

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis de nanopartículas de plata utilizando como agente reductor los flavonoides, polifenoles y azúcares reductores presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica

SANDRA CAMILA GRANJA MOREANO

Quito, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la Srta. Sandra Camila Granja Moreano ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. María Fernanda Pilaquina
Directora de la Disertación
Quito, 10 de enero del 2019

A todas aquellos impetuosos y amantes del conocimiento. Para todas aquellas personas que comparten de la alegría que se encuentra en la investigación, pues los principios científicos no son inamovibles, pues hay mucho más en este mundo por conocer.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Sandra Moreano, por todo su amor, fortaleza, y en especial por enseñarme que puedo lograr todo lo que me proponga.

A mi hermano Juan José quien me inspira siempre a ser mejor.

A mi tía Narcy por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi papá Juan por su apoyo.

A mis hermanas Karen y Josefa, quienes siempre han estado en mis mejores y peores momentos.

A mis abuelitos Piedad, Nena, Puri y Shalva; por su amor infinito.

A toda mi familia, a quienes les debo todo lo que soy ahora.

A mis amigos de la vida por demostrar que siempre hay una razón para sonreír.

A todos mis profesores, de quienes he aprendido tanto profesional como personalmente.

A mi directora de tesis, María Fernanda Pilaquinga con quien tuve la oportunidad de aprender muchas cosas. Gracias por su apoyo en este trabajo.

Al Dr. Alexis Debut del CENCINAT de la ESPE, por ayudarme con el análisis TEM.

A la Mtr. María Fernanda López de la PUCE-SI, por las muestras de la planta de chilca (*Baccharis latifolia*).

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 HISTORIA DE LA NANOCIENCIA.....	3
1.2 NANOTECNOLOGÍA.....	3
1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	5
1.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	5
1.4.1 APLICACIONES	6
1.4.2 TOXICIDAD	7
1.4.3 SÍNTESIS	9
1.5 PLANTA <i>Baccharis latifolia</i> (CHILCA).....	12
1.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	14
1.6.1 FLAVONOIDES	15
1.6.1.1 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	16
1.6.2 POLIFENOLES.....	17
1.6.2.1 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES	18
1.6.3 AZÚCARES REDUCTORES	18
1.7 MECANISMOS DE FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES	19
1.8 OBJETIVOS.....	20
1.8.1 GENERAL	20
1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO II.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTO	21
2.2 OPTIMIZACIÓN DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA...	22
2.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	23
2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA	24
2.4.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis	24
2.4.1.1 INSTRUMENTACIÓN.....	26
2.4.1.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	26

2.4.2	MICROSCOPIA DE TRANSICIÓN ELECTRÓNICA (TEM)	27
2.4.2.1	INSTRUMENTACIÓN.....	28
2.4.2.2	PREPARACIÓN DE MUESTRAS	28
2.5	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	29
2.5.1	ENSAYO DE SHINODA	29
2.5.2	PRUEBA DE CLORURO FÉRICO	29
2.5.3	ENSAYO DE FEHLING	30
2.6	ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	31
2.6.1	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis	31
2.6.1.1	ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	31
2.6.2	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	32
2.6.2.1	ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	32
2.6.3	EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y POLIFENOLES.....	33
2.6.3.1	LINEALIDAD	33
2.6.3.2	LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	34
2.6.3.3	EXACTITUD Y PRECISIÓN	35
CAPÍTULO III	36
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
3.1	PREPARACIÓN DEL EXTRACTO	36
3.2	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	38
3.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA	41
3.3.1	ESPECROFOTOMETRÍA UV-Vis.....	41
3.3.2	MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)	43
3.4	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	45
3.5	ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	49
3.5.1	FLAVONOIDES	49
3.5.2	POLIFENOLES.....	53
CAPÍTULO IV	57
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1	CONCLUSIONES	57
4.2	RECOMENDACIONES.....	58

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1 Taxonomía de la planta <i>Baccharis latifolia</i> (chilca)	13
TABLA 1.2 Ensayos de coloración del tamizaje fitoquímico para identificar metabolitos secundarios.....	14
TABLA 2.1 Condiciones para la optimización del método de preparación del extracto vegetal.....	22
TABLA 2.2 Condiciones para la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata	23
TABLA 2.3 Condiciones para la preparación de muestras del extracto vegetal y de la solución coloidal de nanopartículas de plata en la cuantificación de flavonoides	32
TABLA 2.4 Condiciones para la preparación de muestras del extracto vegetal y de la solución coloidal de nanopartículas de plata en la cuantificación de polifenoles	33
TABLA 3.1 Longitud de onda y absorbancia para determinar el extracto óptimo	37
TABLA 3.2 Condiciones óptimas para la preparación del extracto acuoso de las hojas de chilca	38
TABLA 3.3 Longitud de onda y absorbancia para determinar condiciones óptimas de la síntesis de nanopartículas de plata	40
TABLA 3.4 Condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata.....	41
TABLA 3.5 Valores de longitud de onda y absorbancia en las síntesis de nanopartículas de plata realizadas.....	42
TABLA 3.6 Tamaño de partícula en relación a la posición del pico de máxima absorción.....	43
TABLA 3.7 Pruebas de coloración del Tamizaje fitoquímico	45
TABLA 3.8 Datos de la curva de calibración de quercetina para cuantificar flavonoides	50
TABLA 3.9 Componentes de la curva de calibración (quercetina)	51
TABLA 3.10 Absorbancia de blancos para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación del método (flavonoides)	51
TABLA 3.11 Concentración de flavonoides en el extracto acuoso de las hojas de <i>Baccharis latifolia</i> (Chilca) y de la solución coloidal de nanopartículas de plata sintetizadas	52

TABLA 3.12 Datos de la curva de calibración de ácido gálico para cuantificar polifenoles	53
TABLA 3.13 Componentes de la curva de calibración (ácido gálico)	54
TABLA 3.14 Absorbancia de blancos para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación del método (polifenoles)	55
TABLA 3.15 Concentración de polifenoles en el extracto acuoso de las hojas de <i>Baccharis latifolia</i> (Chilca) y de la solución coloidal de nanopartículas de plata sintetizadas	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Tamaño de nanopartículas en relación a otros organismos	4
FIGURA 1.2 Esquema de la formación de nanopartículas de plata	10
FIGURA 1.3 Esquema de la síntesis verde de nanopartículas de plata	12
FIGURA 1.4 Planta <i>Baccharis latifolia</i> (Chilca).....	13
FIGURA 1.5 Estructura química de un flavonoide (quercetina).....	16
FIGURA 1.6 Estructura química de un tanino (ácido gálico)	17
FIGURA 1.7 Estructura química de un azúcar reductor (D-glucosa).....	19
FIGURA 1.8 Esquema de formación de nanopartículas de plata con polifenol como agente reductor	19
FIGURA 2.1 Esquema de espectrofotómetro UV-Vis.....	25
FIGURA 2.2 Esquema de un TEM	28
FIGURA 3.1 Extracto acuoso de las hojas de la planta <i>Baccharis latifolia</i> (Chilca).....	38
FIGURA 3.2 Solución coloidal de nanopartículas de plata.....	39
FIGURA 3.3 Espectro UV-Vis de la síntesis óptima de nanopartículas de plata..	42
FIGURA 3.4 Imagen TEM de nanopartículas de plata sintetizadas con condiciones óptimas.....	44
FIGURA 3.5 Histograma de frecuencias del tamaño de nanopartículas de plata.	44
FIGURA 3.6 Ensayo de Shinoda para determinar flavonoides. A) extracto acuoso de las hojas de la planta chilca B) solución coloidal de nanopartículas de plata	46
FIGURA 3.7 Reacción de quercetina para positivo en prueba de Shinoda.....	47
FIGURA 3.8 Ensayo de Cloruro Férrico para determinar polifenoles. A) extracto acuoso de las hojas de la planta chilca B) solución coloidal de nanopartículas de plata	47
FIGURA 3.9 Reacción de fenol con cloruro férrico para prueba de Cloruro Férrico.	48
FIGURA 3.10 Ensayo de Fehling para determinar azúcares reductores. A) extracto acuoso de las hojas de la planta chilca B) solución coloidal de nanopartículas de plata	48

- FIGURA 3.11 Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides en el extracto acuoso de las hojas de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca), y en la solución coloidal de nanopartículas de plata 50
- FIGURA 3 12 Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles en el extracto acuoso de las hojas de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca), y en la solución coloidal de nanopartículas de plata 53

ANEXOS

ANEXO 1 Certificado Taxonómico de la planta <i>Baccharis latifolia</i> (Chilca).....	65
ANEXO 2 Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos vegetales.....	66
ANEXO 3 Imagen TEM de nanopartículas óptimas obtenidas a partir del extracto vegetal de magnolia (<i>Pierre Magnol</i>).....	66
ANEXO 4 Cálculos para determinar la concentración de flavonoides con los datos obtenidos de la curva de calibración.....	67
ANEXO 5 Cálculos para determinar la concentración de polifenoles con los datos obtenidos de la curva de calibración.....	68

RESUMEN

En este estudio se sintetizaron nanopartículas de plata usando el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca), además se cuantificó el contenido de polifenoles y flavonoides en el extracto y nanopartículas obtenidas. En la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata se controlaron los siguientes parámetros: concentración de nitrato de plata, volumen de extracto acuoso vegetal, pH y tiempo de calentamiento en el microondas. Se utilizó el programa estadístico StatGraphics para determinar las condiciones óptimas en la síntesis de nanopartículas de plata, las cuales fueron: 20 mL de AgNO_3 1,54 mM, 1,29 mL de extracto vegetal, pH 8, por un tiempo de calentamiento de 49 s en el microondas a 1000 W. Para corroborar la correcta formación de nanopartículas de plata, así como para estimar su tamaño, las soluciones coloidales se analizaron por Espectrofotometría UV-Vis. El pico de absorción máxima promedio se registró a los 419 nm. El tamaño de las nanopartículas se confirmó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), con un resultado de $6,51 \pm 3,27$ nm. Para identificar el posible agente reductor en la formación de nanopartículas de plata, se realizó un tamizaje fitoquímico. Se desarrollaron las pruebas de coloración de Shinoda, Cloruro Férrico, y Fehling; para identificar flavonoides, polifenoles y azúcares reductores, respectivamente. Las pruebas de Shinoda y Cloruro Férrico fueron positivas mientras la prueba de Fehling fue negativa. En el análisis cuantitativo se obtuvo que el contenido de flavonoides fue de 328,12 mg/L, expresado como quercetina, en el extracto y de 250,13 mg/L en la solución coloidal de nanopartículas de plata. El contenido de polifenoles fue de 66,26 y 52,50 mg/L, expresado como ácido gálico, en el extracto y en la solución coloidal de nanopartículas respectivamente. La disminución de cada metabolito secundario confirma la reducción de iones plata en la reacción, por lo que se sugiere que los flavonoides y polifenoles actúan como agentes reductores en la formación de nanopartículas de plata. Se concluyó que se acondicionó un método fácil y rápido de obtención de nanopartículas de plata preparadas con el extracto acuoso vegetal de chilca (*Baccharis latifolia*).

Palabras clave: nanopartículas, plata, chilca (*Baccharis latifolia*), flavonoides, polifenoles, azúcares reductores.

ABSTRACT

In this study, silver nanoparticles were synthesized using the aqueous extract of chilca leaves (*Baccharis latifolia*), also the content of polyphenols and flavonoids in the extract and nanoparticles obtained were quantified. In the optimization of silver nanoparticle synthesis, several parameters were controlled, such as: silver nitrate concentration, volume of aqueous extract, pH and heating time. Using the statistical program StatGraphics, it was determined that the optimal conditions for the synthesis of silver nanoparticles were given when using: 20 mL of AgNO₃ 1,54 mM, 1,29 mL of plant extract, pH 8, heating for 49 s in the microwave at 1000 W. To corroborate the correct formation of silver nanoparticles, as well as to estimate their size, the colloidal solutions were analyzed by UV-Vis spectrophotometry. The average maximum absorption peak was recorded at 419 nm. The size of the nanoparticles was confirmed by Transmission Electron Microscopy (TEM), with a result of $6,51 \pm 3,27$ nm. To identify the possible reducing agent in the formation of silver nanoparticles, phytochemical screening was carried out. The colorimetric tests of Shinoda, Ferric Chloride, and Fehling were developed; to identify flavonoids, polyphenols and reducing sugars, respectively. Shinoda and Ferric Chloride tests were positive while the Fehling test was negative. Based on these results, in the quantitative analysis, the result was that the flavonoid content was 328,12 mg / L, expressed as quercetin, in the extract and 250,13 mg / L in the colloidal solution of nanoparticles of silver. The polyphenol content was 66,26 and 52,50 mg / L, expressed as gallic acid, in the aqueous extract and in the colloidal solution of nanoparticles respectively. The decrease of each secondary metabolite confirms the reduction of silver ions in the reaction, so it is suggested that flavonoids and polyphenols act as reducing agents in the formation of silver nanoparticles. It was concluded that an easy and fast method of obtaining silver nanoparticles prepared with the aqueous vegetable extract of chilca (*Baccharis latifolia*) was conditioned.

Key words: nanoparticles, silver, chilca (*Baccharis latifolia*), flavonoids, polyphenols, reducing sugars..

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA DE LA NANOCIENCIA

La nanociencia se basa en el estudio de fenómenos y en la manipulación de materiales a escala nanométrica, La nanotecnología es una rama de la nanociencia, la cual diseña y caracteriza estructuras para aprovechar las propiedades de un material, y ha tenido un crecimiento importante en los últimos años. Se ha llegado a tener una gran cantidad de aplicaciones en cuanto a esta rama de la ciencia. Sin embargo, la nanotecnología se la viene utilizando desde muchos años atrás, sin siquiera saber que se la utilizaba (Greenberg, 2009).

Un ejemplo del uso de la nanotecnología en la antigüedad es el azul de maya, esta pintura utilizaba la cultura Maya en el siglo IX ya que era una pintura duradera para cubrir las paredes de sus palacios, los códices, la cerámica y tal vez incluso los cuerpos de los sacrificios humanos que fueron arrojados a su muerte por los pozos sagrados (De Agredos Pascual, 2007). De igual manera se ha encontrado evidencia del uso de nanotecnología en la cultura romana, la cual utilizaba nanopartículas de oro y plata para dar color a sus artesanías. Un ejemplo de esto es la Copa Lycurgus en el siglo IV (Gamo-Aranda & Sánchez, 2015).

Sin embargo, se empieza a utilizar el término de nanociencia en 1959 gracias a Richard Feynman, quien era un físico que habla sobre la posibilidad de fabricar materiales muy pequeños a partir de átomos. Este científico planteó sus descubrimientos e ideas mediante su conferencia "There is plenty room at the bottom". A partir de esto se introduce el término de "nanotecnología", y se empiezan a fabricar equipos utilizando leyes cuánticas (Madden, 2011).

1.2 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología se basa en la manipulación de átomos y moléculas, para producir materiales a un nivel nanométrico (10^{-9} m). La fabricación de estos

materiales implican conocimientos físicos, químicos y biológicos; los cuales son aplicados conjuntamente para usarlos en varios campos de investigación y tecnología (Adams & Barbante, 2013). La nanotecnología es actualmente utilizada en los campos de medicina, cosmética, ingeniería, biología, biomedicina, agricultura y alimentos (Fulekar, 2010).

El uso de nanopartículas ha sido aplicado de una manera tan amplia, que existen ya dos técnicas para la síntesis de nanoestructuras: top down (de abajo hacia arriba) y bottom up (de arriba hacia abajo) (Verma, Gokhale & Burgess, 2009). Cuando se habla de top down básicamente se trata de litografía y grabado, en el cual el material es moldeado hasta alcanzar un tamaño nanométrico y la estructura deseada (Tiwari, Behari, & Sen, 2008). El bottom up trata en cambio, de un ensamblaje de nanopartículas hasta obtener el producto final deseado. Generalmente se obtienen estructuras más pequeñas utilizando la técnica de bottom up (Magasinski *et al*, 2010).

Varios materiales nanométricos son empleados para en la nanotecnología, un ejemplo son los fullerenos y los nanotubos de carbono, tal como se observa en la Figura 1.1. Estas estructuras, compuestas por carbono, tienen la facilidad de adoptar una forma geométrica (fullereno) o cilíndrica (nanotubo); la cual proporciona ciertas propiedades físicas y químicas que los vuelve materiales muy útiles al momento de sintetizar nuevos compuestos (Dresselhaus, Dresselhaus & Eklund, 1996).

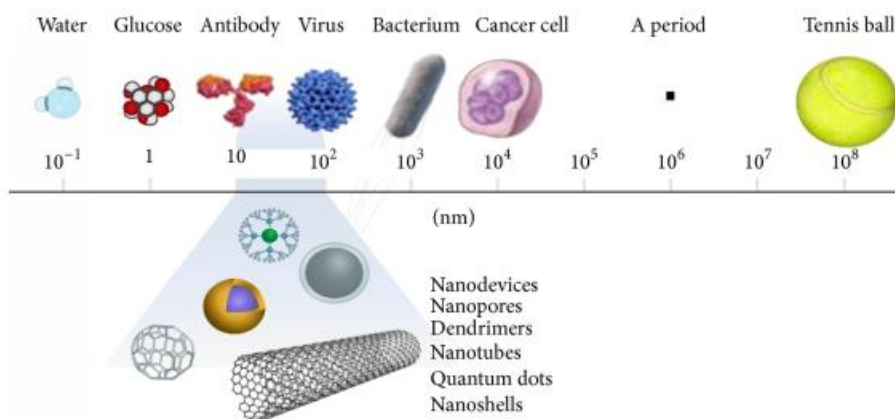


FIGURA 1.1 Tamaño de nanopartículas en relación a otros organismos

1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las nanopartículas metálicas tienen varias aplicaciones en: electrónica, cosmética, revestimientos, empaques y biotecnología (Fedlheim & Foss, 2001). La síntesis de nanopartículas metálicas es de suma importancia en la academia debido a que genera nuevas investigaciones y aplicaciones en nanotecnología (Thakkar, Mhatre, & Parikh, 2010). En la actualidad las nanopartículas de hierro, plata, oro, zinc y cobre son las más estudiadas gracias a sus propiedades ópticas, electrónicas y antibacterianas (Vijay, Pammi, Kollu, Satyanarayana & Shameem, 2014).

1.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado tener excelentes propiedades antimicrobianas. Se sabe que la plata presenta una fuerte toxicidad a una amplia gama de microorganismos, al igual sus iones, sales y compuestos. Todos estos compuestos de plata muestran su efecto biocida en un gran número de especies de bacterias, incluyendo la *E. Coli* (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). En la actualidad, la plata coloidal presenta un gran interés debido a sus propiedades como: buena conductividad, estabilidad química, actividad catalítica y antibacteriana (Sharma, Yngard & Lin, 2009). Se ha comprobado que la reducción del tamaño de partícula de los materiales es una forma eficiente para mejorar la biocompatibilidad de los mismos. Gracias a esto, se han realizado varios estudios sobre síntesis de nanopartículas de plata y su aplicación en el campo de medicina al fabricar material médico (Kim, 2007). El método más usado para la para la preparación de nanopartículas de plata es la reducción química, usando dispersiones coloidales en agua o disolventes orgánicos. Los reductores químicos más comunes son el borohidruro de sodio, citratos y ascorbatos e hidrógeno (Sharma, Yngard & Lin, 2009).

1.4.1 APLICACIONES

Las AgNPs han sido ampliamente utilizadas en el área de la salud, almacenamiento de alimentos, recubrimiento de textiles, y para aplicaciones ambientales; debido a su gran capacidad antimicrobiana. Productos que han sido elaborados con AgNPs han llegado a ser aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la La Alianza Nacional de Agencias Independientes (SIAA); llegando así a ser usados como agentes antimicrobianos para la desinfección de dispositivos médicos y de electrodomésticos. Las nanopartículas de plata también han sido usadas en el tratamiento de agua para que pueda ser potable. En cuanto al área textil, se las han utilizado en algunos tipos de tejidos como el algodón, y se demostró que las fibras que contienen AgNPs en su estructura, presentan actividad antibacteriana contra el *Escherichia coli* (El-Nour, Eftaiha, Al-Warthan & Ammar, 2010).

Se ha descubierto que gracias a las propiedades electroquímicas de las AgNPs se las puede incorporar a sensores a nanoescala, lo cual implica un tiempo de respuesta más rápido a los mismos, así como límites de detección más bajos. Mientras que la electrodeposición de nanopartículas de plata sobre placas de alúmina en un electrodo de oro, presenta una alta sensibilidad al peróxido de hidrógeno (Abbasi *et al*, 2016).

Las nanopartículas de plata también pueden ser usadas como catalizadores. Se ha encontrado que la actividad catalítica de las mismas, difieren de las propiedades que presentan los materiales a granel. Se demostró que el blanqueamiento de los tintes orgánicos, usando peroxodisulfato de potasio, es mucho más efectivo con la incorporación de nanopartículas de plata en la solución (Köhler, Abahmane, Wagner, Albert & Mayer, 2008). Además, las AgNPs tienen la capacidad de catalizar la quimioluminiscencia en el sistema de peróxido de hidrógeno con luminol, presentando una mejor actividad catalítica que la solución coloidal de Au y Pt (Li, Liu & Cui, 2014).

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas dependen de su resonancia en el plasmón superficial. El plasmón se refiere a la oscilación colectiva de los electrones que se encuentran libres dentro de la nanopartícula. Los picos resonantes y los anchos de línea del plasmón son sensibles al tamaño y a la forma de la nanopartícula metálica. Es gracias a esto, que se puede introducir la idea de un nanocluster (compuesto de 2 a 8 átomos de plata) como un nuevo tipo de almacenamiento óptico de datos. De igual manera, estos clousters de plata, podrían utilizarse en etiquetas biológicas y en pantallas electroluminiscentes (Díez & Ras, 2011).

1.4.2 TOXICIDAD

Las nanopartículas de plata son excelentes candidatas para usarlas diariamente en el campo de la medicina como productos antimicrobianos y antiinflamatorios gracias a sus particulares propiedades físicas y químicas. Sin embargo, existen estudios que sugieren que las nanopartículas de plata pueden causar efectos adversos tanto en los seres humanos como en el medio ambiente (Tran, & Le, 2013). Se ha logrado demostrar que las AgNPs no pueden diferenciar las distintas cepas de bacterias, por lo que pueden destruir aquellos microbios que son beneficiosos para la salud y la ecología. Se han realizado pocos estudios sobre la toxicidad de la nanoplata, y uno de estos dice que las nanopartículas son tóxicas en las células de hígado de rata, inclusive la baja exposición de las mismas causa un estrés oxidativo en las células generando un deterioro en la función mitocondrial causando fugas a través de las membranas celulares. Se presume que los agregados de nanoplata pueden ser más tóxicos que el asbesto (Faunce & Watal, 2010).

En la actualidad, se liberan toneladas de plata en el medio ambiente a partir de desechos industriales. Se cree que la toxicidad de la plata es producida gracias a los iones de plata que se encuentran libres en la fase acuosa. Los efectos adversos de estos iones incluyen la argiria (decoloración gris azulada de la piel), y la argirosis (decoloración gris azulada de los ojos). De igual manera, se ha encontrado que la exposición continua a compuestos de plata solubles, puede producir: daño hepático y renal; irritación de los ojos, piel, vías respiratorias y

tracto intestinal; y cambios en la composición de las células sanguíneas (Chae, Pham, Lee, Bae, Yi & Gu, 2009).

Existen pruebas que muestran que los iones de plata producen cambios en cuanto a la permeabilidad de la membrana celular con el potasio y con los iones de sodio. De igual manera, se ha podido demostrar que las nanopartículas de plata pueden causar efectos tóxicos en la proliferación de citoquinas por las células mononucleares de la sangre periférica. Algunos estudios exhiben que la nanoplata tiene efectos tóxicos severos en el sistema reproductor masculino, afectando a las células espermáticas. Inclusive se ha comprobado que apósitos a base de plata, que se encuentran comercialmente disponibles, presentan efectos citotóxicos en varios modelos experimentales (Golovina & Kustov, 2013).

Se han realizado estudios *in vivo* sobre la toxicidad de la nanoplata en ratas y se muestra que las nanopartículas afectan al hígado de las mismas, así como también existe un mayor índice de hiperplasia del conducto biliar, fibrosis y pigmentación. Los estudios sugieren que hay una mayor liberación de plata cuando las nanopartículas son almacenadas por un largo periodo de tiempo, por lo que se puede decir que la nanoplata envejecida es más tóxica que la nueva (Levard, Hotze, Lowry & Brown Jr, 2012). Otras pruebas sobre la toxicidad fueron realizadas en otros animales de laboratorio como ratones y en conejillos de india, siguiendo las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). Se encontró que la administración oral en dichos animales, de hasta 5000 mg/kg de peso corporal no produce su muerte ni muestran signos de intoxicación. De todas formas, al estar expuesto a una dosis mayor a los 5000 mg/kg de peso corporal se empieza a observar cambios histopatológicos en varios órganos de los animales, pudiendo así causar la muerte. El ensayo mostró que el DL_{50} de AgNPs es superior a 5000 mg/kg de peso corporal (Maneewattanapinyo, Banlunara, Thammacharoen, Ekgasit & Kaewamatawong, 2011).

La actividad antimicrobiana que presentan las AgNPs, puede obstaculizar el crecimiento de muchas bacterias que son esenciales en el suelo. La plata puede interrumpir el proceso de conversión de nitratos en gas nitrógeno, lo cual

es vital para las plantas. Esto puede causar la falta de eutrofización de ríos, lagos y ecosistemas marinos. La plata tiene efectos tóxicos en animales acuáticos ya que los iones de plata pueden interactuar con las branquias de los peces, impidiendo el intercambio de Na^+ , K^+ , y ATPasa; lo que impide la osmorregulación en los peces (Prabhu & Poulouse, 2012).

1.4.3 SÍNTESIS

Los métodos para la síntesis de nanopartículas de plata pueden ser químicos, físicos, fotoquímicos y biológicos. Cada uno de los métodos tiene ventajas y desventajas en cuanto a costo, escala, y el tamaño y la dispersión de las nanopartículas (Tran & Le, 2013). De los métodos anteriormente mencionados, los químicos son los más utilizados ya que proporcionan una manera sencilla de síntesis de AgNPs en solución. Se pueden sintetizar grandes cantidades de nanocubos de plata, al reducir nitrato de plata con etilenglicol en presencia de polivinilpirrolidina (PVP), proceso conocido como poliol. El etilenglicol actúa como reductor y como disolvente, mientras que la presencia de PVP, y su relación molar con el nitrato de plata, desempeñan un papel fundamental para lograr la forma geométrica y el tamaño de las nanopartículas deseadas. El tamaño de nanocubos de plata se puede controlar modificando las condiciones experimentales. También es posible la síntesis de nanopartículas de plata esféricas, con tamaño controlable y una alta monodispersidad, utilizando el proceso de poliol conjuntamente con una técnica de inyección precursora modificada. Al controlar las variables: velocidad de inyección y temperatura de reacción, en el método de inyección precursora modificada, se pueden obtener nanopartículas de 17 nm ya que se induce una nucleación rápida en un periodo de tiempo corto (Prabhu & Poulouse, 2012).

Para la síntesis de nanopartículas de plata, por métodos químicos, se emplean 3 componentes: precursor de metales (AgNO_3), agente reductor (NaBH_4 , etilenglicol, glucosa) y agente estabilizador (acetato de polivinilo PVA, polivinilpirrolidona PVP, oleato de sodio). En cuanto a la formación de soluciones coloidales a partir de la reducción de sales de plata, se producen 2 etapas: nucleación y crecimiento de los núcleos tal como se muestra en la Figura 1.2. El

tamaño y la forma de las AgNPs dependen de éstas. Además, para que todas las nanopartículas tengan un tamaño uniforme se requiere que los núcleos se formen al mismo tiempo. La nucleación inicial y el crecimiento de los núcleos se pueden controlar ajustando los parámetros de reacción, tales como: temperatura de reacción, pH, concentración de precursores, agentes reductores y agentes estabilizadores (Tran & Le, 2013).

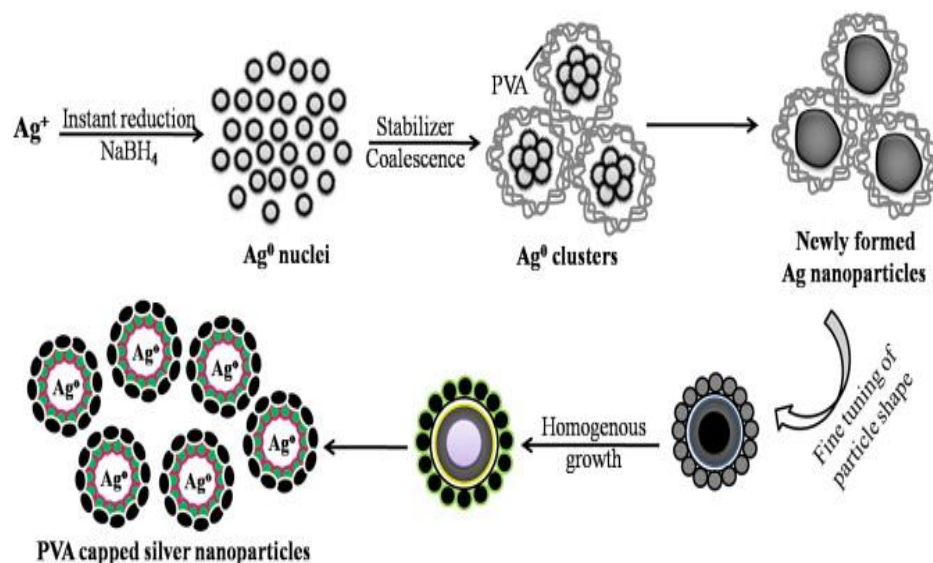


FIGURA 1.2 Esquema de formación de nanopartículas de plata

Los métodos físicos para la síntesis de AgNPs son generalmente realizados por evaporación-condensación (Iravani, Korbekandi, Mirmohammadi & Zolfaghari, 2014). Se utilizan: hornos tubulares a presión atmosférica, descomposición térmica para sintetizar nanopartículas de plata en forma de polvo, el método de descarga de arco para fabricar la suspensión de AgNPs en agua desionizada sin tensoactivos añadidos, entre otros. Para los procesos de síntesis física de nanopartículas de plata se utilizan energías físicas (térmica, potencia continua y alterna CA, descarga de arco). Se deben considerar significativamente los costos primarios en cuanto a la inversión del equipo para la síntesis de nanopartículas de plata (Panáček *et al*, 2006).

La síntesis de nanopartículas de plata por procesos biológicos tiene como objetivo el de cambiar los reactivos utilizados en la síntesis química con otro tipo de sustancias que puedan desempeñar el mismo rol. La "síntesis verde" de nanopartículas de plata, en la cual se utilizan extractos de plantas, ha ganado un gran interés en los últimos años. Este tipo de síntesis es eficiente tanto en términos de tiempo de reacción, como de estabilidad de las nanopartículas que excluyen a agentes químicos tóxicos (Ramya & Subapriya, 2012). La síntesis verde es un método sencillo, el cual se lleva a cabo por reducción química usando nitrato de plata como precursor con una entidad biológica como agente reductor, como se muestra en la Figura 1.3. Otros factores como una fuente de energía y pH, pueden ser usados para facilitar la reacción. Se han utilizado un sinnúmero de plantas como estabilizadores para la síntesis de nanopartículas en muchas investigaciones (Kaler, Patel, & Banerjee, 2010), y se cree que la reducción y estabilización de los iones de plata es facilitada por la combinación de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, enzimas, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, saponinas, terpenoides, cetonas, aldehídos, amidas, ácidos carboxílicos, esteroides, sapogeninas, carbohidratos, flavonoides y vitaminas. Los flavonoides, los ácidos orgánicos y las quinonas son fitoquímicos solubles en agua, y estos compuestos son los responsables de la reducción inmediata de los iones de plata (Sanjukta, R. K., 2016). Se presume que los flavonoides, polifenoles y azúcares reductores, son los metabolitos fitoquímicos responsables de la reducción química al momento de sintetizar nanopartículas de plata con extractos vegetales. Todos estos presentan actividades antioxidantes, lo cual favorece a la reacción de formación de las nanopartículas (Mallikarjuna *et al*, 2011).

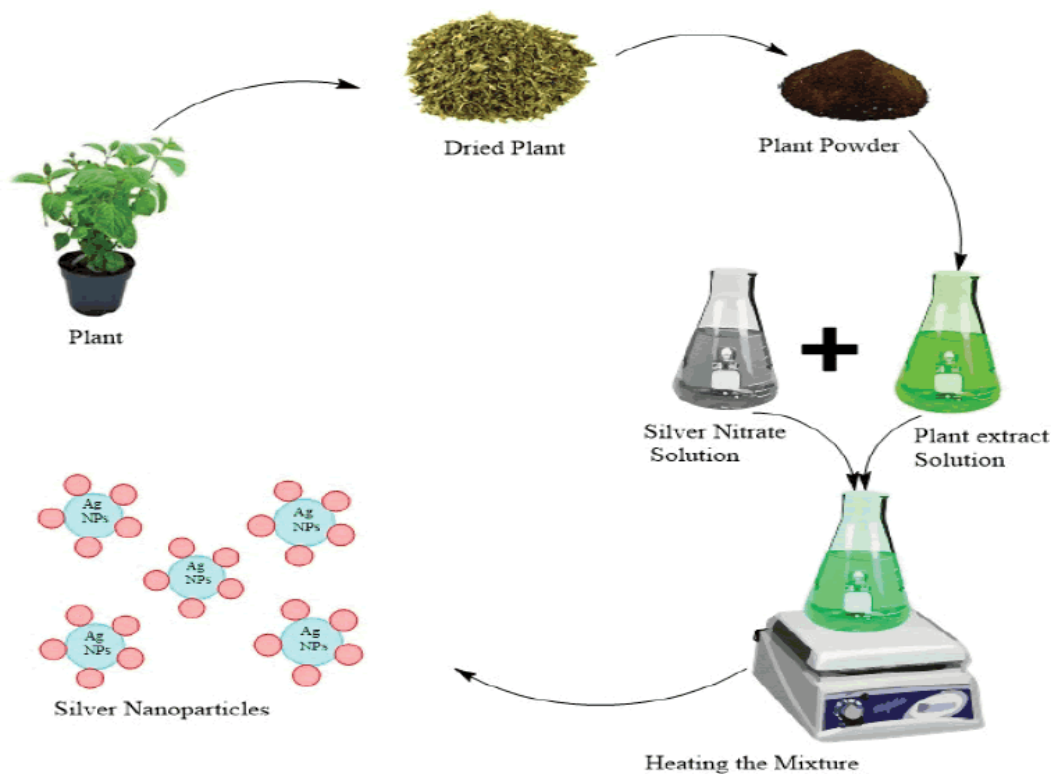


FIGURA 1.3 Esquema de síntesis verde de nanopartículas de plata

1.5 PLANTA *Baccharis latifolia* (CHILCA)

El Ecuador posee una gran variedad de plantas que son utilizadas con fines medicinales gracias a sus actividades antiinflamatorias y antioxidantes (De las Heras, Slowing, Benedi, Carretero, Ortega, Toledo & Liso, 1998). *Baccharis latifolia*, comúnmente conocida como chilca (especie de la familia Asteraceae, del género *Baccharis*), es una planta que se encuentra en el Ecuador y está ampliamente distribuida en las provincias andinas de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua y Zamora Chinchipe. La taxonomía de la chilca se puede apreciar en la Tabla 1.1.

TABLA 1.1 Taxonomía de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Astereae
Género	Baccharis
Especia	B. latifolia

Se considera a la chilca como un árbol o arbusto, con ramas verticiladas, que puede alcanzar los 2 m de alto y 3 de ancho. Sus hojas son elípticas, acuminadas y brillantes; y miden de 10 a 20 cm de largo. En la Figura 1.4 se puede apreciar las hojas de la chilca, con las características previamente mencionadas. La chilca se ha utilizado en la medicina tradicional para tratar el dolor de estómago, fracturas, gangrena, reumatismo, problemas hepáticos y renales; y como antiinflamatorio (Valarezo, Rosillo, Cartuche, Malagón, Meneses, & Morocho, 2013).

**FIGURA 1.4** Planta *Baccharis latifolia* (Chilca)

1.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico se refiere a la extracción, cribado e identificación de grupos químicos que se encuentran en las plantas, mediante ensayos de coloración. Estos grupos químicos son denominados metabolitos secundarios ya que no intervienen en las funciones vitales de las plantas. Algunas de las sustancias bioactivas que pueden derivarse de las plantas son los flavonoides, alcaloides, carotenoides, taninos, antioxidantes y compuestos fenólicos; y para cada uno de ellos existe una prueba de coloración por la cual se los puede identificar tal como se muestra en la Tabla 1.2 (Farnsworth, 1966).

TABLA 1.2 Ensayos de coloración del tamizaje fitoquímico para identificar metabolitos secundarios

Metabolito Secundario	Ensayo
Triterpenos	Liebermann-Buchard
Alcaloides	Dragendorf
Cumarinas	Baljet
Azúcares reductores	Fehling
Polifenoles/ taninos	Cloruro Férrico
Flavonoides	Shinoda

El tipo de solvente que se utiliza para extraer los metabolitos secundarios necesarios para el tamizaje se seleccionan de acuerdo a su polaridad. Se utiliza un extracto etéreo para compuestos liposolubles como aceites esenciales, ya que este solvente es de tipo no polar. El extracto alcohólico es ideal para taninos, flavonoides, quinonas y cumarinas; ya que el solvente utilizado corresponde a alcoholes de bajo peso molecular (metanol y etanol), los cuales contienen grupos funcionales polares (hidroxilo). Mientras que el extracto acuoso contiene compuestos hidrosolubles, tales como flavonoides, taninos y azúcares reductores; ya que tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno (Farnsworth, 1966).

La composición fitoquímica del género *Baccharis* ha sido ampliamente estudiada. Actualmente, se han logrado aislar e identificar más de 150 compuestos de este género. Los compuestos que predominan en la chilca son los diterpenoides, compuestos fenólicos y aceites esenciales. Sin embargo se han encontrado que compuestos como: cumarinas y derivados fenólicos simples, también la constituyen (Abad, & Bermejo, 2007).

Este estudio pretende identificar los metabolitos secundarios responsables de la reducción química al momento de sintetizar nanopartículas de plata usando extractos acuosos de plantas. Es por esto que los ensayos del tamizaje fitoquímico de interés son: Shinoda, para la identificación de flavonoides; Cloruro Férrico, para polifenoles; y Fehling, para azúcares reductores.

1.6.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides son sustancias fenólicas, los cuales se encuentran en algunas plantas vasculares. Comúnmente presentan una cetona en su estructura y se caracterizan porque poseen pigmentos de color amarillo, gracias al cual reciben su nombre (*Flavus* en latín significa amarillo). Actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atrectores visuales, repelentes de alimentación y para la detección de luz en la fotosíntesis. Se ha encontrado que los flavonoides poseen actividades biológicas, las cuales incluyen funciones antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadoras. La función más importante de los flavonoides es su actividad antioxidante, ésta se debe a su gran capacidad para reducir o evitar la formación de radicales libres. La mayoría de los flavonoides tienden a degradarse en ácidos fenólicos, los cuales poseen cierta capacidad para eliminar radicales libres (Pietta, P. G., 2000). La quercetina es el flavonol más habitual en la dieta humana y se encuentra presente en la mayoría de plantas, frutas y verduras. En la Figura 1.5 se puede observar que se encuentra unida a azúcares formando glucósidos (García & Carril, 2011)..

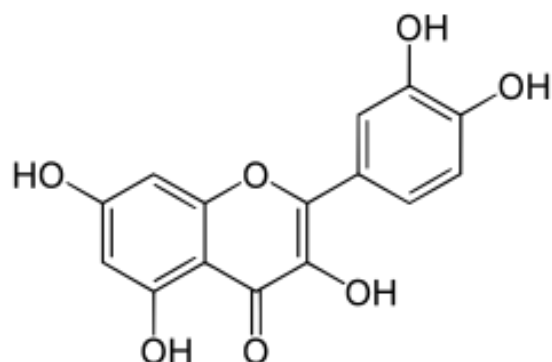


FIGURA 1.5 Estructura química de un flavonoide (quercetina)

1.6.1.1 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

En la actualidad, se han encontrado 2 métodos para la cuantificación de flavonoides: método de tricloruro de aluminio y método de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

- El método de tricloruro de aluminio se basa en que el aluminio tiene la facilidad de formar complejos estables con flavonoides en metanol. El complejo formado presenta una coloración amarilla, y su cuantificación se la realiza con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 374,5 nm. El contenido de flavonoides totales se lo expresa como quercetina.

- El método de 2,4-dinitrofenilhidrazina se fundamenta en la acción de los flavonoides con la 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar un complejo de color naranja. La reacción se produce en metanol, ya que éste ayuda a conservar la estructura de los flavonoides, y se utiliza hidróxido de potasio para aumentar la estabilidad de los mismos. El contenido de flavonoides se expresa como naringenina a una longitud de onda de 495 nm, medido en un espectrofotómetro (Chang, Yang, Wen & Chern, 2002).

1.6.2 POLIFENOLES

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y generalmente están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta y en la agresión por patógenos. Se caracterizan por presentar más de un grupo fenol en cada molécula. Generalmente se los subdivide en taninos hidrolizables, fenilpropanoides y taninos condensados. Se han identificado más de 8,000 compuestos polifenólicos en varias especies de plantas. Principalmente se presentan los polifenoles en formas conjugadas, con residuos de azúcares unidos a grupos hidroxilo, aunque también existen enlaces directos del azúcar (polisacárido o monosacárido) a un carbono aromático (Pandey, & Rizvi, 2009). Los taninos condensados son flavonoides responsables de la pigmentación de semillas y hojas de las plantas. Los fenilpropanoides son hidrocarburos aromáticos, la lignina es el principal ejemplo que se encuentra en el mundo vegetal y se encuentra principalmente en la madera. Los taninos hidrolizables son polímeros formados por ácidos fenólicos y son hidrolizados con una gran facilidad. El ácido gálico es el tanino hidrolizable más abundante en la naturaleza ya que se encuentra en hojas de té y otras plantas. la presencia de grupos hidroxilo en su estructura (Figura 1.6) permite que actúe como antiinflamatorio y como antioxidante (García & Carril, 2011).

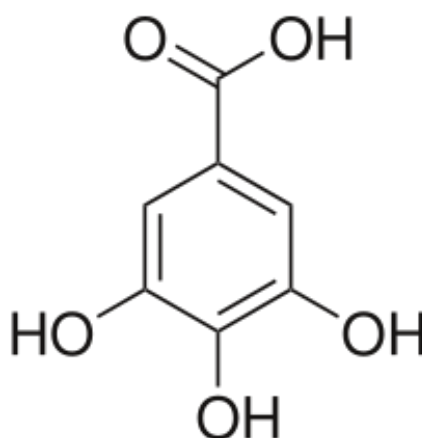


FIGURA 1.6 Estructura química de un tanino (ácido gálico)

1.6.2.1 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES

En la actualidad, se han encontrado 2 métodos para la cuantificación de polifenoles: el método de Folin-Ciocalteu y el método de Price y Butler.

- El método de Folin-Ciocalteu se basa en la reacción del ion fenolato con el reactivo de Folin Ciocalteu. Este reactivo es la mezcla de tungstato sódico y molibdato sódico; y tiene un color amarillo fosforescente. Estos compuestos actúan como agentes oxidantes. Mediante la reducción del complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, se produce el cambio de color amarillo a azul gracias a la transferencia de electrones. Se miden los polifenoles totales mediante espectrofotometría a 765 nm, y el contenido se expresa en ácido gálico.
- El método de Price y Butler se fundamenta en la reacción REDOX del ion fenolato y el ion férrico. El ion fenolato se oxida, mientras el ion férrico se reduce a ion ferroso formando un complejo de color azul con la ayuda del ferricianuro de potasio. El complejo formado se conoce como azul de Prusia. Se determina la cantidad de polifenoles mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 720 nm, y el contenido se expresa como ácido gálico (Ricco, Agudelo & Wagner, 2015).

1.6.3 AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo en su estructura. Este grupo puede actuar como aldehído o como cetona, según su ubicación en la estructura principal del azúcar. Se lo conoce como azúcar reductor debido a su capacidad de reducir otros compuestos, esto ocurre gracias a la alta reactividad del doble enlace del oxígeno como se muestra en la Figura 1.7 (Panigrahi, Kundu, Ghosh, Nath & Pal, 2004). Los azúcares vegetales juegan un papel importante en los procesos fotosintéticos que realiza la planta, y estos son los encargados de proporcionar energía a la misma. Al igual que el agua, el azúcar se transporta a través de la planta por un sistema vascular. El azúcar generalmente se encuentra en forma de sacarosa, sin embargo el producto fotosintético original es la glucosa (Hassid, 1936).

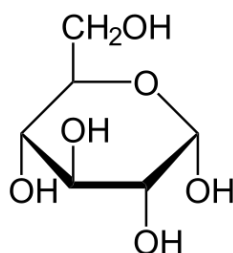


FIGURA 1.7 Estructura química de un azúcar reductor (D-glucosa)

1.7 MECANISMOS DE FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES

La presencia de metabolitos secundarios en las plantas permite sustituir algunos reactivos utilizados en síntesis comunes de nanopartículas de plata. Se sabe que las plantas contienen flavonoides, polifenoles, azúcares reductores, entre otros; los cuales presentan al grupo hidroxilo como un grupo químico común en sus estructuras. Es por esto que se supone que los metabolitos secundarios actúan como agentes reductores en la formación de nanopartículas de plata. El grupo hidroxilo (OH^-) tiene la capacidad de unirse a la plata (Ag^+) que proviene de la disociación del nitrato de plata. Los grupos hidroxilo provocan la reducción de Ag^+ a Ag^0 , los cuales forman un complejo y ayudan al crecimiento de las nanopartículas de plata (Jafar, Naeem, Hassan, Kifayatullah & Gang, 2017). El esquema de formación de nanopartículas se puede apreciar en la Figura 1.8.

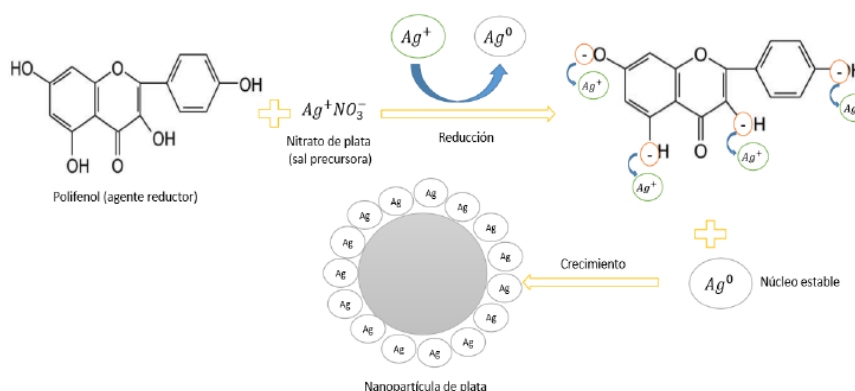


FIGURA 1.8 Esquema de formación de nanopartículas de plata con polifenol como agente reductor (Amaguaña, 2018)

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 GENERAL

Sintetizar nanopartículas de plata utilizando como agente reductor los flavonoides, polifenoles y azúcares reductores presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca), comparándolos cualitativa y cuantitativamente en la muestra vegetal y solución coloidal obtenida.

1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el método síntesis de nanopartículas de plata por asistida de microondas, variando parámetros de: concentración de nitrato de plata, volumen de extracto, pH y tiempo.
- Caracterizar las nanopartículas de plata por Espectroscopía UV-Vis y Microscopia Electrónica de Transición (TEM, por sus siglas en inglés).
- Realizar el tamizaje fitoquímico con pruebas cualitativas para identificar la presencia de flavonoides, polifenoles y azúcares reductores en el extracto vegetal y en las soluciones coloidales de nanopartículas de plata por ensayos de coloración.
- Cuantificar el contenido de flavonoides, polifenoles, y azúcares reductores en el extracto vegetal y en las soluciones coloidales de nanopartículas de plata por Espectrofotometría UV-Vis.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTO

La planta de *Baccharis latifolia* (Chilca) fue recolectada, secada y pulverizada por el personal del herbario de la PUCE sede Ibarra. El certificado de Taxonómico de la especie se encuentra en el Anexo 1. Las condiciones óptimas para la preparación de extracto vegetal se eligieron usando el programa StatGraphics con clase de diseño factorial multinivel, tal como se muestra en la Tabla 2.1, siguiendo el protocolo propuesto por Jaiswal *et al.* (2010). En cada una de las 36 muestras preparadas se pesó la cantidad de hojas de chilca en un Erlenmeyer de 100 mL, se agregó 20 mL de agua destilada, y posteriormente se agitó y calentó la mezcla a diferentes tiempos y temperaturas usando una plancha de calentamiento con agitación de marca Velp.

Para la preparación del extracto vegetal, se pesó 0,63 g de hojas de chilca para obtener una concentración de 0,03 g/mL y se agregó 20 mL de agua destilada en un Erlenmeyer de 100 mL. La mezcla se agitó en un agitador magnético de marca Boeco por 60 minutos a temperatura ambiente (20°C). Finalmente, el extracto se filtró al vacío y se almacenó en un recipiente ámbar a 4°C para posteriores análisis.

TABLA 2.1 Condiciones para la optimización del método de preparación del extracto vegetal

Muestra #	Bloque	Masa vegetal (g)	t (min)	T (°C)	Muestra #	Bloque	Masa vegetal (g)	t (min)	T (°C)
1	1	0,5	40	45	19	2	0,5	60	20
2	1	1,0	20	20	20	2	1,0	40	20
3	1	0,5	20	70	21	2	1,0	60	45
4	1	1,0	60	20	22	2	1,0	60	20
5	1	0,5	40	70	23	2	1,0	40	45
6	1	0,5	60	45	24	2	0,5	20	45
7	1	1,0	40	45	25	2	1,0	40	70
8	1	1,0	20	45	26	2	0,5	20	70
9	1	0,5	20	20	27	2	0,5	60	45
10	1	0,5	20	45	28	2	1,0	60	70
11	1	0,5	60	70	29	2	1,0	20	20
12	1	0,5	60	20	30	2	0,5	40	45
13	1	1,0	20	70	31	2	0,5	40	20
14	1	0,5	40	20	32	2	0,5	60	70
15	1	1,0	40	70	33	2	0,5	20	20
16	1	1,0	60	45	34	2	0,5	40	70
17	1	1,0	60	70	35	2	1,0	20	45
18	1	1,0	40	20	36	2	1,0	20	70

2.2 OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó vía microondas en un equipo de marca Indurama MWI 28BL, usando el protocolo propuesto por Pal *et al.* (2009). Los parámetros a optimizar fueron: concentración de nitrato de plata, volumen de extracto vegetal, pH y tiempo de calentamiento en el microondas.

Para la optimización del método se utilizó el programa StatGraphics con una clase de diseño de cribado, tal como se muestra en la Tabla 2.2.

TABLA 2.2 Condiciones para la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata

Muestra #	Volumen extracto (mL)	Concentración AgNO ₃ (mM)	pH	t (s)	Muestra #	Volumen extracto (mL)	Concentración AgNO ₃ (mM)	pH	t (s)
1	2,00	2,00	10	120	19	2,00	2,00	10	120
2	0,50	2,00	10	120	20	0,50	2,00	10	120
3	0,50	0,50	10	30	21	0,50	0,50	10	30
4	2,00	0,50	7	120	22	2,00	0,50	7	120
5	0,50	2,00	10	30	23	0,50	2,00	10	30
6	2,00	0,50	10	120	24	2,00	0,50	10	120
7	0,50	0,50	10	120	25	0,50	0,50	10	120
8	0,50	0,50	7	30	26	0,50	0,50	7	30
9	2,00	2,00	7	120	27	2,00	2,00	7	120
10	0,50	2,00	7	120	28	0,50	2,00	7	120
11	1,25	1,25	8	75	29	1,25	1,25	8	75
12	2,00	2,00	10	30	30	2,00	2,00	10	30
13	2,00	0,50	10	30	31	2,00	0,50	10	30
14	0,50	2,00	7	30	32	0,50	2,00	7	30
15	1,25	1,25	8	75	33	1,25	1,25	8	75
16	2,00	2,00	7	30	34	2,00	2,00	7	30
17	0,50	0,50	7	120	35	0,50	0,50	7	120
18	2,00	0,50	7	30	36	2,00	0,50	7	30

2.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Con las condiciones óptimas escogidas previamente se realizó la síntesis de nanopartículas de plata según el protocolo propuesto por Sharma *et al.* (2009). Se preparó una solución de nitrato de plata 1,54 mM utilizando un reactivo de marca Merck 99.9% de pureza. Se tomó 20 mL de la solución de nitrato de plata y se agregó 1,29 mL del extracto acuoso de las hojas de chilca en un Erlenmeyer de 100 mL. Se ajustó el pH hasta 8, añadiendo 4 gotas de NaOH 1%. Se introdujo la disolución en el microondas y se calentó la muestra por 49 s a una potencia de 1000 Watts. La solución coloidal se enfrió en un baño de hielo y se la almacenó en un frasco ámbar a 4°C.

2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Para la caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas, se empleó la técnica de Espectrofotometría UV-Vis. Para la determinación del tamaño de las nanopartículas, se utilizó la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión TEM (Transmission electron microscopy) por sus siglas en inglés.

2.4.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis

Las nanopartículas de plata presentan un color marrón-amarillento cuando se encuentran en medio acuoso debido a las vibraciones superficiales del plasmón, absorbiendo a una longitud de onda entre los 425 nm. Gracias a esto, es posible caracterizarlas por espectrofotometría UV-Vis, estimando el tamaño de partícula (Banerjee, Satapathy, Mukhopahayay & Das, 2014).

La espectrofotometría UV-Vis se basa en la absorción de radiación electromagnética de una molécula. Dicha absorción en el campo UV-Visible se presenta entre los 200 a los 700 nm. Esto ocurre gracias a que la molécula al absorber radiación, presenta transiciones entre los niveles de energía electrónica.

El funcionamiento del espectrofotómetro UV-Vis se muestra en la Figura 2.1. Un haz de luz (visible o UV) es separada en sus longitudes de onda a través de una rejilla de difracción. Cada longitud de onda separada (haz monocromático) se divide en dos haces de igual intensidad con la ayuda de un espejo. El primer haz de luz pasa a través de un pequeño contenedor transparente (celda), el cual contiene la muestra en un solvente. El segundo haz, llamado de referencia, pasa a través de una celda que contiene solo el solvente. Posteriormente, se miden las intensidades de ambos haces con ayuda de detectores electrónicos, y se los compara. La intensidad del haz de referencia se define como I_0 , y este presenta poca o ninguna absorción. La intensidad del haz de la muestra se define como I . El espectrofotómetro escanea automáticamente todas las longitudes de onda de los componentes de la muestra, de la manera descrita previamente. La región ultravioleta (UV) normalmente es escaneada de los 200 a 400 nm, mientras que la

región visible desde los 400 a 800 nm (Díaz, Ruiz, Reyes, Cejudo, Novo, Peinado & Fiñana, I. T, 2000).

Si el compuesto de la muestra no absorbe luz a una longitud de onda dada, significa que $I=I_0$. Por el contrario, si el compuesto de la muestra absorbe luz, significa que I es menor a I_0 , y esta diferencia se puede evidenciar en un gráfico de longitud de onda vs absorción. La absorción puede presentarse de 2 maneras: como transmitancia ($\%T = (I / I_0) \times 100$) o como absorbancia ($A = -\log I_0 / I$). Si no se produce absorción en la muestra, $T= 1.0$ y $A= 0$. Generalmente, se muestra la absorbancia en el eje vertical y la longitud de onda en el eje horizontal. El rango de absorbancia mostrado es de 0 (100% de transmitancia) a 2 (1% de transmitancia). Se denomina como λ_{max} a la longitud de onda de la absorbancia máxima (Faraldos & Goberna, 2011).

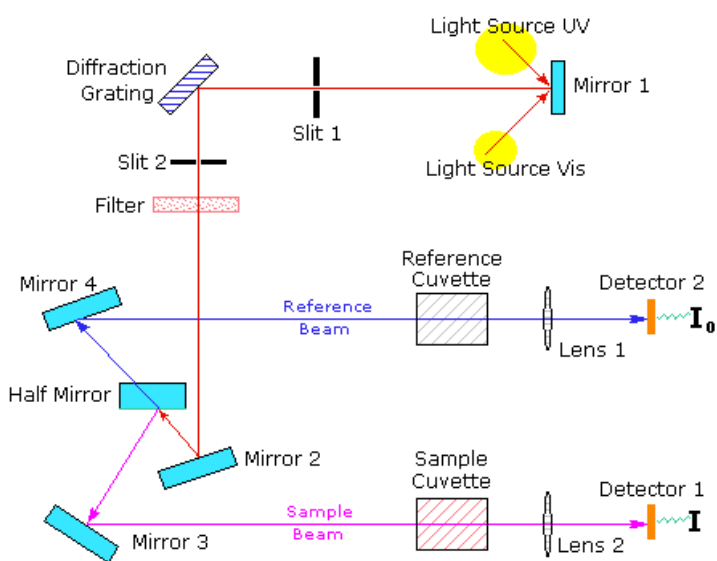


FIGURA 2.1 Esquema de espectrofotómetro UV-Vis

La manera para determinar la concentración en las muestras, es mediante la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times L \times c$$

Donde,

A= absorbancia

ϵ = absortividad molar

L= longitud del camino óptico

c= concentración molar

La absortividad molar o coeficiente de extinción es propio de cada molécula en un solvente dado, y a una temperatura y presión específica.

La Ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, es decir más analito mayor absorbancia. La concentración se puede determinar mediante el uso de una curvas de calibración, preparada a partir de materiales de referencia (Ferré, 2004).

2.4.1.1 INSTRUMENTACIÓN

Las nanopartículas de plata sintetizadas fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz Cary 60 de Agilent Technologies. La resolución empleada fue de 1nm, en un intervalo de medida de 350 a 800 nm. La línea base se corrigió usando agua destilada como blanco. Para analizar los datos se utilizó el software Cary WinUV 3.1, aplicación Scan.

2.4.1.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para leer la muestra en el equipo, se realizó una dilución de 1 mL de las nanopartículas, en un balón aforado de 10 mL con agua destilada. Se colocó la solución en una celda de poliestireno (Agilent Technologies), con 1 cm de camino óptico. Se procedió a leer las muestras en el equipo.

2.4.2 MICROSCOPIA DE TRANSMISION ELECTRONICA (TEM)

El microscopio de transmisión electrónica (TEM) es un instrumento que utiliza los fenómenos físicos producidos en los átomos al hacer colisionar un haz de electrones acelerados con una muestra. Al momento en que los electrones colisionan con la muestra, algunos de ellos son dispersados selectivamente en función del grosor y del tipo de átomos que contenga la muestra. Es decir, algunos electrones atraviesan la muestra directamente mientras que otros son totalmente desviados. Todos los electrones son conducidos y ubicados por unos lentes, los cuales forman una imagen final sobre un Dispositivo de Carga Acoplada (CCD), el cual es un dispositivo de conversión fotoeléctrica que almacena y muestra los datos de una imagen. La CCD tiene miles de aumentos, lo cual le permite una definición única e inalcanzable para cualquier otro instrumento. La imagen obtenida presenta diferentes intensidades de gris, lo cual corresponde al grado de dispersión de los electrones que inciden sobre la muestra. El poder de resolución del instrumento depende de la longitud de onda y de la calidad de los lentes objetivos. Los microscopios TEM pueden tener una resolución de aproximadamente 1.5 \AA , y gracias a éstos se puede determinar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas (Giannuzzi & Stevie, 1999).

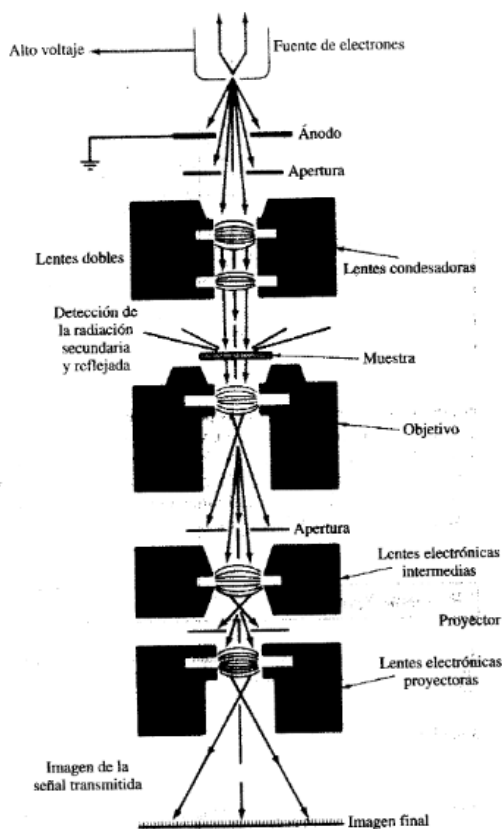


FIGURA 2.2 Esquema de un TEM

2.4.2.1 INSTRUMENTACIÓN

El análisis TEM fue realizado en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la ESPE. El microscopio utilizado fue un FEI Tecnai G2 marca Spirit Twin a un voltaje de 80 kV.

2.4.2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las nanopartículas fueron enviadas en un frasco ámbar al CENCINAT para su análisis. Las muestras para análisis TEM deben lograr secciones finas menores a 100 nm por lo que se sigue un protocolo de: fijación química, lavado, deshidratación de concentraciones crecientes de alcohol o acetona, inclusión en resina y polimerización (Mayer, Giannuzzi, Kamino & Michael, 2007). Se fijan sobre un pin de carbono y se colocan directamente en el portamuestras.

2.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico utiliza pruebas cualitativas para confirmar la presencia de un elemento, grupo funcional o compuesto en una muestra. Las pruebas empleadas fueron de coloración, en las cuales se forma un producto en una reacción química que tiene un color característico (Martí, F, 2002). Los ensayos se realizaron tanto en el extracto vegetal como en las nanopartículas sintetizadas. Se realizó el ensayo de Shinoda para la determinación de flavonoides, la prueba de Cloruro Férrico para la determinación de polifenoles, y por último el ensayo de Fehling para la determinación de azúcares reductores.

2.5.1 ENSAYO DE SHINODA

El ensayo de Shinoda permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Este metabolito secundario presenta en su estructura grupos hidroxilo y su identificación se evidencia por la formación del cloruro de magnesio ($MgCl_2$), el cual es producido por la oxidación del magnesio con ayuda del ácido clorhídrico concentrado, produciendo la liberación de gas hidrógeno.

Según el protocolo propuesto por Arunachalam *et al.* (2013), se tomó 1 mL del extracto acuoso de las hojas de chilca en un tubo de ensayo y se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y 2 cm de cinta de magnesio. Se dejó reaccionar la mezcla hasta la desaparición de la cinta de magnesio en la muestra, posteriormente se dejó reposar por 5 minutos. Finalmente se añadió 1 mL de alcohol amílico y se mezclaron las fases, se dejó reposar el tubo hasta que estas se vuelvan a separar. Se realizó el mismo procedimiento con las nanopartículas de plata. Se considera un ensayo positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja o rojo intenso (Martí, F, 2002).

2.5.2 ENSAYO DE CLORURO FÉRRICO

El ensayo de Cloruro Férrico permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y taninos hidrolizables en un extracto vegetal acuoso. La

estructura de los compuestos fenólicos es el resultado de la combinación de un azúcar con un fenol, lo cual provoca la formación de un complejo de hierro de color púrpura o verde intenso. Entonces, el fenol se oxida y el Fe^{2+} se reduce de a Fe^{3+} .

Siguiendo el protocolo propuesto por Reddy *et al.* (2014), se tomó 1 mL de extracto vegetal y se añadieron 3 gotas de acetato de sodio al 10% y 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% preparada en una solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,9% en agua). Se realizó el mismo procedimiento con las nanopartículas de plata. El ensayo se considera positivo cuando la solución se torna azul-púrpura para taninos no hidrolizables, o verde intensa para taninos hidrolizables (Martí, F, 2002).

2.5.3 ENSAYO DE FEHLING

El ensayo de Fehling reconoce la presencia de azúcares reductores en una muestra. La estructura de estos metabolitos tienen una cetona o un aldehído y grupos hidroxilo. Los azúcares se consideran como reductores gracias a la presencia del grupo carbonilo, el cual se oxida a carboxilo con la ayuda de un agente oxidante. En este caso, el cobre contenido en el reactivo de Fehling pasa de Cu^{2+} a Cu^+ , provocando la formación de un precipitado color rojo ladrillo en la muestra.

Primero se preparó el reactivo de Fehling, para lo cual se fabricaron 2 soluciones, siguiendo el protocolo propuesto por Beattie *et al.* (2011). Para la primera solución, se pesaron 3,5 g de sulfato cúprico pentahidratado y se disolvió con agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL en un balón de aforo. Para la segunda solución se pesaron 15 g de tartrato de sodio y potasio y 4 g de hidróxido de sodio, y se disolvió la muestra con agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL. Se mezclaron 5 mL de cada solución para obtener el reactivo de Fehling.

Para la determinación de azúcares reductores, se tomó 1 mL del extracto vegetal en un tubo de ensayo y se añadieron 2 mL del reactivo de Fehling, a

continuación se introdujo el tubo a baño maría por 15 minutos. Se realizó el mismo procedimiento con las nanopartículas de plata. El ensayo se considera como positivo cuando la solución presenta un color rojo ladrillo, o aparece un precipitado del mismo color (Martí, F, 2002).

2.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO

Las pruebas cuantitativas son utilizadas para determinar la concentración de un elemento, grupo funcional o compuesto en una muestra. Tanto los flavonoides como los polifenoles fueron cuantificados utilizando espectrofotometría UV-Vis. Las pruebas cuantitativas fueron realizadas por triplicado. No se realizaron pruebas de cuantificación de azúcares reductores ya que en la prueba cualitativa dio un resultado negativo.

2.6.1 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis

Para la cuantificación de flavonoides, se siguió el método propuesto por Ramírez-Navas (2016), en el cual se puede medir la coloración amarilla por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 374,5 nm. Los resultados de concentración fueron expresados como quercetina.

2.6.1.1 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Todas las soluciones se prepararon con metanol 50% v/v. La solución madre de quercetina de 100 ppm fue fabricada usando un reactivo de marca SIGMA-ALDRICH 99% de pureza, material de referencia certificado. A partir de la solución madre se prepararon soluciones de 2,5; 5,0; 6,5 y 7,5 ppm para la curva de calibración. En un volumen de 50 mL se añadieron: muestra o solución madre para curvas de calibración y 1 mL de tricloruro de aluminio al 5% en metanol, y se dejó reposar por 10 minutos. Finalmente se aforó con metanol 50% y se mezcló el contenido de los balones. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 374,5 nm.

Se realizó una curva de calibración con los valores de absorbancia y concentración obtenidos, y se calculó la concentración de flavonoides tanto en el extracto acuoso de las hojas de chilca como en las nanopartículas sintetizadas. La cantidad de muestra utilizada se especifica en la Tabla 2.3.

TABLA 2.3 Condiciones para preparación de muestras de extracto vegetal y solución coloidal de nanopartículas de plata

Volumen extracto vegetal (mL)	Volumen AgNPs (mL)	Volumen de aforo (mL)
0,5	1	50

2.6.2 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Para la cuantificación de polifenoles se siguió el método propuesto por Fernández & Fuentes (2015), en el cual se mide una coloración azul por Espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados fueron expresados como ácido gálico

2.6.2.1 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se preparó una solución madre, de 100 ppm, con ácido gálico de marca Merck, con 99% de pureza. A partir de esta, se preparó 10 mL de soluciones de 1, 3, 5, 9 y 10 ppm para la curva de calibración. Posteriormente se añadió 250 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 2 minutos. A continuación, se colocó 750 μ L de carbonato de sodio 20% y se aforó con agua destilada. Se dejó reposar las soluciones por 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron tratadas de la misma manera para la cuantificación de polifenoles. La absorbancia se midió en el Espectrofotómetro UV-Vis a 765 nm.

Se realizó una curva de calibración con ácido gálico a partir de los valores de absorbancia y concentración obtenidos, y se calculó la concentración de polifenoles tanto en el extracto acuoso de las hojas de chilca como en las nanopartículas sintetizadas. La cantidad de muestra utilizada se especifica en la Tabla 2.4.

TABLA 2.4 Condiciones para preparación de muestras de extracto vegetal y solución coloidal de nanopartículas de plata

Volumen extracto vegetal (mL)	Volumen AgNPs (mL)	Volumen de aforo (mL)
0,5	1	10

2.6.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y POLIFENOLES

Con el fin de obtener resultados confiables, se realizó una evaluación tanto para el método de cuantificación de flavonoides, como para el de polifenoles. Se determinó linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud; en cada uno.

2.6.3.1 LINEALIDAD

La linealidad es un parámetro para la validación de métodos analíticos, el cual define su capacidad de obtener resultados de concentración del analito proporcionales a la señal de respuesta que proporciona el equipo. La linealidad es determinada mediante fórmulas matemáticas y lo más común es un gráfico de concentración vs señal, el cual se denomina curva de calibración. Sobre el eje X se ubica la concentración y sobre el eje Y la señal que corresponde a cada concentración. La curva de calibración se compone de mínimo 3 puntos, pero para tener resultados más confiables se fabrican curvas de calibración de 4 puntos en adelante. Cada punto de la curva representa una concentración única de la solución que se desea cuantificar, y la concentración es directamente

proporcional a la señal que se genere en el equipo utilizado. En el gráfico obtenido se analiza el coeficiente de correlación (R^2), el cual asemeja la curva preparada con una línea recta y la compara para obtener su valor. Mientras más cercano el valor de R^2 sea a 1, se obtienen resultados más confiables en cuanto a la cuantificación de un analito. Se acepta un valor de R^2 hasta 0,990. De igual manera, de la curva se puede obtener la pendiente y el intercepto, los cuales reflejan la sensibilidad y presencia de errores en el método. La ecuación de la recta se define como:

$$y = mx + b$$

donde, y = señal de respuesta
 m =pendiente de la recta
 x =concentración
 b =intercepto

El coeficiente de correlación se calcula mediante la siguiente ecuación (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996):

$$r^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2]} \sqrt{[\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}}$$

2.6.3.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad de analito que puede ser detectado en una muestra, sin la necesidad de que este pueda cuantificarse. Es la mínima señal que se diferencia al ruido del equipo. Mientras que el límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor cantidad de analito que puede ser cuantificado con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de un método establecido.

Ambos límites son calculados mediante la lectura mínima de 6 blancos medidos en el equipo, y se calculan mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{LOD} = 3S_b$$

$$LOQ = 10S_b$$

Donde, S_b representa a la lectura del blanco (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996).

2.6.3.3 EXACTITUD Y PRECISIÓN

La exactitud se define como la proximidad entre el resultado de una medición y el valor real. Mientras que la precisión es la proximidad entre los resultados obtenidos. Se pueden tener resultados exactos y precisos cuando los valores obtenidos son próximos los unos a los otros, así como con el valor real. Se tienen valores exactos pero no precisos cuando los valores obtenidos varían mucho los unos de los otros, pero su promedio es cercano al valor real. Se pueden tener resultados precisos pero no exactos cuando todas las mediciones se aproximan las unas a las otras, pero el promedio no se asemeja al valor real. Y por último se pueden obtener resultados que no son precisos ni exactos, cuando los valores obtenidos no se aproximan los unos con los otros, ni su promedio se acerca al valor real. La exactitud se expresa como error porcentual, mientras menor sea el error porcentual más exacta es la medición. La precisión se expresa como desviación estándar, mientras menor sea el valor más precisa es la medición.

El error porcentual se calcula bajo la siguiente fórmula:

$$\%error = \frac{v \text{ teórico} - v \text{ experimental}}{v \text{ teórico}} \times 100$$

La desviación estándar se calcula bajo la siguiente fórmula (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996):

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Para seleccionar las condiciones óptimas para la preparación del extracto acuoso de las hojas de chilca, se utilizó el programa StatGraphics. Los parámetros fueron seleccionados de la siguiente manera, teniendo un valor mínimo, un valor máximo y un valor promedio en cada uno: se empleó 0,5 y 1,0 g de hojas de chilca, no se trabajó con 0,25 g ya que la coloración del extracto era imperceptible, mientras que al trabajar con un peso superior a 1,0 g se produce mucha cantidad de espuma, lo cual dificulta el proceso de filtración de la muestra. Las temperaturas empleadas fueron de 20, 45 y 70 °C en una plancha de calentamiento con agitación magnética. Se escogió la temperatura de 20 °C ya que no requiere de plancha de calentamiento, el máximo valor fue de 70 °C debido a que a una temperatura superior el agua se evapora, y los compuestos orgánicos pueden descomponerse. La temperatura de 45 °C fue escogida ya que es el punto intermedio entre la temperatura mínima y máxima empleada. En cuanto al tiempo, se emplearon 20, 40 y 60 minutos, se seleccionó un tiempo de 20 minutos como mínimo ya que se diferencia un color homogéneo en la mezcla. El tiempo máximo fue de 60 minutos ya que pasado este tiempo el color del extracto se torna muy oscuro, mientras que a los 40 minutos es un tiempo intermedio. Con cada una de las 36 muestras, cuyos parámetros fueron seleccionados aleatoriamente en el programa StatGraphics, se prepararon soluciones coloidales de nanopartículas de plata, bajo las siguientes condiciones: 20 mL de AgNO_3 1mM, 1 mL de extracto preparado, pH ajustado a 8 con NaOH al 1% y calentamiento por 1 minuto en un microondas a 1000 W. Cada muestra fue leída en el espectrofotómetro UV-Vis y se registró la longitud de onda máxima con su absorbancia, tal como se muestra en la Tabla 3.1.

TABLA 3.1 Longitud de onda y absorbancia para determinar el extracto óptimo

Muestra #	Bloque	Masa vegetal (g)	t (min)	T (°C)	λ (nm)	Absorbancia U.A.
1	1	0,5	40	45	416	0,993
2	1	1,0	20	20	413	0,686
3	1	0,5	20	70	422	1,047
4	1	1,0	60	20	406	0,876
5	1	0,5	40	70	418	0,852
6	1	0,5	60	45	416	0,905
7	1	1,0	40	45	413	0,856
8	1	1,0	20	45	410	0,888
9	1	0,5	20	20	413	0,993
10	1	0,5	20	45	415	0,965
11	1	0,5	60	70	416	0,989
12	1	0,5	60	20	410	0,872
13	1	1,0	20	70	423	0,678
14	1	0,5	40	20	416	0,879
15	1	1,0	40	70	417	0,754
16	1	1,0	60	45	410	1,011
17	1	1,0	60	70	417	0,838
18	1	1,0	40	20	402	1,168
19	2	0,5	60	20	412	1,271
20	2	1,0	40	20	405	1,010
21	2	1,0	60	45	412	0,815
22	2	1,0	60	20	405	0,883
23	2	1,0	40	45	413	0,786
24	2	0,5	20	45	414	1,039
25	2	1,0	40	70	422	0,667
26	2	0,5	20	70	420	1,139
27	2	0,5	60	45	415	1,216
28	2	1,0	60	70	429	0,923
29	2	1,0	20	20	407	0,690
30	2	0,5	40	45	417	0,995
31	2	0,5	40	20	413	1,153
32	2	0,5	60	70	417	0,866
33	2	0,5	20	20	413	1,052
34	2	0,5	40	70	417	0,941
35	2	1,0	20	45	415	0,588
36	2	1,0	20	70	418	0,517

El programa StatGraphics determinó las condiciones óptimas para preparar el extracto acuoso de las hojas de chilca, a partir de la formación de

nanopartículas de plata con las 36 muestras preparadas, en base una la longitud de onda (410 nm) y absorbancia (1,000) esperadas. Las condiciones óptimas para la preparación del extracto se puede apreciar en la Tabla 3.2.

TABLA 3.2 Condiciones óptimas para la preparación del extracto acuoso de las hojas de chilca

Factor	Óptimo
Masa vegetal (g)	0,63
Tiempo (min)	60,0
Temperatura (°C)	20,0

En la Figura 3.1 se puede apreciar el extracto obtenido a partir de las condiciones óptimas determinadas. Se observa que el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca) presenta un color café.

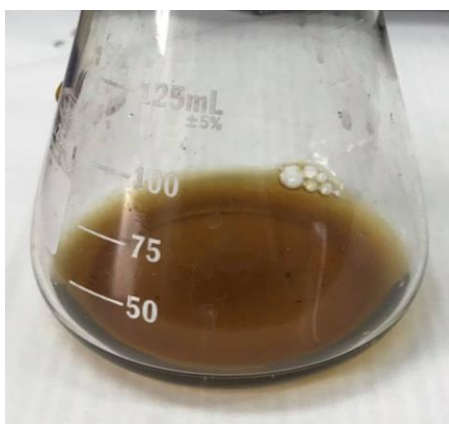


FIGURA 3.1 Extracto acuoso de las hojas de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca)

3.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Se evidencia la formación de nanopartículas de plata por el cambio de color en la solución. Se observó que el color del extracto acuoso de las hojas de chilca es café, y cambia a café- amarillento como se muestra en la Figura 3.2.

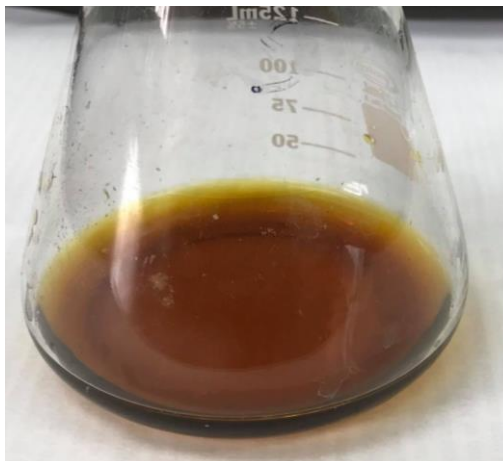


FIGURA 3.2 Solución coloidal de nanopartículas de plata

Para seleccionar las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto vegetal previamente optimizado, se utilizó el programa StatGraphics. Los parámetros a variar fueron seleccionados de la siguiente manera: concentración de AgNO_3 de 0,5, 1,25 y 2,0 mM, se usa la solución 2,0 mM como máxima, ya que a un valor superior la solución formada es muy oscura y los espectros muestran muchos picos de absorción máxima, mientras que a una concentración menor a 0,5 mM, la solución es muy clara y no existe un pico de absorción máxima; por lo que no hay formación de nanopartículas de plata.

El volumen de extracto probado en la síntesis es de 0,5, 1,25 y 2,0 mL. Al utilizar un volumen menor de 0,5 mL, la solución formada es muy clara, mientras que con un volumen superior de 2,0 mL, la solución se torna muy oscura. El pH juega un papel fundamental en la formación de nanopartículas de plata, Geanaiea, *et al.* (2015) expone que las nanopartículas se forman a un pH básico. Es por esto, que se emplean valores de pH de 7, 8 y 10 (Geanaiea, *et al.* 2015). El tiempo de calentamiento de la solución en el microondas determina la formación de nanopartículas de plata, se probaron tiempos de 30, 60 y 120 s. Se emplea un tiempo mínimo de calentamiento de 30 s, ya que la solución se calienta homogéneamente. Un tiempo mayor a 120 s, provoca la ebullición de la solución, lo cual puede provocar pérdida de muestra. Se implementó el uso del microondas en este punto ya que se debe preparar una gran cantidad de muestras, en total

36. Se registró la longitud de onda máxima y la absorbancia de las nanopartículas obtenidas, tal como se muestra en la Tabla 3.3. Los casilleros vacíos representan a las soluciones en las que no se formaron nanopartículas de plata.

TABLA 3.3 Condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata

Volumen extracto (mL)	Concentracion AgNO ₃ (mM)	pH	Tiempo (s)	λ (nm)	Absorbancia U.A.
2,00	2,00	10	120	-	-
0,50	2,00	10	120	-	-
0,50	0,50	10	30	412	0,487
2,00	0,50	7	120	-	-
0,50	2,00	10	30	408	1,768
2,00	0,50	10	120	375	0,845
0,50	0,50	10	120	410	1,018
0,50	0,50	7	30	411	0,240
2,00	2,00	7	120	417	1,285
0,50	2,00	7	120	421	0,968
1,25	1,25	8	75	412	1,355
2,00	2,00	10	30	414	1,035
2,00	0,50	10	30	375	0,395
0,50	2,00	7	30	422	0,639
1,25	1,25	8	75	413	1,579
2,00	2,00	7	30	417	0,679
0,50	0,50	7	120	413	0,586
2,00	0,50	7	30	-	-
2,00	2,00	10	120	-	-
0,50	2,00	10	120	-	-
0,50	0,50	10	30	411	0,476
2,00	0,50	7	120	-	-
0,50	2,00	10	30	408	1,914
2,00	0,50	10	120	365	0,660
0,50	0,50	10	120	413	1,101
0,50	0,50	7	30	412	0,437
2,00	2,00	7	120	421	1,581
0,50	2,00	7	120	427	1,371
1,25	1,25	8	75	412	0,952
2,00	2,00	10	30	416	1,554
2,00	0,50	10	30	-	-
0,50	2,00	7	30	422	0,482
1,25	1,25	8	75	411	0,927
2,00	2,00	7	30	415	0,561
0,50	0,50	7	120	412	0,769
2,00	0,50	7	30	-	-

En el programa StatGraphics se determinaron las condiciones óptimas de síntesis de nanopartículas de plata. La selección se basó en una longitud de onda de 410 nm y una absorbancia de 1,000. En la Tabla 3.4 se detalla lo escogido por el programa StatGraphics para la síntesis de nanopartículas de plata

TABLA 3.4 Condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata

Factor	Óptimo
Volumen de extracto (mL)	1,29
Concentración AgNO ₃ (mM)	1,54
pH	8
Tiempo (s)	49

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

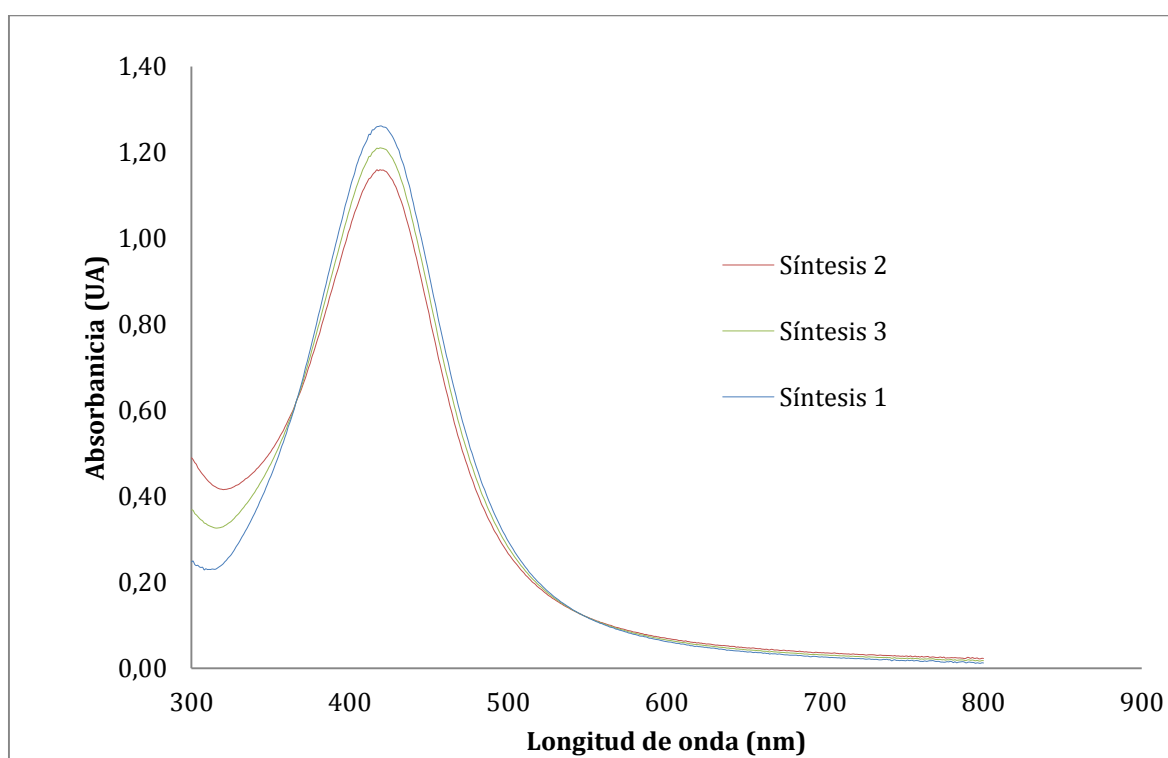
3.3.1 ESPECROFOTOMETRÍA UV-Vis

La formación de nanopartículas se analizó por Espectrofotometría UV-Vis. Rodríguez *et al.* (2013), expone que el pico característico para la formación de nanopartículas de plata dentro del espectro, se encuentra alrededor de los 425 nm, donde se estima que el tamaño de las nanopartículas de plata es de 2 a 40 nm.

Se han realizado varios estudios en donde se obtienen nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales, los cuales concuerdan con los resultados obtenidos en la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca), este resultado se puede apreciar en la Figura 3.3. Los valores de longitud de onda y de absorbancia de las 3 repeticiones se muestran en la Tabla 3.5. La forma de un espectro característico de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos vegetales, se puede apreciar en el Anexo 2 (Song, & Kim, 2009).

TABLA 3.5 Valores de longitud de onda y absorbancia en las síntesis realizadas

Repetición	Longitud de onda (nm)	Absorbancia (U.A)
1	419	1,261
2	419	1,156
3	418	1,224
Promedio	419	1,213

**FIGURA 3.3** Espectro UV-Vis de la síntesis óptima de nanopartículas de plata

Pradeep (2012) coincide con Rodríguez *et al.* (2013), y expone que según la posición del pico de absorción máxima se puede estimar el tamaño de nanopartículas de plata de acuerdo a la Tabla 3.6 .

TABLA 3.6 Tamaño de partícula en relación a la posición del pico de máxima absorción

Pico de máxima absorción (nm)	Tamaño de nanopartícula estimado (nm)
400-429	10-14
430-437	35-50
438	60-80

Comparando los resultados obtenidos, y de acuerdo a la bibliografía, se estima que las nanopartículas sintetizadas tienen un tamaño que varía entre los 10 y los 14 nm, este valor incluye el recubrimiento orgánico. No se pueden comparar los resultados obtenidos con otros estudios, ya que previamente no se han sintetizado nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de chilca (*Baccharis latifolia*), ni de otras especies de su mismo género.

En otros estudios, se han sintetizado nanopartículas de plata utilizando extractos acuosos de *Mimosa albida* (Amaguaña, 2018), *Piper aduncum* (Santorum, 2017) y *Ambrosia arborescen* (Domenech, 2017); las cuales presentan un pico de máxima absorbancia a los 411, 410 y 415 nm, respectivamente. En cada caso se han estimado un tamaño de nanopartículas que varía de 10 a 14 nm (Domenech, 2017). El tamaño de nanopartícula puede variar dependiendo de las condiciones de síntesis y del extracto vegetal utilizado.

3.3.2 MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)

En el análisis TEM se utilizó un microscopio de transmisión electrónica para confirmar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Se realizaron 428 mediciones para determinar el tamaño promedio de las nanopartículas y se obtuvo que el histograma de frecuencias indica un tamaño de nanopartículas de $6,51 \pm 3,27$ nm, tal como se indica en la Figura 3.5. Se aproxima al tamaño estimado por espectrofotometría UV-Vis, sin embargo esta técnica incluye en el tamaño de nanopartículas el recubrimiento orgánico. La Figura 3.4 es una

micrografía TEM, en la cual se puede apreciar el núcleo metálico de las nanopartículas de plata; además se puede apreciar la forma cuasi-esférica y la dispersión de las nanopartículas sintetizadas.

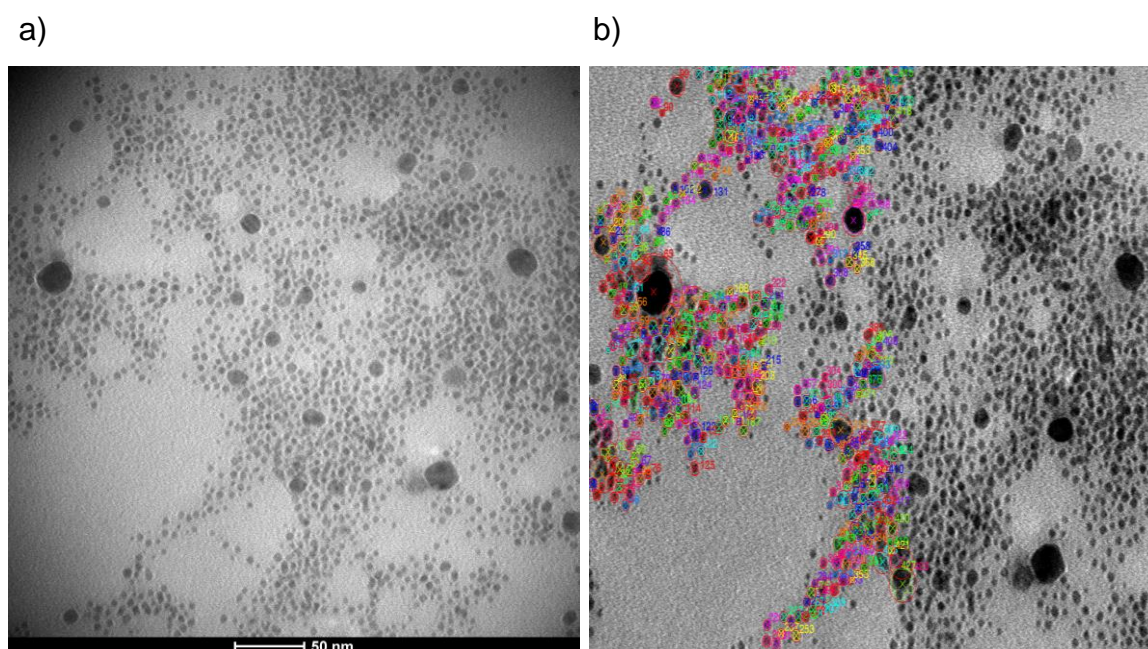


FIGURA 3.4 Imagen TEM de nanopartículas de plata sintetizadas con condiciones óptimas (a) y con los diámetros de nanopartículas medidos (b)

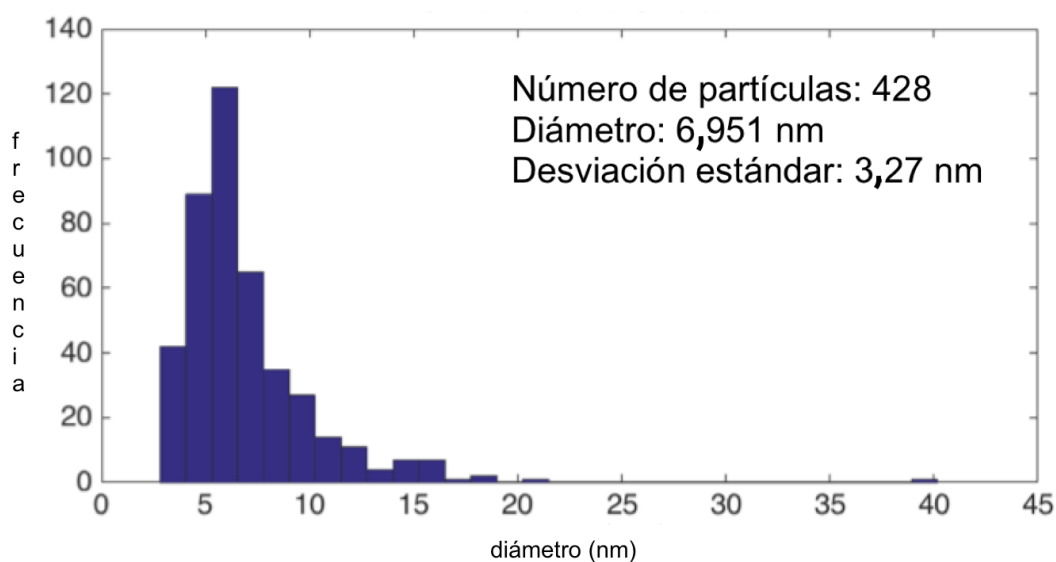


FIGURA 3.5 Histograma de frecuencias del tamaño de nanopartículas de plata

Según Song *et al.* (2009), una imagen TEM típica de nanopartículas sintetizadas a partir de extractos vegetales presentan un diámetro promedio de 30

nm y están cubiertas por una capa de materia orgánica, proveniente de los extractos vegetales tal como se muestra en el Anexo 3.

3.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico permitió identificar la presencia de dos grupos funcionales en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca), responsables de la reducción química. Los ensayos fueron realizados tanto en el extracto acuoso como en las nanopartículas de plata sintetizadas, con el fin de confirmar la ausencia de los metabolitos secundarios, presumiendo que actúan como agentes reductores en la formación de las nanopartículas. Las 2 muestras se encontraban en medio acuoso, por lo que se asume que los metabolitos son solubles en agua. Los resultados de las pruebas de coloración se presentan en la Tabla 3.7. La presencia del metabolito secundario se muestra como (+), y la ausencia del mismo como (-).

TABLA 3.7 Pruebas de coloración del Tamizaje fitoquímico

Ensayo	Metabolito secundario	Extracto acuoso chilca	AgNPs-chilca
Shinoda	Flavonoides	+	-
Cloruro Férrico	Polifenoles/taninos	+	-
Fehling	Azúcares reductores	-	-

El ensayo de Shinoda y de Cloruro férrico fue positivo para el extracto vegetal, lo que sugiere que las hojas de chilca contienen flavonoides y polifenoles. Sin embargo, no fueron positivas para las nanopartículas, con lo que se puede asumir que tanto los flavonoides presentes en el extracto como los polifenoles, actuaron como agentes reductores en la formación de nanopartículas de plata. En ensayo de Fehling para azúcares reductores da negativo en ambos casos, por lo que se asume que el extracto acuoso de las hojas de chilca no contiene azúcares reductores libres, sino probablemente glicosidados.

El presentar un resultado negativo en las pruebas de coloración para flavonoides y polifenoles en la solución coloidal de nanopartículas de plata, no es un indicativo de la ausencia total de estos metabolitos secundarios, sino que pueden presentar concentraciones bajas que no pueden ser detectados con estas pruebas. Es por ello, que se los analizó por espectrofotometría UV-Vis.

El ensayo de Shinoda se considera como positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja o rojo. Como se puede apreciar en la Figura 3.6, el tubo que contiene el extracto se colorea de amarillo intenso, mientras que el tubo que contiene las nanopartículas permanece transparente.

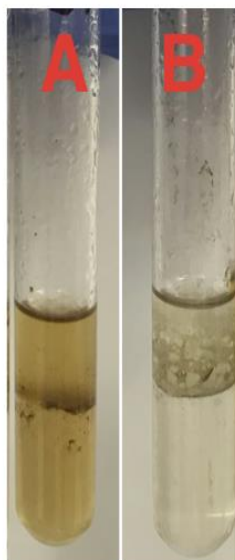


FIGURA 3.6 Ensayo de Shinoda para determinar flavonoides. A) extracto acuoso de las hojas de la planta chilca B) solución coloidal de nanopartículas de plata

En la Figura 3.7 se puede apreciar la reacción de la quercetina con el magnesio y el ácido clorhídrico. El magnesio metálico se oxida con ayuda del ácido clorhídrico y se forma el cloruro de magnesio $MgCl_2$, liberando gas hidrógeno H_2 .

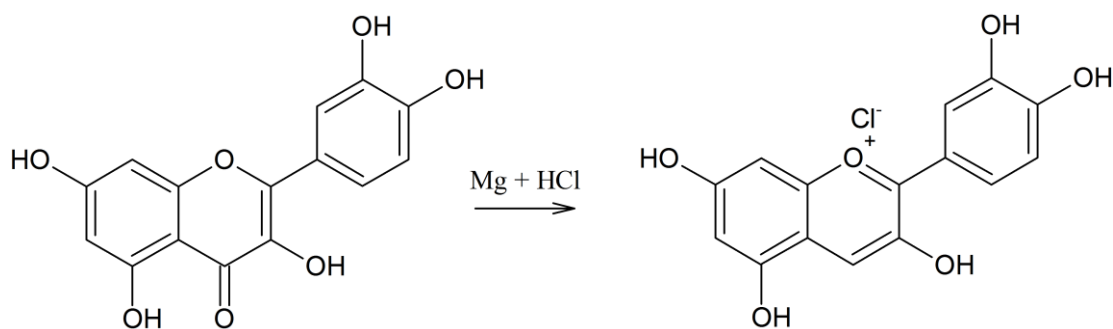


FIGURA 3.7 Reacción de quercetina para positivo en prueba de Shinoda (Arunachalam *et al.*, 2013)

De igual manera, se puede apreciar en la Figura 3.8 que en la prueba de Cloruro Férrico, el tubo que contiene al extracto vegetal presenta una coloración verde intensa, esto quiere decir que el extracto contiene polifenoles hidrosolubles libres. Mientras que el tubo que contiene las nanopartículas no cambia de color y mantiene su color amarillo, lo cual descarta la presencia de polifenoles libres en las nanopartículas.

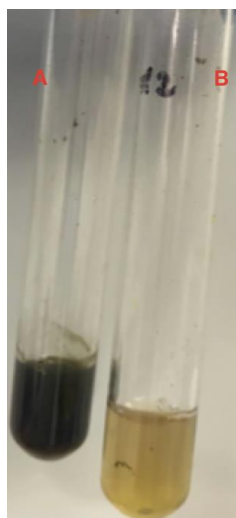


FIGURA 3.8 Ensayo de Cloruro Férrico para determinar polifenoles. A) extracto acuoso de las hojas de la planta chilca B) solución coloidal de nanopartículas de plata

La reacción que confirma la presencia de polifenoles en la prueba de Cloruro Férrico se muestra en la Figura 3.9. Se puede apreciar que el fenol se

oxida, mientras que el hierro se reduce de Fe^{2+} a Fe^{3+} , formando de esta manera un complejo de hierro, el mismo que presenta una coloración verde.

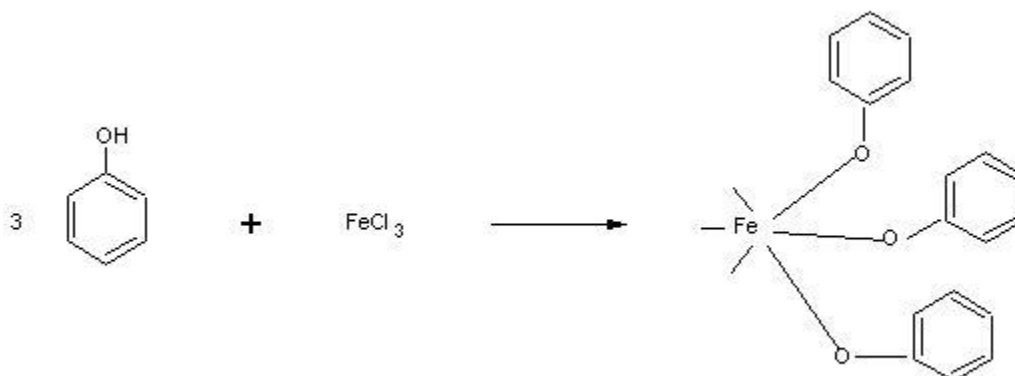


FIGURA 3.9 Reacción de fenol con cloruro férrico para prueba de Cloruro Férrico (Martí, 2002).

El ensayo de Fehling para azúcares reductores no fue positivo, pues no se formó un precipitado color rojo ladrillo en el extracto ni en las nanopartículas de plata como se muestra en la Figura 3.10. Se realizó una segunda prueba para corroborar los resultados. No se encontraron azúcares reductores libres en el extracto ni en las nanopartículas de plata.

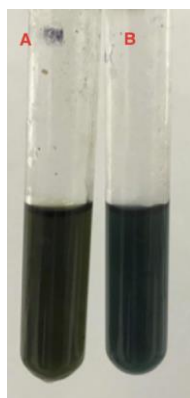


FIGURA 3.10 Ensayo de Fehling para determinar azúcares reductores. A) extracto de planta chilca B) solución coloidal de nanopartículas de plata

Como se demuestra en el estudio de Xavier *et al.* (2013), los componentes mayoritarios de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca), son compuestos que pertenecen a la clasificación de taninos y de flavonoides. Algunos compuestos

que se encuentran en esta especie vegetal son ácido gálico, quercetina, limoneno y algunos aceites esenciales (Valarezo, 2013). En el tamizaje fitoquímico realizado en el presente estudio se confirmó la presencia de flavonoides y de polifenoles, los cuales son considerados como agentes reductores responsables de la formación de nanopartículas de plata.

3.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO

La cuantificación de flavonoides y polifenoles se realizó considerando los resultados del tamizaje fitoquímico.

3.5.1 FLAVONOIDES

Para la cuantificación de flavonoides se realizó una curva de calibración, utilizando quercetina como solución estándar. Los valores de concentración y absorbancia fueron medidos en el espectrofotómetro UV-Vis, los mismos se muestran en la Tabla 3.8 y en la Figura 3.11. Los flavonoides fueron cuantificados tanto en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca), como en las nanopartículas sintetizadas; para confirmar la acción de los flavonoides en la formación de nanopartículas.

TABLA 3.8 Datos de curva de calibración de quercetina para cuantificar flavonoides

Concentración (ppm)	Absorbancia (U.A)
1,0	0,0259
2,5	0,0635
5,0	0,1250
6,5	0,1687
7,5	0,1967

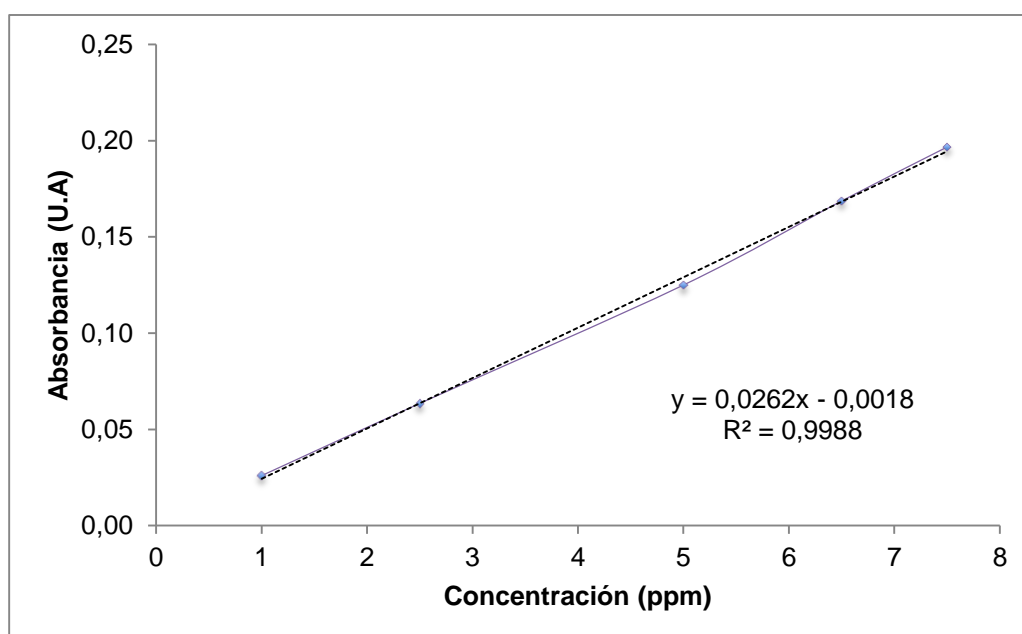


FIGURA 3.11 Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca), y en la solución coloidal de nanopartículas de plata

La curva de calibración proporciona la información sobre la recta, en la cual se identifica la ordenada al origen y la pendiente de la misma. A partir de esta curva se obtienen los datos de concentración de flavonoides, expresados como quercetina, en el extracto vegetal y en las nanopartículas de plata. De igual manera se tiene información sobre el coeficiente de correlación de la curva, que debe ser al menos de 0,990 para tener resultados confiables. La información de

los parámetros de la curva de calibración de quercetina se observa en la Tabla 3.9.

TABLA 3.9 Componentes de la curva de calibración (quercetina)

Ecuación de la recta	Y=0,0262x-0,0018
Pendiente (a)	0,0262
Ordenada al origen (b)	0,0018
Coefficiente de correlación (R²)	0,99881

Para el aseguramiento de resultados del método, se calculó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) a partir de la medición de absorbancia de 10 blancos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.10.

TABLA 3.10 Absorbancia de blancos para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación del método (flavonoides)

Blanco	Absorbancia (UA)	Concentración (ppm)
1	0,0030	0,18
2	0,0020	0,15
3	0,0030	0,18
4	0,0030	0,18
5	0,0040	0,22
6	0,0030	0,18
7	0,0040	0,22
8	0,0030	0,18
9	0,0020	0,15
10	0,0040	0,22
Promedio	0,19	
desviación estándar	0,03	
LD	0,09	
LQ	0,28	

Para determinar la concentración de flavonoides en el extracto vegetal y en las nanopartículas, se midió la absorbancia de los mismos por triplicado a 374,5 nm. Con estos datos, se calculó la concentración de las muestras sustituyendo Y como el valor de absorbancia, el cálculo de concentración se muestra en el Anexo 4. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.11.

TABLA 3.11 Concentración de flavonoides en el extracto acuoso de las hojas de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca) y de la solución coloidal de nanopartículas de plata sintetizadas

Muestra	Absorbancia (UA)	Concentración (mg/L)	F.D	Concentración real (mg/L)	Promedio	Desviación estándar
Extracto acuoso vegetal						
1	0,0834	3,25	100	325,19	328,12	4,74
2	0,0835	3,26	100	325,57		
3	0,0856	3,35	100	333,59		
Solución coloidal de AgNPs						
1	0,1265	4,89	50	244,85	250,13	4,65
2	0,1311	5,07	50	253,63		
3	0,1302	45,04	50	251,91		

El contenido de flavonoides presentes en el extracto vegetal de chilca (*Baccharis latifolia*) fue de 328,12 mg/L; mientras que el contenido de flavonoides presentes en las nanopartículas de plata fue de 250,13mg/L. Se demuestra que hay una disminución significativa en cuando a la presencia de flavonoides, expresados como quercetina, en el extracto y en las nanopartículas. Esto indica que hubo una reacción química en la cual se utilizó el metabolito para producir la reducción de los iones plata para la formación de nanopartículas. Resultados similares se produjeron en el estudio de Zuas *et al.* (2014). en el cual existe una disminución significativa de la cantidad de quercetina en las nanopartículas de plata sintetizadas, comparado con el extracto acuoso de la planta *Myrmecodia* (*Sarang Semut*).

3.5.2 POLIFENOLES

Para la cuantificación de polifenoles se preparó una curva de calibración, utilizando ácido gálico como solución estándar. Los valores de concentración y absorbancia fueron medidos en el espectrofotómetro UV-Vis, los mismos se muestran en la Tabla 3.8 y en la Figura 3.12. Los polifenoles fueron cuantificados tanto en el extracto vegetal de la planta de chilca (*Baccharis latifolia*), como en las nanopartículas sintetizadas para confirmar la acción de dicho metabolito secundario en la formación de nanopartículas de plata.

TABLA 3.12 Datos de curva de calibración de ácido gálico para cuantificar polifenoles

Concentración (ppm)	Absorbancia (UA)
1	0,0894
3	0,2585
5	0,4042
9	0,7409
10	0,8106

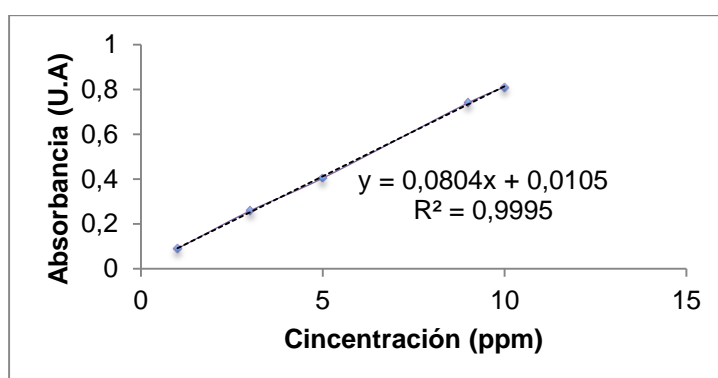


FIGURA 3 12 Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles en el extracto acuoso de la planta chilca (*Baccharis latifolia*), y en la solución coloidal de nanopartículas de plata

A partir de la curva de calibración se obtienen los datos de concentración de polifenoles, expresados como ácido gálico, del extracto vegetal y de las nanopartículas de plata. De igual manera se tiene información sobre el coeficiente de correlación de la curva, que debe ser al menos de 0,990 para tener resultados confiables. El detalle de la curva de la calibración de ácido gálico se observa en la Tabla 3.13.

TABLA 3.13 Componentes de la curva de calibración (ácido gálico)

Ecuación de la recta	Y=0,0804x+0,0105
Pendiente (a)	0,0804
Ordenada al origen (b)	0,0105
Coefficiente de correlación (R²)	0,99953

En cuanto al aseguramiento de resultados del método, se calculó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) a partir de la medición de absorbancia de 10 blancos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.14.

Para determinar la concentración de polifenoles en el extracto vegetal y en las nanopartículas, se midió la absorbancia de los mismos por triplicado a 765 nm. Con estos datos, se calculó la concentración de las muestras sustituyendo Y como el valor de absorbancia, el cálculo de concentración se muestra en el Anexo 5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.15.

TABLA 3.14 Absorbancia de blancos para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación del método (polifenoles)

Blanco	Absorbancia (U.A)	Concentración (ppm)
1	0,019	0,11
2	0,021	0,13
3	0,019	0,11
4	0,018	0,09
5	0,021	0,13
6	0,017	0,08
7	0,021	0,13
8	0,019	0,11
9	0,019	0,11
10	0,019	0,11
Promedio	0,11	
desviación estándar	0,02	
LD	0,06	
LQ	0,17	

TABLA 3.15 Concentración de polifenoles en el extracto acuoso de las hojas de la planta *Baccharis latifolia* (Chilca) y de la solución coloidal de nanopartículas de plata sintetizadas

Muestra	Absorbancia (U.A)	Concentración (ppm)	F.D	Concentración real (ppm)	Promedio	Desviación estándar
Extracto vegetal acuoso						
1	0,2707	3,24	20	64,73	66,26	1,34
2	0,2793	3,34	20	66,87		
3	0,2806	3,36	20	67,19		
Solución coloidal de AgNPs						
1	0,4359	5,29	10	52,91	52,50	0,38
2	0,4321	5,24	10	52,44		
3	0,4299	5,22	10	52,16		

El contenido de polifenoles, expresados como ácido gálico, presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca) fue de 66,26 mg/L; mientras que el contenido de polifenoles presentes en las nanopartículas de plata fue de 52,20 mg/L. Se demuestra que hay una disminución significativa en cuando a la presencia de polifenoles en el extracto y en las nanopartículas. Esto indica que hubo una reacción química en la cual se utilizó el metabolito como agente reductor para la formación de nanopartículas. Resultados similares a cerca de la cuantificación de polifenoles se obtuvieron en el estudio de Amaguaña Pacheco (2018). En este estudio, se puede apreciar la disminución de polifenoles, expresados como ácido gálico, del extracto acuoso vegetal de *Mimosa Albida* en comparación con las nanopartículas de plata. De igual manera, la cuantificación se realizó por Espectrofotometría UV-Vis, confirmando los resultados obtenidos en este estudio.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

La síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto vegetal de hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca) fue exitoso. Las condiciones óptimas para la preparación del extracto vegetal fueron: 0,63 g de planta, 20 mL de agua destilada, con agitación constante por 60 minutos a temperatura ambiente. Las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata fueron: 20 mL de AgNO_3 1,54 mM, 1,29 mL de extracto vegetal, pH 8, calentando en el microondas por 59 s. Este método de síntesis es amigable con el medio ambiente ya que no se utilizan sustancias tóxicas, tiene un bajo costo. Es un método fácil y rápido.

El tamaño estimado de las nanopartículas de plata con el recubrimiento orgánico por Espectrofotometría UV-Vis entre varía los 10 a los 14 nm, ya que mostraron un pico de absorción máxima a los 419 nm. El tamaño real del núcleo metálico de las nanopartículas fue analizado por microscopía TEM, obteniendo como resultado promedio $6,51 \pm 3,27$ nm.

El tamizaje fitoquímico realizado confirmó mediante pruebas de color, la presencia de flavonoides con la prueba de Shinoda y de polifenoles con la prueba de Cloruro Férrico en el extracto acuoso de las hojas de chilca (*Baccharis latifolia*). Estos metabolitos secundarios actúan como posibles agentes reductores en la formación de nanopartículas y se atribuye al resultado negativo en la solución coloidal, como una disminución en su concentración. El extracto acuoso de hojas de chilca no contiene azúcares reductores libres, ya que el resultado fue negativo en la prueba de Fehling.

Se determinó que la concentración de flavonoides expresado como quercetina en el extracto acuoso de las hojas de chilca (*Baccharis latifolia*) fue de

328,12 mg/L, y en la solución coloidal de nanopartículas de plata fue de 250,13 mg/L. Finalmente, la concentración de polifenoles expresados como ácido gálico en el extracto acuoso de las hojas de chilca (*Baccharis latifolia*) fue de 66,26 mg/L, y en la solución coloidal de nanopartículas de plata fue de 52,50 mg/L.

4.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda complementar el análisis de nanopartículas de plata con otro tipo de técnicas como: Difracción de rayos X (XRD) para determinar la estructura cristalina de la plata; microscopía de fuerza atómica (AFM) para un análisis de superficie; microscopía electrónica de barrido (SEM) para un análisis elemental; y un análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) para medir el recubrimiento orgánico en las nanopartículas de plata

En cuanto a la cuantificación de los posibles metabolitos secundarios responsables de la reducción química, se recomienda el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, o por cromatografía de gases GC-FID ya que proporcionaría mayor información sobre los componentes del extracto acuoso de hojas de chilca (*Baccharis latifolia*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M. J. y Bermejo, P. (2007). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7), 76-96.
- Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H. y Samiei, M. (2016). Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical reviews in microbiology*, 42(2), 173-180.
- Adams, F. C. y Barbante, C. (2013). Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 3-13. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
- Amaguaña Pacheco, D. I. (2018). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductor químico el extracto acuoso de las hojas de sensitiva (*Mimosa albida*) (Bachelor's thesis, PUCE-Quito).
- Arunachalam, K. D., Annamalai, S. K. y Hari, S. (2013). One-step green synthesis and characterization of leaf extract-mediated biocompatible silver and gold nanoparticles from *Memecylon umbellatum*. *International journal of nanomedicine*, 8, 1307.
- Banerjee, P., Satapathy, M., Mukhopahayay, A. y Das, P. (2014). Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(1), 3.
- Beattie, I. R. y Haverkamp, R. G. (2011). Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal. *Metallomics*, 3(6), 628-632.
- Castillo Aguilar, B. y González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), 0-0.
- Chae, Y. J., Pham, C. H., Lee, J., Bae, E., Yi, J. y Gu, M. B. (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 94(4), 320-327.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. y Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Colorimétrica de biomoléculas (S.F.). *Universidad de Córdoba. España.* [Fecha de acceso: 15 de mayo de 2014] Disponible en URL: http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf.

- De Agredos Pascual, M. L. V. (2007). Los colores y las técnicas de la pintura mural maya. In *Anales del Museo de América* (No. 15, pp. 55-66). Subdirección General de Documentación y Publicaciones.
- De las Heras, B., Slowing, K., Benedi, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C. y Liso, P. A. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*, 61(2), 161-166.
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P. y Fiñana, I. T. (2000). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación.
- Díez, I. y Ras, R. H. (2011). Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 3(5), 1963-1970.
- Domenech Gordillo, F. N. (2017). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de *Ambrosia arborescens* (marco) como reductor químico (Bachelor's thesis, PUCE).
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G. y Eklund, P. C. (1996). *Science of fullerenes and carbon nanotubes: their properties and applications*. Elsevier.
- El-Nour, K. M. A., Eftaiha, A. A., Al-Warthan, A. y Ammar, R. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian journal of chemistry*, 3(3), 135-140.
- Faraldos, M. y Goberna, C. (Eds.). (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of pharmaceutical sciences*, 55(3), 225-276.
- Faunce, T. y Watal, A. (2010). Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine*, 5(4), 617-632.
- Fedlheim, D. L. y Foss, C. A. (2001). *Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*. CRC press.
- Fernández Segovia, I. y Fuentes López, A. (2015) Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- Ferré, J. (2004). Calibración multivariante en análisis cuantitativo. El modelo directo. *Técnicas de laboratorio*, 297, 986-9.
- Fulekar, M. H. (2010). *Nanotechnology: importance and applications*. IK International Pvt Ltd.

- Gamo-Aranda, J. y Tutor-Sánchez, J. D. (2015). Enseñar nanotecnología a través de nuestros antepasados. *MOMENTO*, (50), 56-67.
- Ganaiea, S., Tasneem, A. y Abbasi, S. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using an Otherwise Worthless Weed Mimosa (*Mimosa Pudica*): Feasibility and Process Development Towards Shape/Size Control. *Particulate Science and Technology: An International Journal*, 33(5), 37-41.
- García, A. Á. y Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Giannuzzi, L. A. y Stevie, F. A. (1999). A review of focused ion beam milling techniques for TEM specimen preparation. *Micron*, 30(3), 197-204.
- Golovina, N. B. y Kustov, L. M. (2013). Toxicity of metal nanoparticles with a focus on silver. *Mendeleev Communications*, 23(2), 59-65.
- Greenberg, A. (2009). Integrating nanoscience into the classroom: Perspectives on nanoscience education projects.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V. y Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*, 9(6), 385.
- Jafar, A., Naeem, A., Syed, U., Hassan, W., Kifayatullah, K. y Gang, P. (2017). Insight into eco-friendly fabrication of silver nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* and its potential impacts. *Environmental Chemical Engineering*, 5(4), 3266-3272.
- Jaiswal, S., Duffy, B., Jaiswal, A. K., Stobie, N. y McHale, P. (2010). Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using β -cyclodextrin as a capping agent. *International journal of antimicrobial agents*, 36(3), 280-283.
- Kaler, A., Patel, N. y Banerjee, U. C. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles. *Curr Res Inf Pharm Sci*, 11(4), 68-71.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J. y Kim, Y. K. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- Köhler, J. M., Abahmane, L., Wagner, J., Albert, J. y Mayer, G. (2008). Preparation of metal nanoparticles with varied composition for catalytical applications in microreactors. *Chemical Engineering Science*, 63(20), 5048-5055.
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V. y Brown Jr, G. E. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental science & technology*, 46(13), 6900-6914.

- Li, N., Liu, D. y Cui, H. (2014). Metal-nanoparticle-involved chemiluminescence and its applications in bioassays. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(23), 5561-5571.
- Madden, A. (2011). Welcome to nanoscience: interdisciplinary environmental explorations, grades 9-12. NSTA Press.
- Magasinski, A., Dixon, P., Hertzberg, B., Kvit, A., Ayala, J. y Yushin, G. (2010). High-performance lithium-ion anodes using a hierarchical bottom-up approach. *Nature materials*, 9(4), 353.
- Mallikarjuna, K., Narasimha, G., Dillip, G. R., Praveen, B., Shreedhar, B., Lakshmi, C. S. y Raju, B. D. P. (2011). Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum leaf extract and their characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1), 181-186.
- Mayer, J., Giannuzzi, L. A., Kamino, T., & Michael, J. (2007). TEM sample preparation and FIB-induced damage. *MRS bulletin*, 32(5), 400-407.
- Maneewattanapinyo, P., Banlunara, W., Thammacharoen, C., Ekgasit, S. y Kaewamatawong, T. (2011). An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(11), 1417-1423.
- Martí, F. B. (2002). *Química analítica cualitativa*. Editorial Paraninfo.
- Panáček, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N. y Zbořil, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(33), 16248-16253.
- Prabhu, S. y Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1), 32.
- Pal, A., Shah, S. y Devi, S. (2009). Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent. *Materials Chemistry and Physics*, 114(2-3), 530-532.
- Pradeep, T. (2012). *A Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*. Nueva Deli: McGraw Hill.
- Ramírez-Navas, J. S. (2016). Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*). *UGCiencia*, 22(1), 119-126.
- Ramya, M. y Subapriya, M. S. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles. *Int J Pharm Med Biol Sci*, 1(1), 54-61.

- Reddy, N. J., Vali, D. N., Rani, M. y Rani, S. S. (2014). Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. *Materials Science and Engineering: C*, 34, 115-122.
- Ricco, R. A., Agudelo, I. J. y Wagner, M. L. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 52(2), 161-174.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C. y Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Res Lett*, 8(1), p.318.
- Sanjukta, R. K., Samir, D., Puro, K., Ghatak, S. y Shakuntala, I. (2016). Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Plants. *Int J Nanomed Nanosurg*, 2(2).
- Santorum Saavedra, N. Y. (2017). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando el extracto de las hojas de Matico (*Piper aduncum*) como un agente reductor (Bachelor's thesis, PUCE).
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. y Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, 145(1), 83-96.
- Sondi, I. y Salopek-Sondi, B. (2004). 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.
- Song, J. Y. y Kim, B. S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(1), 79.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. y Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- Tran, Q. H. y Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives.
- Tiwari, D. K., Behari, J. y Sen, P. (2008). Time and dose-dependent antimicrobial potential of Ag nanoparticles synthesized by top-down approach. *Current Science*, 647-655.
- Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses, M. y Morocho, V. (2013). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.(Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of essential oil research*, 25(3), 233-238.
- Verma, S., Gokhale, R. y Burgess, D. J. (2009). A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *International journal of pharmaceuticals*, 380(1-2), 216-222.

- Vijay, P., Pammi, S., Kollu, P., Satyanarayana, K. y Shameem, U. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 52, 562-566.
- Xavier, V. B., Vargas, R. M. F., Minteguiaga, M., Umpiérrez, N., Dellacassa, E. y Cassel, E. (2013). Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: new applications for known products. *Industrial crops and products*, 49, 492-496.
- Zuas, O., Hamim, N. y Sampora, Y. (2014). Bio-synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Myrmecodia pendan* (Sarang Semut plant). *Materials Letters*, 123, 156-159.

ANEXOS**ANEXO 1**Certificado Taxonómico de planta chilca (*Baccharis latifolia*)

Pontificia Universidad Católica del Ecuador SEDE IBARRA	
---	---

Ibarra, 3 de diciembre del 2018

CERTIFICADO TAXONOMÍA VEGETAL

El Herbario PUCE-SI certifica que las muestras vegetales de la especie Chilca entregadas a la PUCE-Quito pertenecen:

- Familia: Asteraceae
- Género Baccharis
- Especie: *Baccharis latifolia*.

Después de haber realizado la descripción total por medio de las claves dicotómicas.



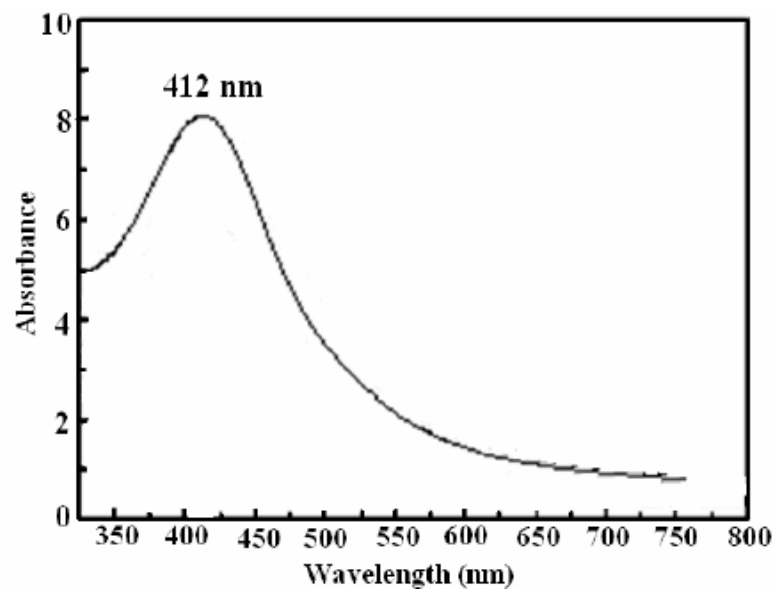
Mgs. María Fernanda López

RESPONSABLE DEL HERBARIO PUCE-SI

Av. Jorge Guzmán Rueda y Av. Aurelio Espinosa Pólit, Cda "La Victoria"
Apartado postal: 100112
Telf.: (+593) 06 2615 500 / 2615 453
Ibarra- Ecuador www.puce.edu.ec

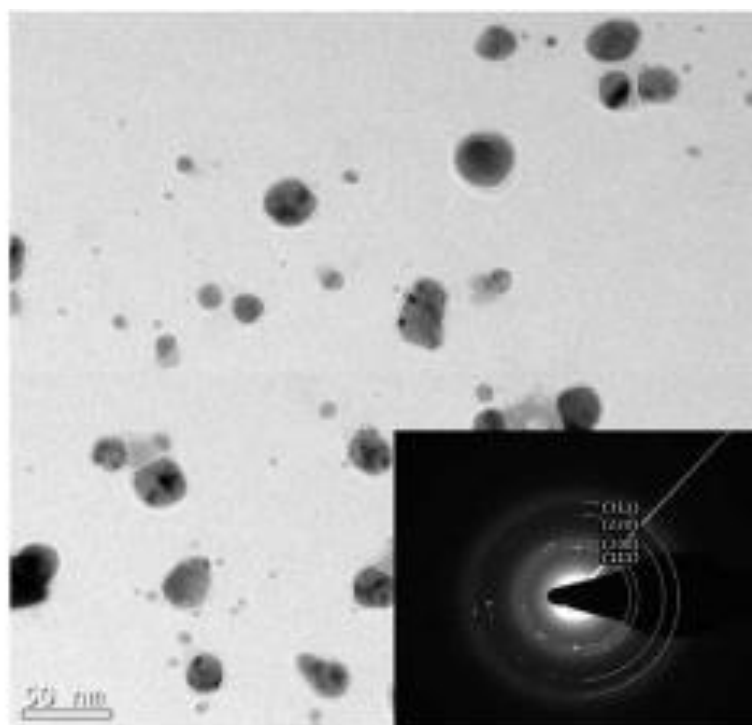
ANEXO 2

Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos vegetales



ANEXO 3

Imagen TEM de nanopartículas óptimas obtenidas a partir del extracto vegetal de magnolia (*Pierre Magnol*).



ANEXO 4

Cálculos para determinar la concentración de flavonoides con los datos obtenidos de la curva de calibración.

$$y = 0,0262 x - 0,0018$$

$$x = \frac{y + 0,0018}{0,0262}$$

donde:

y = absorbancia de muestra

$$x = \frac{(\text{absorbancia de extracto}) + 0,0018}{0,0262}$$

$$x = \frac{(0,0834 \text{ mg/L}) + 0,0018}{0,0262}$$

$$x = 3,25 \text{ mg/L}$$

$$\text{concentración real} = \frac{3,25 \text{ mg}}{1 \text{ L}} * \square\square.D$$

donde:

F.D= Factor de dilución

$$F.D = \frac{50 \text{ mL disolvente}}{0,5 \text{ mL muestra}}$$

$$F.D = 100$$

$$\text{concentración real} = \frac{3,25 \text{ mg}}{1 \text{ L}} * 100$$

$$\text{concentración real} = 325,19 \text{ mg/L}$$

$$ppm = \frac{mg}{L}$$

$$concentración\ real = 325,19\ ppm$$

ANEXO 5

Cálculos para determinar la concentración de polifenoles con los datos obtenidos de la curva de calibración.

$$y = 0,0804 x + 0,0105$$

$$x = \frac{y - 0,0105}{0,0804}$$

donde:

y = absorbancia de muestra

$$x = \frac{(absorbancia\ de\ extracto) - 0,0105}{0,0804}$$

$$x = \frac{(0,2707\ mg/L) + 0,0105}{0,0804}$$

$$x = 3,24\ mg/L$$

$$concentración\ real = \frac{3,24\ mg}{1\ L} * F.D$$

donde:

F.D= Factor de dilución

$$F.D = \frac{10\ mL\ disolvente}{0,5\ mL\ muestra}$$

$$F.D = 20$$

$$\text{concentración real} = \frac{3,24 \text{ mg}}{1 \text{ L}} * 20$$

$$\text{concentración real} = 64,73 \text{ mg/L}$$

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$\text{concentración real} = 64,73 \text{ ppm}$$

**PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR DECLARACIÓN Y
AUTORIZACIÓN**

Yo, Sandra Camila Granja Moreano, C.I. 1722441795, autora del trabajo de graduación titulado: “Determinación de flavonoides, polifenoles y azúcares reductores totales en soluciones coloidales de nanopartículas de plata preparadas con el extracto acuoso de chilca (*Baccharis latifolia*)”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 10 de enero de 2019

Sandra Camila Granja Moreano
C.I. 1722441795