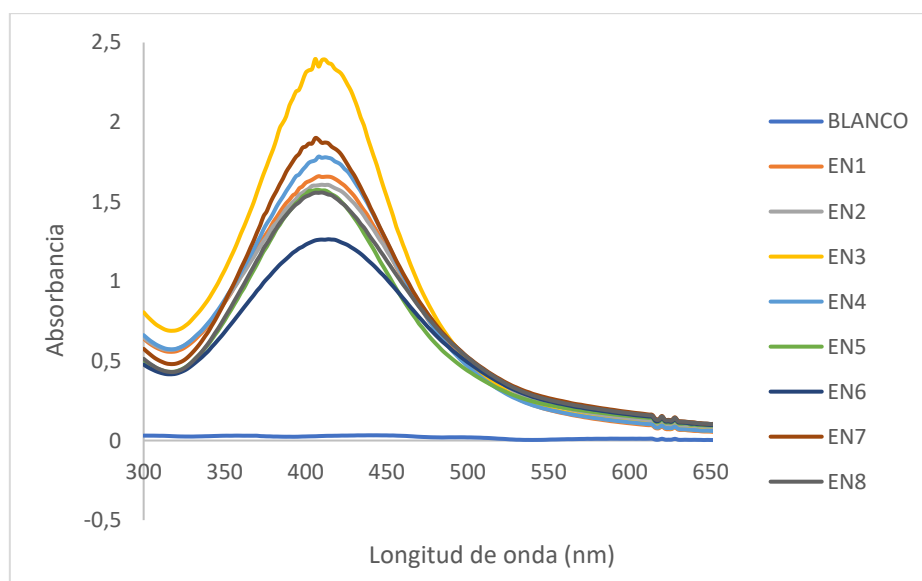


Figura 5: Espectros UV-VIS de soluciones coloidales de AgNPs sintetizadas a partir de los diferentes extractos de HThCL

Caracterización por microscopía electrónica de transmisión

Las micrografías TEM de las AgNPs EN3 y EN7, sintetizadas a partir del extracto acuoso HThCL con menor y mayor capacidad antioxidante, respectivamente, se presentan en la Figura 6 y el histograma de frecuencias normalizado en la Figura 7. Se obtuvo una mayor aglomeración de AgNPs, de mayor tamaño, para aquellas obtenidas con el extracto de menor actividad antioxidante. El tamaño promedio las AgNPs sintetizadas con el extracto de mayor actividad antioxidante fue de $10,3 \text{ nm} \pm 1,7 \text{ nm}$.

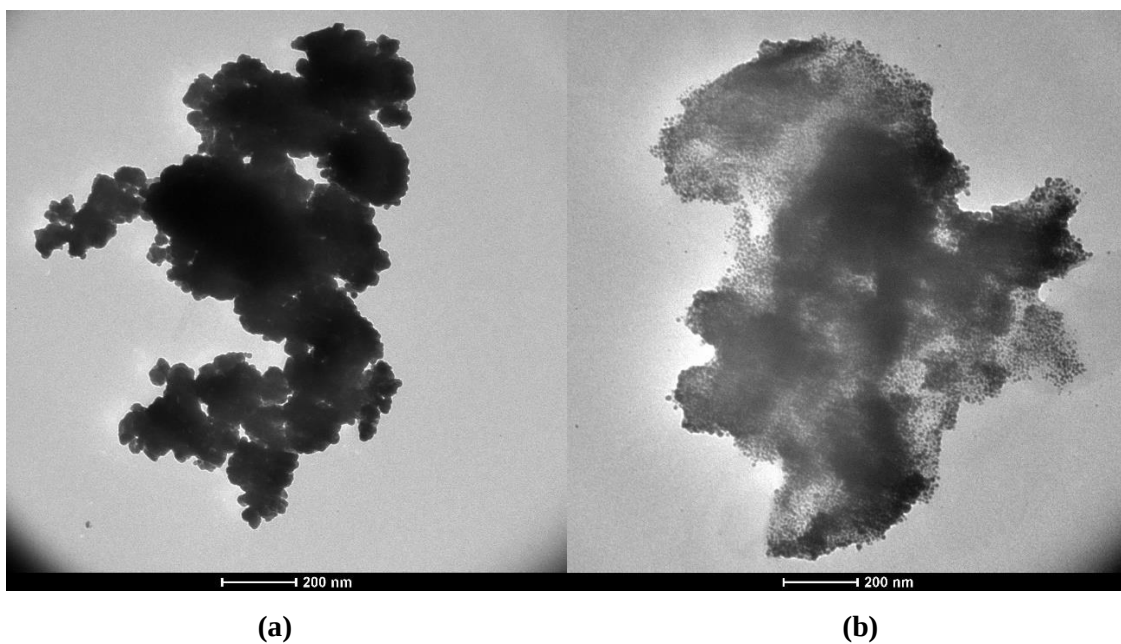


Figura 6: Micrografías TEM de AgNPs: a) EN3 sintetizadas a partir del extracto acuoso HThCL con menor capacidad antioxidante (E1, Tabla 1) y b) EN7 sintetizadas con extracto acuoso de con mayor capacidad antioxidante (E6, Tabla 1)

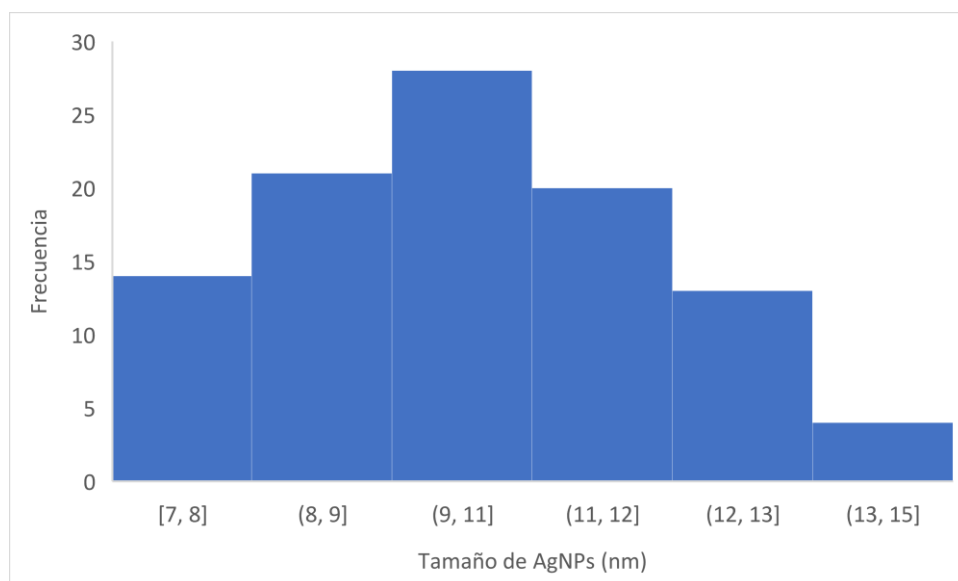


Figura 7: Histograma de frecuencia de tamaño de AgNPs (EN7, Tabla 2) sintetizadas con extracto acuoso de HThCL con mayor capacidad antioxidante (E6, Tabla 1)

Caracterización por difracción de rayos x

La evaluación mediante difracción de rayos X de la naturaleza cristalina de las AgNps obtenidas con el extracto de HThCL de mayor actividad antioxidante (etiquetadas en la Tabla 2 como EN7) se presentan en la Figura 8.

Los datos de XRD de las AgNps sintetizadas, ángulos de 2θ de 32.8° , 38.0° , 56.5° y 66.4° , coincidieron con el número JCPDS que confirma la estructura de cristalina cúbica de las AgNPs (de acuerdo con la ley de Bragg pico de reflexión a 38°).

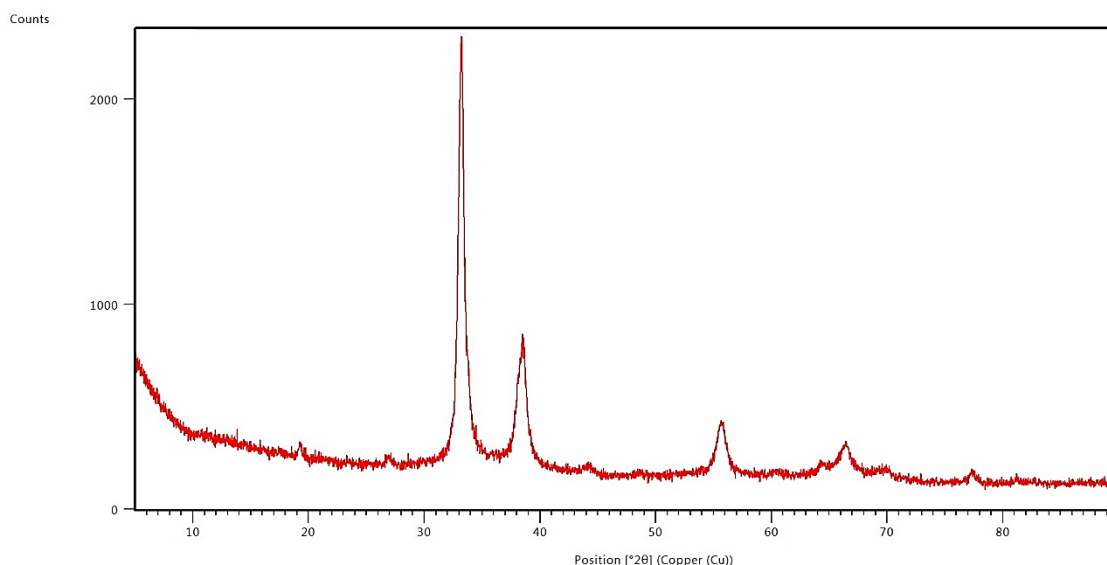


Figura 8: Difractograma de AgNPs sintetizadas con extracto acuoso de HThCL de mayor capacidad antioxidante

Caracterización electroquímica por voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial

Para las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL obtenidas a partir de extractos de mayor actividad antioxidante los valores de AI50 obtenidos son menores, Tabla 5, resultado que confirma la mayor actividad antioxidante de estos extractos; mientras para aquellas suspensiones obtenidas con los extractos de menor actividad antioxidante los valores de AI50 son mayores.

Tabla 5.- Índice antioxidante (AI50) para las suspensiones coloidales de HThCL-AgNPs, obtenidas con los extractos de mayor y menor actividad antioxidante

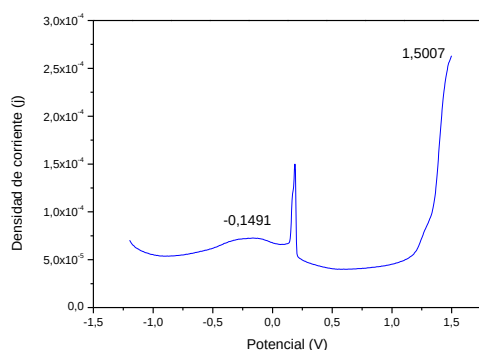
Código del extracto utilizado en la síntesis de las AgNPs	Código de la suspensión de AgNps	AI50 (ppm)	DESVIACIÓN ESTANDAR
E1	EN1	1,5403	0,0630
	EN2	1,4889	0,0231
	EN3	1,4787	0,0285
	EN4	1,4956	0,0285
	EN5	0,7476	0,0212

E6	EN6	0,7441	0,0098
	EN7	0,7383	0,0085
	EN8	0,7461	0,0107

La evaluación del poder antioxidante de las suspensiones AgNPs-HThCL mediante el cálculo del EI por DPV, obtenidas variando las condiciones de preparación de acuerdo con lo reportado en la Tabla 3, se presentan en la Figura 9 y Tabla 6.

Para la suspensión coloidal AgNPs-HThCL obtenidas con el extracto de mayor actividad antioxidante se obtuvieron menores valores de EI; mientras para aquellas obtenidas con los extractos de menor actividad antioxidante los valores de EI son menores, Tabla 6.

EN3



EN7

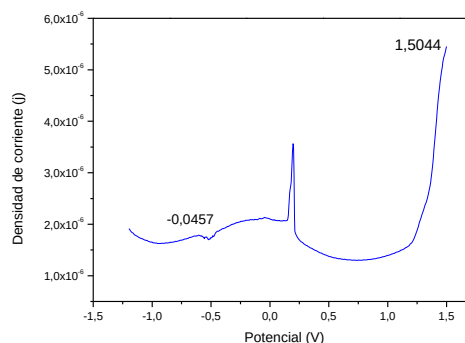


Figura 9: Voltamperograma de pulso diferencial de una suspensión coloidal AgNPs-HThCL con mayor actividad antioxidante sintetizada utilizando extracto de HThCl de menor capacidad antioxidante (izquierda) y una suspensión coloidal AgNPs-HThCL con mayor actividad antioxidante sintetizada con extracto de mayor actividad antioxidante (derecha), en buffer acetato pH=5 y velocidad de 0,1 V/s

Tabla 6.- EI de las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL

AgNPs	EI (mA/V)	DESVIACIÓN ESTANDAR
EN1	-0,0310	0,0090
EN2	-0,0391	0,0078
EN3	-0,0538	0,0086
EN4	-0,0680	0,0093
EN5	-0,1117	0,0196
EN6	-0,1227	0,0240
EN7	-0,3545	0,0275
EN8	-0,1238	0,0225

Todas las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL presentaron voltamperogramas característicos como el que se muestra en la Figura 9, donde se destaca un pico a un potencial aproximadamente de 0,2022 V, asociado a la oxidación de AgNPs presente en cada suspensión. Particularmente, para las suspensiones AgNPs-HThCL provenientes de extractos con mayor actividad antioxidante la corriente a este potencial es mayor, lo que indica una mayor cantidad de AgNPs en dichas suspensiones.

Cuantificación del contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu en los extractos HThCL y las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL con mayor y menor capacidad antioxidante

Se utilizó el método de Folin Ciocalteu para evaluar el contenido fenólico total de los extractos de HThCL y las suspensiones AgNPs-HThCL con menor y mayor actividad antioxidante seleccionados de acuerdo con los resultados obtenidos por las técnicas electroquímicas. La curva de calibración de ácido gálico se presenta en la Figura 10 y los resultados, comparando con los valores de EI, en la Tabla 7. De acuerdo con los resultados, los valores de contenido fenólico total concuerdan perfectamente con los valores de EI obtenidos para cada uno de los extractos mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7.- Concentración de ácido gálico en los extractos de HThCL y en las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL con mayor y menor capacidad antioxidante

Muestra	Concentración de ácido gálico (mg/L)	Desviación Estándar	EI
E6	44,0370	1,2183	0,0735
E1	107,8889	1,6630	0,1256
EN7	34,5556	1,1037	-0,3545
EN3	39,0000	1,5818	-0,0538

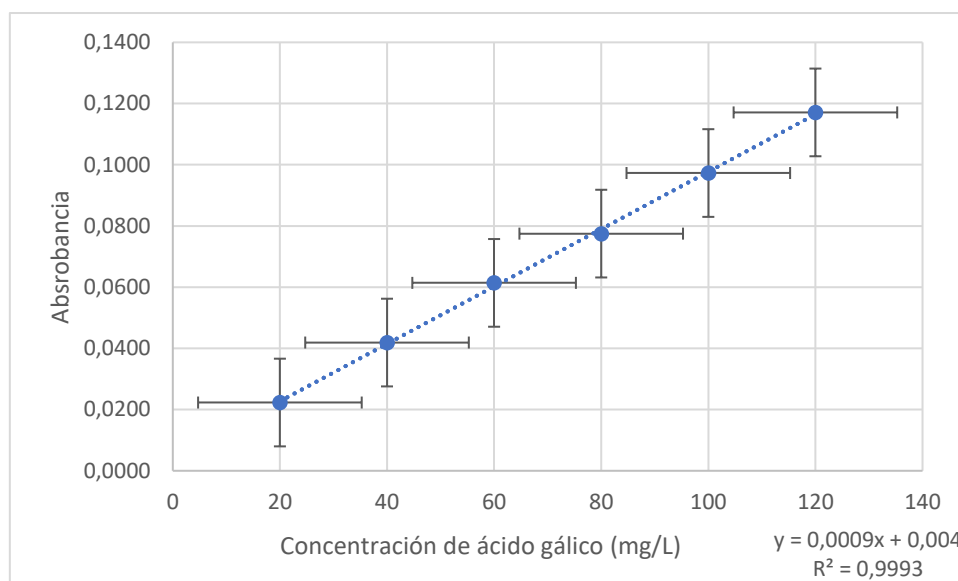


Figura 10: Curva de calibración de ácido gálico. $\lambda = 765 \text{ nm}$

Evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH de los extractos de HThCL y las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL con mayor y menor actividad antioxidante

Se utilizó el método de DPPH para contrastar los resultados obtenidos por los métodos electroquímicos, utilizando los extractos de HThCL y las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL con mayor y menor actividad antioxidante. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Comparando las Tablas 3 y 8, se observa que los valores de EC50 y AI50 presentan una correlación directamente proporcional; mientras que los valores de que los valores de EC50 y EI, Tabla 7 y 8, presentan una correlación inversa.

Tabla 8.- EC50 obtenidos para los extractos de HThCL y las suspensiones coloidales AgNPs-HThCL con menor y mayor capacidad antioxidante

Muestra							
E1		E6		EN3		EN7	
EC50 (μL)	Des. Estándar	EC50 (μL)	Des. Estándar	EC50 (μL)	Des. Estándar	EC50 (μL)	Des. Estándar
60	0,3	20	0,3	30	0,4	13	0,5

DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad antioxidante por voltamperometría cíclica

A partir del gráfico del parámetro $[(I_{pa(0)} - I_{pa(s)}) / I_{pa(0)}]$ vs. [extracto en solución] (Figura 2), se obtuvo el índice antioxidante AI50, el cual es inversamente proporcional a la actividad antioxidante del extracto frente al anión radical $O_2^{\cdot -}$ generado electroquímicamente en la solución electrolítica. Los resultados presentados en la Tabla 3, indican que el extracto de HThCL codificado como E6 fue el de menor valor de AI50 ($0,6981 \pm 0,0519$ ppm) y el E1 con el valor más alto ($1,4178 \pm 0,0930$ ppm), los cuales serían los extractos con la mayor y menor actividad antioxidante, respectivamente. Estos resultados sugieren que a mayor cantidad de masa vegetal de HThCL y mayor temperatura utilizada para la síntesis menor fue actividad antioxidante del extracto obtenido, resultados que coinciden con aquellos reportados por Pilaquinga (2021).

El extracto con menor actividad antioxidante, en el cual se utilizó mayor masa vegetal, promovió menor disminución en la corriente de oxidación del voltamograma (Figura 1), lo que se asocia a la mayor cantidad de electrones que podrían aportar los azúcares reductores de los extractos de HThCLs en relación al extracto con mayor actividad antioxidante, lo que resulta en un aumento del radical superóxido en solución, para mantener el sistema en equilibrio, reflejado en el aumento de corriente de reducción en el ciclo voltamperométrico (Climent & Feliu, 2018). Los azúcares reductores, polisacáridos, lignina y celulosa son extraídos al saturar la solución con el extracto vegetal, proceso favorecido por el aumento de la temperatura del medio de reacción, puesto que se alcanza la energía suficiente para romper los enlaces de los compuestos precursores (Rosales-Castro et al., 2016). Por lo anterior, un aumento de masa vegetal y temperatura en la preparación de los extractos acuosos de HThCL contrarrestaría la actividad antioxidante aportada por los fenoles y flavonoides.

En la Tabla 5, se observa que las suspensiones coloidales HThCL-AgNPs obtenidas a partir de los extractos de mayor y menor actividad antioxidante (E6 y E1, respectivamente), resultaron con mayor y menor actividad antioxidante, respectivamente; resultado que confirma los reportados en la Tabla 3 a partir de los cuales se seleccionaron las condiciones experimentales consideradas óptimas para la síntesis de las AgNPs respectivas a partir de cada extracto.

Cuando se compararán los valores de AI50 reportados en la Tabla 3, para los extractos de HThCL, con los reportados en la Tabla 5, para las suspensiones HThCL-AgNPs, estos fueron mayores para los primeros; resultado que se asocia a la disminución de la cantidad de compuestos

antioxidantes en las suspensiones coloidales producto de la reacción de bio-reducción con los iones plata para formar AgNPs (Rivera-Rangel et al., 2018).

Evaluación del poder antioxidante por voltamperometría de pulso diferencial

De acuerdo con la literatura Glód et al. (2014) las señales a menores potenciales de oxidación en los voltamperogramas en la Figura 3 se pueden asociar a compuestos con mayor capacidad de donación de electrones, y las señales de corriente mayores indican mayor concentración de estas especies presentes en solución. En la Tabla 9 se resume el número de señales, valores de potencial anódico (E_{pa}) y densidad de corriente (j) obtenidos en los voltamogramas para los extractos acuosos de HThCL con menor y mayor actividad antioxidante seleccionados de acuerdo con los valores calculados de AI50. Los resultados indican que no existe diferencia sustancial entre los valores de los E_{pa} y j entre los diferentes extractos, lo que sugiere la presencia de especies muy parecidas químicamente en los extractos e igual cantidad de ellas. Sin embargo, en la Tabla 4 destaca el extracto E1 (menor actividad antioxidante) por su mayor valor de EI ($0,1256 \pm 0,0127$ mA/V) y el E6 (mayor capacidad antioxidante) por el valor más bajo ($0,0735 \pm 0,0036$ mA/V). Comparando los resultados reportados en las Tablas 3 y 8, se observa que los valores de AI50 y EC50 presentan una correlación directa, para aquellos extractos con menor valor de AI50 (Tabla 3), y por ende mayor actividad antioxidante, se obtuvo igualmente un valor de EC50 menor (Tabla 8). Mientras que, los valores de EC50 y EI, Tabla 7 y 8, presentan una correlación inversa; cuanto menor es la cantidad requerida para convertir el radical DPPH en su forma reducida (Tabla 8), mayor será la actividad antioxidante. Por otro lado, cuanto mayor sea el valor de EI mayor será el contenido de antioxidantes, así como su poder reductor inherente en la muestra relacionada.

El valor de EI del extracto E1 es menor que el del E6, mientras que la I_{pa} no varía apreciablemente entre ambos extractos. Considerando que “actividad antioxidante” se refiere a la velocidad de reacción entre el compuesto antioxidante y la especie oxidable, mientras que la “capacidad antioxidante” se refiere a la cantidad (en moles) de radicales recuperados por mol de antioxidante (es decir, el factor estequiométrico), podemos concluir que el extracto E1 tiene mayor capacidad antioxidante que el extracto E6; sin embargo, ambos poseen actividad antioxidante similar.

Tabla 9.- Valores de densidad de corriente y potencial de pico (Epa) anódico de HThCL con menor y mayor capacidad antioxidante

Señal en el votamograma de la Figura 4 (E(V) vs. j (A/mm ²))	EXTRACTO			
	E1		E6	
	Epa (V)	j (A/mm ²)	Epa (V)	j (A/mm ²)
1	-0,3761	1,768x10 ⁻⁷	-0,4070	2,6597x10 ⁻⁷
2	0,0268	2,603x10 ⁻⁷	0,0611	3,8820x10 ⁻⁷
3	0,1578	3,383x10 ⁻⁷	0,2851	4,3545x10 ⁻⁷
4	0,3400	3,216x10 ⁻⁷	0,5054	3,1873x10 ⁻⁷
5	0,5778	2,855x10 ⁻⁷	0,7051	3,7150x10 ⁻⁷
6	0,9015	5,800x10 ⁻⁷	0,9978	5,4113x10 ⁻⁷
7	1,4387	1,286x10 ⁻⁶	1,5044	1,3219x10 ⁻⁶

Cuanto se comparan los voltamogramas obtenidos para los diferentes extractos de HThCL, Figura 3 y la Figura 4, con los correspondientes a las suspensiones coloidales HThCL-AgNPs (Figura 9), se observa la desaparición, casi en su totalidad, de todas las señales asociadas a las especies antioxidantes identificadas y ahora se aprecia solo un pico muy pronunciado ubicado a 0,1989V (vs. Ag/AgCl). Este pico totalmente simétrico se asocia a la oxidación de las nanopartículas de plata presentes en la supresión HThCL-AgNPs, lo cual corrobora la presencia de este material nanoparticulado en este medio (Glód et al., 2014). Por otro lado, el valor de densidad de corriente para este pico es mayor para suspensión HThCL-AgNPs obtenida del extracto E3, lo cual indica una mayor cantidad de material nanoparticulado obtenido en la biosíntesis; resultado que concuerda con los obtenidos por TEM.

Caracterización por espectroscopia UV-VIS de las AgNPs

Para las suspensiones HThCL-AgNPs etiquetadas como EN3 y EN7 se tienen las señales de máxima absorbancia a una longitud de onda 413,99 nm y nm 409,98 nm, respectivamente (Figura 5). Ambas suspensiones fueron obtenidas utilizando 1 mL de extracto vegetal, 20 mL de AgNO₃, pH=8 potencia de 800W y tiempo de 60s, donde la diferencia entre ellas es la actividad antioxidante del extracto vegetal utilizado para obtenerlas; la suspensión EN3 se obtuvo utilizando el extracto E1 con menor actividad antioxidante y EN7 utilizando el extracto E6 con mayor actividad antioxidante.

Las nanopartículas de plata tienen tendencia a agregarse y formar partículas a granel, debido a la atracción de las fuerzas *Van der Waals* entre ellas, por ende, la suspensión HThCL-AgNPs etiquetada como EN3 al formar un conglomerado (Figura 6) genera una mayor absorción, puesto que permite un menor paso de luz en comparación a la suspensión HThCL-AgNPs etiquetada como EN7.

Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de las veces se forma una capa eléctrica dipolar en su superficie, por lo cual puede presentarse diferencias entre los tamaños de partícula esperados y los obtenidos por esta técnica (Portilla-Arias et al., 2010). De acuerdo con el resultado por UV-Vis, la estimación del tamaño de nanopartícula, tomando en cuenta el recubrimiento orgánico que la acompaña (Pradeep, 2012), tienen un valor aproximado de 30 a 50 nm.

Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de las AgNPs

De acuerdo a la micrografía (Figura 6) y el histograma (Figura 7) de las AgNPs obtenidas en la suspensión EN7 y sintetizadas con el extracto acuoso de HThCL de mayor actividad antioxidante, E6, el tamaño real aproximado de las AgNPs fue de $10,3 \pm 1,7$ nm con una morfología cuasi-esférica que destacan por su dispersión, mientras que las AgNPs obtenidas en la suspensión EN3 sintetizadas con el extracto acuoso de HThCL de menor actividad antioxidante, E1, formaron un conglomerado de AgNPs agregadas (Figura 6), que no permitió medir el tamaño estimado de las mismas, además de reducir la resonancia de plasmón superficial y la gran sección eficaz que mantienen las nanopartículas.

Caracterización por difracción de rayos x de las AgNPs

En el difractograma de las AgNPs sintetizadas con el extracto de HThCL de mayor actividad antioxidante, Figura 8, se muestran los picos a ángulos de 2θ 32.8 °, 38.0 °, 56.5 ° y 66.4 ° correspondientes a los planos de reflexión de una red cúbica de óxido de plata, (111), (002), (122) y (220), referenciada por ICDD 98-028-1041 (Pilaquina et al., 2021). No hubo evidencia de otros componentes, como el cloruro de plata, como posibles competidores para la reacción química. Este resultado indica que la reacción está sujeta a la exclusiva bioreducción a nanocristales AgNPs por el extracto acuoso de HThCL por la síntesis.

Cuantificación del contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu en los extractos de HThCL y suspensiones coloidales AgNPs-HThCL con mayor y menor actividad antioxidante

Se utilizó el método Folin Ciocalteu para evaluar el contenido fenólico, mediante una curva de calibración fue de ácido gálico (Figura 10), donde a partir de la misma se pudo cuantificar el contenido fenólico total en los extractos de HThCL y las suspensiones HThCL-AgNPs (Tabla 7).

El extracto E1, de menor actividad antioxidante de acuerdo con su valor AI50, resultó ser el extracto con mayor contenido fenólico ($107,89 \pm 1,66 \text{ mg L}^{-1}$). En la síntesis de este extracto se utilizó la mayor cantidad de masa vegetal (Tabla 1), por lo que los ensayos por Folin Ciocalteu, al ser sensibles a la luz, pueden valorar a los compuestos opacos (como por ejemplo taninos) presentes en la solución que no necesariamente contribuyen a la actividad antioxidante del extracto evaluado en el ensayo. Por otro lado, el concepto de EI establece que electroquímicamente el contenido total de polifenoles en una muestra se obtiene por oxidación no selectiva de todos los polifenoles, pero se pueden estimar la identidad y poder antioxidante, de acuerdo al potencial de oxidación, de las diferentes fracciones que conformen al conglomerado de especies antioxidantes presentes en la muestra (Escarpa, 2012). El contenido fenólico total (Tabla 7), se correlacionó perfectamente con los valores de EI obtenidos para cada uno de los extractos mostrados en las Tablas 4 y 6; para los extractos con mayor contenido fenólico el EI es mayor. Para las suspensiones coloidales HThCL-AgNPs EN3 y EN7, se obtuvieron valores del contenido fenólico muy similares: $39,00 \pm 1,58$ y $34,56 \pm 1,10 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. La disminución de la concentración del contenido fenólico de estas suspensiones en comparación a la de los extractos de los que provienen, E1 y E6, respectivamente, se asocia al consumo de material en la reducción de iones plata a AgNPs; encontrándose que en estas suspensiones aún hay presencia de compuestos antioxidantes que reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu.

Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH de los extractos de HThCL y las suspensiones HThCL-AgNPs con mayor y menor actividad antioxidante

El método DPPH es una técnica espectrofotométrica tradicional que se utiliza para estimar la actividad antioxidante (Prior et al., 2005). En la Tabla 8 se presenta los EC50 para los extractos E1 y E6 y las suspensiones HThCL-AgNPs EN3 y EN7. De acuerdo con estos resultados y considerando que la "actividad antioxidante" se refiere a la velocidad de reacción entre los antioxidantes y las especies oxidables y la "capacidad antioxidante" a la cantidad (en moles) de radicales recuperados por mol de antioxidante (es decir, el factor estequiométrico), podemos concluir que el extracto de HThCL E6 posee la mayor actividad antioxidante y por ende es el mejor precursor de AgNPs. Este extracto fue obtenido con el menor contenido de masa vegetal,

menor temperatura y menor tiempo de agitación. A partir de este extracto se sintetizaron AgNPs con las mejores características, según los resultados obtenidos por TEM y XRD.

CONCLUSIÓN

En este estudio, se obtuvieron AgNPs de tamaño $10,3 \pm 1,7$ nm utilizando extracto de hoja acuosa de *Theobroma cacao linneu* por la ruta de síntesis verde. La reducción de los iones plata se asoció con la presencia de antioxidantes en el extracto de hojas de esta planta. Los valores de la actividad antioxidante de los extractos analizados por CV, Folin-Ciocalteu y DPPH disminuyeron en relación con la suspensión coloidal de AgNPs provenientes del extracto respectivo, lo que podría ser una medida indirecta de la capacidad de compuestos antioxidantes para reaccionar con los compuestos reductores presentes. La metodología electroquímica aplicada en este trabajo redujo considerablemente la cantidad de muestras para los análisis posteriores, por lo que se sugiere mantenerla en los futuros análisis de síntesis de AgNPS con extractos vegetales con los cuales no se haya trabajado.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Pontificia Universidad católica del Ecuador por el financiamiento a esta investigación, al Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Ecuador, por su soporte técnico y al Dr. Omar Vacas de IN-GANDU por el suministro del material vegetal.

LISTA DE REFERENCIAS

- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, 33(10), 2202–2210. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., ... Lanaud, C. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2), 101–108. <https://doi.org/10.1038/ng.736>
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
- Bilal, M., Rasheed, T., Iqbal, H. M. N., Hu, H., & Zhang, X. (2017). Silver nanoparticles: Biosynthesis and antimicrobial potentialities. *International Journal of Pharmacology*, Vol. 13, pp. 832–845. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.832.845>
- Cádiz-Gurrea, M. L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gámez, M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive

- characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods*, 10, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>
- Chang, H.-Y., Huang, G.-J., Chang, Y.-S., Ho, Y.-L., Sheu, M.-J., Lin, Y.-H., ... Wu, S.-H. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies*, 48(4), 407–417. Retrieved from <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2007/4/Bot484-05.pdf>
 - Chen, Z., Bertin, R., & Frolidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138(1), 414–420. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.001>
 - Climent, V., & Feliu, J. M. (2018). Cyclic Voltammetry. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 48–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.10764-4>
 - Dada, A. O., Adekola, F. A., Dada, F. E., Adelani-Akande, A. T., Bello, M. O., Okonkwo, C. R., ... Adetunji, C. O. (2019). Silver nanoparticle synthesis by *Acalypha wilkesiana* extract: phytochemical screening, characterization, influence of operational parameters, and preliminary antibacterial testing. *Heliyon*, 5(10), e02517. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02517>
 - de Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., & da Costa, F. B. (2018). Cacao—*Theobroma cacao*. In *Exotic Fruits* (pp. 69–76). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1>
 - Eklund, P. C., Långvik, O. K., Wärnå, J. P., Salmi, T. O., Willför, S. M., & Sjöholm, R. E. (2005). Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(18), 3336–3347. <https://doi.org/10.1039/B506739A>
 - Escarpa, A. (2012). Food electroanalysis: sense and simplicity. *Chemical Record (New York, N.Y.)*, 12(1), 72–91. <https://doi.org/10.1002/TCR.201100033>
 - Farag, R. S., Abdel-Latif, M. S., Abd El Baky, H. H., & Tawfeek, L. S. (2020). Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnology Reports*, 28, e00536. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00536>
 - Fu, M., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., He, N., Deng, X., ... Huang, J. (2006). Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(1), 114–117. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(06\)60046-3](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(06)60046-3)
 - García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. Universidad Politecnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos., 1–9. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>

- Glód, B. K., Kiersztyn, I., & Piszcz, P. (2014). Total antioxidant potential assay with cyclic voltammetry and/or differential pulse voltammetry measurements. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 719, 24–29. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2014.02.004>
- Hoyos-Arbeláez, J., Vázquez, M., & Contreras-Calderón, J. (2017, April 15). Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chemistry*, Vol. 221, pp. 1371–1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.017>
- José Jara-Palacios, M., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research International*, 66, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.009>
- Judith Vijaya, J., Jayaprakash, N., Kombaiyah, K., Kaviyarasu, K., John Kennedy, L., Jothi Ramalingam, R., ... Maaza, M. (2017). Bioreduction potentials of dried root of *Zingiber officinale* for a simple green synthesis of silver nanoparticles: Antibacterial studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 177, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.007>
- Keffous, F., Belboukhari, N., Sekkoum, K., Djeradi, H., Cheriti, A., Aboul-Enein, H. Y., Aboul, H. Y., Martha, A., Slawin, Z., & Aboul-Enein Is A Professor, H. Y. (2016). Determination of the antioxidant activity of *Limoniastrum feei* aqueous extract by chemical and electrochemical methods. *Http://Www.Editorialmanager.Com/Cogentchem*, 2(1), 1186141. <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1186141>
- Khalil, I., Yehye, W. A., Etxeberria, A. E., Alhadi, A. A., Dezfooli, S. M., Julkapli, N. B. M., ... Seyfoddin, A. (2020, December 26). Nanoantioxidants: Recent trends in antioxidant delivery applications. *Antioxidants*, Vol. 9, p. 24. <https://doi.org/10.3390/antiox9010024>
- Kim, K. Do, Han, D. N., & Kim, H. T. (2004). Optimization of experimental conditions based on the Taguchi robust design for the formation of nano-sized silver particles by chemical reduction method. *Chemical Engineering Journal*, 104(1–3), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2004.08.003>
- Kim, J., Lee, K. W., & Lee, H. J. (2011). Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 351–360). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10042-8>
- Kinyua Muthuri, L., Nagy, L., & Nagy, G. (2021). Chronopotentiometric method for assessing antioxidant activity: A reagentless measuring technique. *Electrochemistry*

Communications, 122. <https://doi.org/10.1016/J.ELECOM.2020.106907>

- Kiranmayi Mangamuri, U., Rama Krishna Ganduri, V. S., S Sambasiva Rao, K. R., & Poda, S. (2016). Green synthesis, characterisation and biological activities of silver nanoparticles by using *Wrightia tomentosa* leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(6), 266–278. Retrieved from www.jocpr.com
- Lester, G. E., Lewers, K. S., Medina, M. B., & Saftner, R. A. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 102–107. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2012.05.003>
- Lima, A. P., dos Santos, W. T. P., Nossol, E., Richter, E. M., & Munoz, R. A. A. (2020). Critical evaluation of voltammetric techniques for antioxidant capacity and activity: Presence of alumina on glassy-carbon electrodes alters the results. *Electrochimica Acta*, 358, 136925. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136925>
- Lino, F. M. A., de Sá, L. Z., Torres, I. M. S., Rocha, M. L., Dinis, T. C. P., Ghedini, P. C., Somerset, V. S., & Gil, E. S. (2014). Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochimica Acta*, 128, 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2013.08.109>
- Medina, M. B. (2011). Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1565–1571. https://doi.org/10.1021/JF103711C/SUPPL_FILE/JF103711C_SI_001.PDF
- Morales-Luckie, R. A., Lopezfuentes-Ruiz, A. A., Olea-Mejía, O. F., Liliana, A. F., Sanchez-Mendieta, V., Brostow, W., & Hinestroza, J. P. (2016). Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Heterotheca inuloides* as reducing agent and natural fibers as templates: Agave lechuguilla and silk. *Materials Science and Engineering C*, 69, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.066>
- Morejón, B., Pilaquinga, F., Domenech, F., Ganchala, D., Debut, A., & Neira, M. (2018). Larvicidal Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Using Extracts of *Ambrosia arborescens* (Asteraceae) to Control *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Nanotechnology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6917938>
- Mwamatope, B., Tembo, D., Chikowe, I., Kampira, E., & Nyirenda, C. (2020). Total phenolic contents and antioxidant activity of *Senna singueana*, *Melia azedarach*, *Moringa oleifera* and *Lannea discolor* herbal plants. *Scientific African*, 9, e00481. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00481>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Rostami-Vartooni, A., & Bagherzadeh, M. (2015). Green synthesis of Pd/CuO nanoparticles by *Theobroma cacao* L. seeds extract and their catalytic performance for the reduction of 4-nitrophenol and phosphine-free Heck

- coupling reaction under aerobic conditions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 448, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.009>
- Pérez-Cruz, K., Moncada-Basualto, M., Morales-Valenzuela, J., Barriga-González, G., Navarrete-Encina, P., Núñez-Vergara, L., ... Olea-Azar, C. (2018). Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(4), 525–537. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.007>
 - Pilaquinga, F., Morejón, B., Ganchala, D., Morey, J., Piña, N., Debut, A., & Neira, M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L. (Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *PLOS ONE*, 14(10), e0224109. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0224109>
 - Pilaquinga, F., Morey, J., Fernandez, L., Espinoza-Montero, P., Moncada-Basualto, M., Pozo-Martinez, J., Olea-Azar, C., Bosch, R., Meneses, L., Debut, A., & Piña, M. de las N. (2021). Determination of Antioxidant Activity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-FL), Cellular Antioxidant Activity (CAA), Electrochemical and Microbiological Analyses of Silver Nanoparticles Using the Aqueous Leaf Extract of *Solanum mammosum* L. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 5879–5894. <https://doi.org/10.2147/IJN.S302935>
 - Pisoschi, A. M., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2015). Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review. *Open Chem*, 13, 824–856. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0099>
 - Ponsanti, K., Tangnorawich, B., Ngernyuang, N., & Pechyen, C. (2020). A flower shape-green synthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNPs) with different starch as a reducing agent. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(5), 11003–11012. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.07.077>
 - Portilla-Arias, J., Patil, R., Hu, J., Ding, H., Black, K. L., García-Alvarez, M., Muoz-Guerra, S., Ljubimova, J. Y., & Holler, E. (2010). Nanoconjugate platforms development based in poly(L-Malic Acid) methyl esters for tumor drug delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/825363>
 - Pradeep, T. (2012). *A textbook of nanoscience and nanotechnology* (1st ed.). McGraw Hill.
 - Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/JF0502698>
 - Rivera-Rangel, R. D., González-Muñoz, M. P., Avila-Rodriguez, M., Razo-Lazcano, T.

- A., & Solans, C. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 536, 60–67. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2017.07.051>
- Rosales-Castro, M., Amador Honorato-Salazar, J., Berenice Santos-García, A., Elena Pérez-López, M., Colotl-Hernández, G., Sánchez-Monsalvo, V., & Martinito, S. (2016). Chemical composition of leaves and branches of *Cedrela odorata* L. from two forest plantations as a source of lignocellulosic feedstock. *Madera y Bosques*, 22(2), 131–146.
 - Royji Albeladi, S. S., Malik, M. A., & Al-thabaiti, S. A. (2020). Facile biofabrication of silver nanoparticles using *Salvia officinalis* leaf extract and its catalytic activity towards Congo red dye degradation. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(5), 10031–10044. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.06.074>
 - Sable, S. V., Kawade, S., Ranade, S., & Joshi, S. (2020). Bioreduction mechanism of silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 107, 110299. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110299>
 - Santos, L. A. (2015). Geomorfologia e Quaternário do rio Vaza-Barris, Nordeste, Brasil (Universidade Estadual Paulista (UNESP)). Retrieved from <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/138521>
 - Schewe, T., Kühn, H., & Sies, H. (2002). Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *Journal of Nutrition*, 132(7), 1825–1829. <https://doi.org/10.1093/jn/132.7.1825>
 - Shankar, A., Kumar, V., Kaushik, N. K., Kumar, A., Malik, V., Singh, D., & Singh, B. (2020). *Sporotrichum thermophile* culture extract-mediated greener synthesis of silver nanoparticles: Eco-friendly functional group transformation and antibacterial study. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100029>
 - Shankar, S. S., Ahmad, A., & Sastry, M. (2003). Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *Biotechnology Progress*, 19(6), 1627–1631. <https://doi.org/10.1021/bp034070w>
 - Sreeram, K. J., Nidhin, M., & Nair, B. U. (2008). Microwave assisted template synthesis of silver nanoparticles. *Bulletin of Materials Science*, 31(7), 937–942. <https://doi.org/10.1007/s12034-008-0149-3>
 - Sridhar, K., & Charles, A. L. (2019). In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, 275, 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.040>

- Tian, W., Chen, G., Gui, Y., Zhang, G., & Li, Y. (2021). Rapid quantification of total phenolics and ferulic acid in whole wheat using UV–Vis spectrophotometry. *Food Control*, 123, 107691. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107691>
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.033>