

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando el extracto de las hojas de

Matico (*Piper aduncum*) como un agente reductor

Disertación previa a la obtención del título de

Licenciada en Ciencias Químicas, con mención en Química Analítica

NATHALY YESSSENIA SANTORUM SAAVEDRA

Quito, 2017

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, con mención en Química Analítica, de la candidata Nathaly Yessenia Santorum Saavedra, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: Quito, 5 de diciembre de 2016

Santiago Ampudia V., MSc.

Director de la Disertación

## **DEDICATORIA**

En este trabajo se recopila el último esfuerzo para conseguir el tan anhelado título universitario.

A pesar de que el camino ha sido duro siempre he contado con el apoyo de mis padres, Edgar Santorum y Teresa Saavedra. Papá sé que al inicio dudaste en apoyar mi decisión, pero mostraste determinación para brindarme tu ayuda y te aseguro que no te equivocaste al confiar en mí, ya que esta es una de tus mejores inversiones.

Mamá, mi madrecita bella, siempre estuviste ahí firme, luchando a mi lado contra cualquiera que me diga que no puedo. Hoy tus esfuerzos dan frutos y los recompensaré durante toda mi vida. Velaré por ti y por papá para que no les falte nada y los cuidaré con el mismo amor que me cuidaron desde que nací.

Y como no dedicarle este logro que no es el primero y espero que no sea el último al hombre que me ha acompañado durante el transcurso de mi carrera, quien a pesar de los altos y bajos que tiene la vida sigue a mi lado y es mi pilar para nunca dejarme derrotar, mi inspiración para superarme, mi novio Milton Betancourt.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi director de tesis, Santiago Ampudia por apoyarme en la etapa final de mi carrera y no dejar que desmaye ante las adversidades.

A mis amigos Edgar Fernández, Flavia Domenech y Leonardo Bustamante por acompañarme durante la carrera, compartir momentos únicos e inolvidables y sobre todo por brindarme su valiosa amistad, la cual es un tesoro invaluable.

A Catherine Muzo, quien a pesar de las dificultades que se han presentado, siempre ha estado apoyándome y guiándome para que logre mis metas.

A Charlie quien siempre estuvo dispuesto a brindar su ayuda para que culmine mi proyecto sin ningún contratiempo. Al proyecto M13438 por la financiación de reactivos, equipos y análisis SEM.

Y como no agradecerles a las personas que me inspiraron durante mi trayecto, mis profesoras, Carlotita Córdova, Gladys Acurio y Yolanda Jibaja, quienes con su ejemplo me demostraron que la química y yo somos uno. Y sobre todo compartieron sus conocimientos permitiéndome crecer cada día más en lo profesional y en lo personal.

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
TABLA DE CONTENIDOS .....	v
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ANEXOS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	4
1. NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA .....	4
1.1. HISTORIA .....	4
1.2. CONCEPTOS DE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA .....	7
1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	8

1.4. NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	9
1.5. MATICO .....	15
1.6. TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	17
1.7. EXPOSICIÓN A LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	18
1.8. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	19
CAPÍTULO II.....	32
2. MÉTODOS Y MATERIALES.....	32
2.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO .....	33
2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	34
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	35
CAPÍTULO III .....	46
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
3.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS .....	46
3.2. ACONDICIONAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SÍNTESIS .....	47
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	54
CAPÍTULO IV .....	72
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	72
4.1. CONCLUSIONES.....	72

4.2. RECOMENDACIONES .....	74
5. BIBLIOGRAFÍA .....	75
ANEXOS .....	82

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Condiciones de prueba para la optimización de síntesis .....	34
Tabla 3.1. Variación de la cantidad de extracto en la síntesis de nanopartículas de plata .....	49
Tabla 3.2. Variación de la concentración de la sal precursora en la síntesis de nanopartículas de plata.....	50
Tabla 3.3. Variación de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de plata .....	51
Tabla 3.4. Variación del tiempo en la síntesis de nanopartículas de plata .....	51
Tabla 3.5. Variación del pH en la síntesis de nanopartículas de plata .....	52
Tabla 3.6. Parámetros y condiciones óptimas de síntesis.....	55
Tabla 3.7. Tamaño aproximado de las nanopartículas de plata dependiendo del pico de absorción máxima en el espectro UV-Vis .....	56
Tabla 3.8. Compuestos químicos responsables de las bandas en los espectros IR .....	60
Tabla 3.11. Componentes de la ecuación de la recta de regresión lineal e intervalo de confianza de la recta. ....	67
Tabla 3.12. Valores para la determinación de los límites de detección y cuantificación.....	68
Tabla 3.13. Datos de señal y concentración de los blancos reactivos .....	69
Tabla 3.14. Porcentaje de recuperación de plata .....	70
Tabla 3.15. Valor teórico y práctico de la concentración de plata y porcentaje de rendimiento de la reacción.....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Vitral de la Catedral de Reims en Francia .....	5
Figura 1.2. Mural pintado con azul maya .....	6
Figura 1.3. Copa de Lycurgus .....	8
Figura 1.4. Recipiente cerámico procedente de Manises (Valencia) del siglo XV decorado con Lustre .....	9
Figura 1.5. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción de nitrato de plata .....	11
Figura 1.6. Planta de Matico, <i>Piper aduncum</i> .....	16
Figura 1.7. Principales vías de exposición de las nanopartículas de plata .....	18
Figura 1.8. Resonancia de los plasmones de superficie .....	22
Figura 1.9. Tipos de vibración de las moléculas .....	24
Figura 1.10. Esquema de un FTIR con interferómetro de Michelson .....	26
Figura 1.11. Esquema de un microscopio SEM .....	28
Figura 1.12. Esquema del espectrofotómetro de Absorción Atómica .....	31
Figura 2.1. Esquema de metodología del trabajo experimental .....	32
Figura 2.2. Espectrofotómetro UV-Vis, Cary 60.....	36
Figura 2.3. Espectrofotómetro FT-IR, Perkin Elmer Spectrum BX.....	38
Figura 2.4. Microscopio de Barrido Electrónico (SEM) Phenom World ProX .....	39
Figura 3.1. Extracto de las hojas de la planta de Matico ( <i>Piper aduncum</i> ).....	47
Figura 3.2. Nanopartículas de plata con extracto de Matico, sin variación de pH. ....	48
Figura 3.3. Nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de Matico.....	53

Figura 3.4. Espectro UV-Vis síntesis óptima de nanopartículas .....	56
Figura 3.5. Espectro FTIR del nitrato de plata (c), extracto de Matico (b) y nanopartículas de plata (a) .....	59
Figura 3.6. Imagen SEM nanopartículas de plata sintetizadas a 8.400 X .....	62
Figura 3.7. Imagen SEM nanopartículas de plata sintetizadas a 20.000 X .....	63
Figura 3.8. Imágenes SEM del tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas a 85.000 X .....	64
Figura 3.9. Imagen SEM de las nanopartículas de plata y tabla de composición elemental .....	65
Figura 3.10. Curva de calibración para la determinación de plata iónica .....	66

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1. Elección de la mejor proporción del extracto para la síntesis de nanopartículas.....	82
Anexo 2. Espectros de los extractos de las hojas de Matico .....	83
Anexo 3. Espectros de algunos parámetros de la optimización de las nanopartículas de plata.	85

## RESUMEN

El presente estudio desarrolló una alternativa de síntesis para nanopartículas de plata, representadas por sus siglas AgNPs, por reducción química, empleando como agente reductor el extracto hidro – etanólico al 50% de las hojas de Matico (*Piper aduncum*).

El matico es un arbusto perenne de la familia de la pimienta que presenta extraordinarias propiedades cicatrizantes, antibacterianas y antiinflamatorias, al emplearlo en la síntesis de nanopartículas permitió circunscribir esta metodología dentro de la química verde, ya que se alinea con los principios 3, 5 y 7 de la misma, y pueda contribuir a la preservación del medio ambiente.

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó usando 0.5 mL del extracto hidro-etanólico al 50% de Matico, en pH de 9, con agitación constante a 60 °C y durante 20 min.

Las nanopartículas de plata fueron caracterizadas mediante Espectroscopía UV-Vis para determinar el rango aproximado de tamaño de las nanopartículas, observándose un máximo de absorbancia en 409.7 nm, que corresponde a un rango de tamaño entre 14 y 35 nm; la Microscopia de Barrido Electrónico (SEM-EDX, por sus siglas en inglés) se empleó para estimar el tamaño y forma de las nanopartículas, determinando una forma cuasi - esféricas de 59.8 nm de diámetro, además con los resultados de EDX se encontró que existe un 7.2% de plata elemental en las nanopartículas; finalmente, mediante Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (FAAS, por sus siglas en inglés) se determinó la concentración promedio

de plata, detectando una concentración de 105.23 mg/L, con un porcentaje de rendimiento de reacción del 96.68 %.

Por Espectroscopía de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) se identificaron las posibles interacciones de las nanopartículas con los diferentes grupos funcionales presentes en el extracto de Matico (*Piper Aduncum*), que actúan como reductores orgánicos y se encuentran ligadas a la superficie de las nanopartículas. Los posibles compuestos reductores son los ácidos: acético, shikimico y mevalónico, por la presencia o modificación de la banda a  $1574.11 \text{ cm}^{-1}$ .

Al emplear un agente reductor orgánico como el extracto de Matico, se obtuvieron nanopartículas polidispersas y con aglomeraciones puntuales, debido a la interacción orgánica de los residuos de Matico; sin embargo, las nanopartículas presentan una gran estabilidad superior a los 120 días, al colocarlas en frascos ámbar y en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ . El extracto de Matico se avizora como un potencial reductor en la síntesis de nanopartículas de plata, de manera fácil y barata.

**Palabras clave:** nanopartículas de plata, extracto de Matico (*Piper aduncum*), SEM-EDX, UV-Vis, FAAS, FT-IR.

## ABSTRACT

In this study, silver nanoparticles were synthesized by the chemical reduction method, using Matico (*Piper aduncum*) leaves extract as a reducing agent.

Matico is a perennial shrub of the pepper family, presenting extraordinary healing, antibacterial and anti-inflammatory properties. The used extract generates a biologic alternative in the process, allowing the synthesis to be aligned with the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> green chemistry principles.

Silver nanoparticles were synthesized with 0,5 mL of hidro – ethanolic Matico extract, pH 9, constant stirring to 60 °C for 20 min. The nanoparticles were characterized by different instrumental techniques to verify that Matico extract is a potential reducing agent. First, the nanoparticle formation was size up, using UV-VIS spectroscopy, obtaining a maximum absorbance at 409.7 nm, giving a nanoparticles size range oscillates between 14 and 35 nm.

Size and shape of silver nanoparticles were estimated using Scanning Electron Microscopy (SEM); quasi - spherical nanoparticles with average diameters of 59.8 were observed. In EDX analysis, 7.2% of elemental silver was found. The silver concentration was quantified by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS), obtaining an average concentration of 105.239 mg / L, with a yield percentage of 96.68%.

Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), the possible interactions of the silver nanoparticles with the different functional groups of the Matico (*Piper Aduncum*) extract were detected, establishing possible reducing compounds like acetic, shikimic and mevalonic acids by the presence of the band at  $1574.11\text{ cm}^{-1}$ .

Polydisperse nanoparticles were obtained, with some aggregations issues due to organic interactions of Matico waste and drying process. However, the nanoparticles have a high stability even greater than 120 days at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Matico leaves extract is a viable reducing agent, exhibit strong stability in the synthesized silver nanoparticles.

**Keywords:** silver nanoparticles, Matico extract, SEM-EDX, UV-Vis, FAAS, FT-IR.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios en el campo de la nanociencia y la nanotecnología se iniciaron con las nanopartículas metálicas debido a que presentaban propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas exclusivas [1]. Las nanopartículas más utilizadas son las de plata y oro debido a su aplicabilidad en diversas áreas, las cuales van desde bactericidas hasta usos artísticos, en muchos de los casos, sin conocer el porqué de sus singulares características.

Las nanopartículas de plata se pueden sintetizar por diversos medios, el más común es la reducción química, en la cual se emplean reductores como citrato de sodio o boro hidruro de sodio [2]. Al emplear reductores químicos se ocasiona daños al medio ambiente, por lo cual se desarrollaron métodos biológicos que permitan reducir el uso de productos químicos.

Los métodos biológicos son considerados una síntesis “verde”, la cual pretende combinar las propiedades del elemento, con las cualidades curativas que brindan las plantas [1,3].

En este trabajo se empleó las hojas de la planta de Matico (*Piper aduncum*), las cuales presentan propiedades cicatrizantes, antibacterianas y microbiológicas, que, al ser combinadas

con la acción bactericida de las nanopartículas de plata, producirá un efecto sinérgico antimicrobiano.

Este trabajo pretende sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata empleando el extracto hidro - etanólico de las hojas de Matico (*Piper aduncum*) como agente reductor. Para verificar que el potencial reductor del extracto en la síntesis.

A continuación, se plantea la distribución del trabajo para una mejor comprensión del mismo.

En el Capítulo I se detallan la historia de la nanotecnología, conceptos de nanociencia y nanotecnología, métodos de síntesis, propiedades, aplicaciones, toxicidad, exposición y caracterización de las nanopartículas de plata. Asimismo, características y propiedades de la planta de Matico (*Piper aduncum*), la cual fue empleada en la síntesis de las nanopartículas.

En el Capítulo II se describe la metodología empleada para la optimización de la preparación del extracto y el método de síntesis de las nanopartículas. De la misma manera, se detalla la instrumentación y la preparación de la muestra para la caracterización de las nanopartículas empleando: Espectroscopía UV-Vis, Espectroscopía de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FT-IR) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM - EDX). Finalmente, Espectroscopía de Absorción Atómica, la cual fue empleada para la cuantificación del contenido de plata presente en las nanopartículas.

En el Capítulo III se exhibe la discusión de los resultados obtenidos en el estudio.

Finalmente, en el Capítulo IV se detallan las conclusiones y recomendaciones para el estudio realizado.

# CAPITULO I

## 1. NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

### 1.1. HISTORIA

En la antigüedad los términos de nanociencia y nanotecnología no eran conocidos; no obstante, se empleaban empíricamente compuestos y principios nanotecnológicos en la fabricación y uso de nanopartículas, las cuales permitían obtener diversas aplicaciones principalmente decorativas basadas en una variada gama de colores [4].

Los primeros usos de las nanopartículas se dieron en la edad media, donde los artesanos elaboraban vitrales a partir de polvo o diluciones de metales con vidrio y de esta manera se generaban diversos colores (ver Figura 1.1.), desconociendo el por qué de esta singular variación de tonalidades. En la actualidad, se conoce que las nanopartículas de metales como el oro y la plata pueden generar diferentes matices según el tamaño de la nanopartícula que se emplee [4].



**Figura 1.1. Vitral de la Catedral de Reims en Francia [5]**

Otro ejemplo de aplicaciones nanotecnológicas se presentó en Mesoamérica, donde se empleaba el color azul maya para pintar los murales (Figura 1.2.), éste tenía un origen desconocido y al mismo tiempo presentaba diversas cualidades que lo hacían excepcional, como su durabilidad a través de tiempo y resistencia a la luz. Así mismo, estudios realizados en la actualidad demostraron su resistencia a la decoloración al ser atacado con ácido nítrico, agua regía, sosa caustica e hipoclorito de sodio, convirtiendo a su naturaleza en un misterio para aquella época. Hoy en día se conoce que este color era una mezcla de colorante índigo y un tipo de arcilla, la cual poseía una estructura con cavidades de tamaño nanoscópico, donde se encontraban atrapadas las moléculas de índigo y generaban un color estable y de larga duración [5].



**Figura 1.2. Mural pintado con azul maya [6]**

Pero no solo el uso empírico de nanopartículas permitió que la nanociencia y la nanotecnología fueran desarrollándose; también, algunos de los conocimientos de la nanotecnología fueron expuestos por científicos que a mediados del siglo XX soñaban con un mundo diminuto y las ventajas que se podrían obtener al explotarlo.

Los primeros indicios de la nanotecnología fueron presentados indirectamente en 1959 por el físico norteamericano Richard Feynman, en una conferencia titulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, en la cual presentó la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular, construir cosas pequeñas que reemplacen a las grandes, al mismo tiempo manteniendo sus propiedades y permitiendo ahorrar espacio, y la manipulación átomo por átomo y molécula por molécula para lograr crear nuevos compuestos con características especiales [7].

Mendoza y Rodríguez [7], mencionan que Feynman dijo: “los problemas de la química y la biología pueden ser en gran parte resueltos si nuestra habilidad para ver lo que estamos haciendo y para hacer cosas a nivel atómico finalmente es desarrollada [...] un desarrollo que finalmente no puede ser evitado”.

## 1.2. CONCEPTOS DE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

En la actualidad los términos de nanociencia y nanotecnología han dado un giro revolucionario en el mundo. Todos los países, intentan involucrarse en esta nueva era, donde descubrir nuevas formas de emplear y crear materiales a nanoescala está en auge.

Nanociencia es el estudio de los fenómenos y la manipulación de los materiales a escala nanométrica y nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica [7].

Con el conocimiento y la comprensión de estos términos, se han realizado grandes avances en el estudio de la nanotecnología, los cuales han permitido conocer el comportamiento de los nanomateriales y sus diversas propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas diferentes a las del elemento de partida [8]. Gracias a estas propiedades se pueden crear nuevos compuestos, productos o materiales con propiedades innovadoras [1].

### 1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las nanopartículas tienen sus tres dimensiones en un rango de 100 nm menos [9]. Las más usadas son las nanopartículas metálicas debido a sus interesantes efectos ópticos y electrónicos, entre ellas se emplean más las nanopartículas de metales nobles, siendo más utilizadas las de plata y oro, por su amplio rango de aplicaciones [10].

Durante siglos, se han empleado nanopartículas de plata, aunque el primer ejemplo reconocido es la copa de Lycurgus del siglo IV d. C. (Figura 1.3.), la cual posee un vidrio coloreado que dispersa la luz verde y transmite luz roja. Esto se debe a que en su interior posee nanopartículas metálicas de unos 70 nm formadas por una aleación de plata (70%) y oro al (30%) [11].



**Figura 1.3. Copa de Lycurgus [11]**

Así mismo, a partir del siglo XII en España existen numerosos ejemplos de decoración cerámica con nanopartículas, como el Lustre dorado (Fig. 1.3.), que es una decoración cerámica que contiene una mezcla de almagre (óxido de hierro), óxido de cobre y monedas de plata, los cuales generan un efecto de brillo metálico en la superficie de las cerámicas [1].



**Figura 1.4. Recipiente cerámico procedente de Manises (Valencia) del siglo XV decorado con Lustre [1]**

#### 1.4. NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata poseen propiedades desinfectantes, antimicrobianas y cicatrizantes lo cual ha incentivado su estudio desde la prehistoria [1]. Se han realizado diversas investigaciones para demostrar que el tamaño y forma de las nanopartículas de plata influye en su poder bactericida, de esta manera mientras más pequeño sea el tamaño de la partícula,

mayor será la superficie de contacto y su efecto antimicrobiano incrementará. El tamaño óptimo para las nanopartículas está entre 1 – 10 nm, ya que se genera una mayor interacción con la membrana celular bacteriana [3]. Monge, M. [1], menciona que la agregación de nanopartículas de plata en vendajes permite controlar procesos inflamatorios mediante la inhibición de citoquinas.

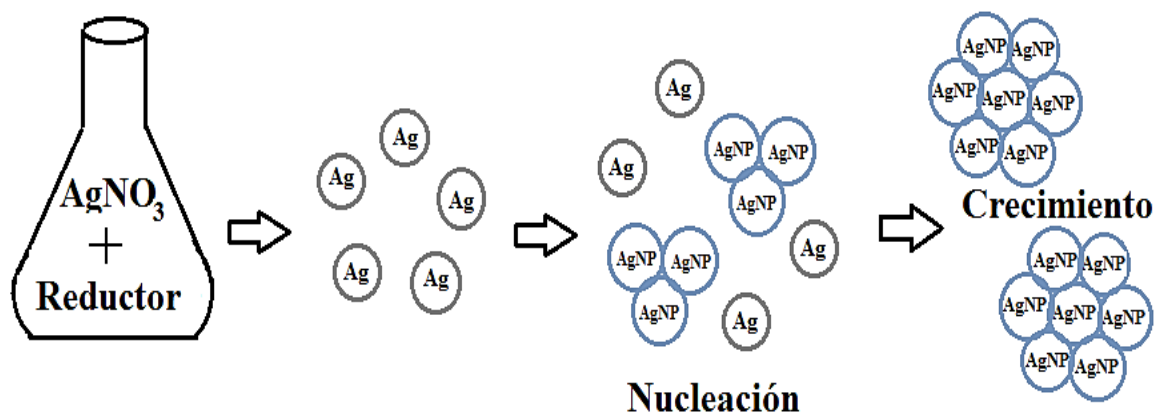
Las nanopartículas de plata presentan una gran reactividad, principalmente con compuestos proteicos como enzimas, ADN y ARN, causado por las interacciones con grupos tiol, carboxilato, fosfato, hidroxilo, imidazol, indol o amina, desencadenando una serie de reacciones que impiden la formación de procesos microbianos [12].

#### 1.4.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Hoy en día se conocen dos enfoques para la síntesis de nanopartículas y nanomateriales, por *top-down* o *bottom-up*. El método *top-down* o de arriba hacia abajo requiere de energía y desarrolla nanomateriales mediante grabado, recubrimiento o labrado, dependiendo de la técnica de ensamblaje empleada, ya sea litografía, deposición o tallaje mecánico, las cuales permiten definir las características deseadas. El método *bottom-up* o de abajo hacia arriba los nanomateriales se producen átomo por átomo o molécula por molécula generando sitios reactivos, se usan técnicas de química supramolecular y auto ensamblaje [7].

#### 1.4.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La síntesis de nanopartículas de plata se puede realizar por diversos métodos. Generalmente, tiene tres componentes principales: un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante. El método más empleado es la dilución coloidal o reducción química, donde se produce la reducción de los iones plata en dos etapas diferentes de nucleación y crecimiento [1]. De esta manera, al emplear nitrato de plata como precursor metálico y combinarlo con un agente reductor se generan en primer lugar átomos de plata libres, los cuales se agrupan en núcleos y crecen originando las nanopartículas de plata, tal como se muestra en la Figura 1.4.



**Figura 1.5. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción de nitrato de plata**

### 1.4.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS

La síntesis de AgNPs se puede llevar a cabo por dos métodos, el propuesto por Lee-Meisel y el de Creighton. El método de Lee-Meisel es una variación del método de Turkevich para la obtención de nanopartículas de oro, empleando nitrato de plata como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor, obteniéndose nanopartículas con una amplia distribución de tamaño. En el método de Creighton se emplea nitrato de plata como precursor metálico y borohidruro de sodio como agente reductor, consiguiéndose nanopartículas de aproximadamente 10 nm. En los dos métodos mencionados no es necesario el uso de un agente estabilizante, ya que las capas eléctricas que se forman alrededor de las nanopartículas inhiben la agregación de las mismas [1].

Con base en los métodos expuestos y empleando nitrato de plata como precursor metálico Monge [1], describe variaciones en el uso del agente reductor, empleándose ácido ascórbico, polioles y monosacáridos. Al usar ácido ascórbico se obtiene nanopartículas de plata de hasta de 120 nm; al emplear polioles, que son agentes reductores débiles, se obtienen nanopartículas de aproximadamente 40 nm; y al utilizar monosacáridos, se obtienen nanopartículas de aproximadamente 5 nm [1]. Con el uso de monosacáridos en la síntesis de nanopartículas de plata se generaron nuevos métodos de síntesis biológicos, denominados “verdes”, los cuales son amigables con el medio ambiente. En estos métodos es posible emplear microorganismos como levaduras, bacterias, hongos y extractos de plantas [3].

La síntesis “verde” de nanopartículas pretende combinar las propiedades del elemento, con las cualidades curativas que brindan las plantas. Por ejemplo, se puede emplear la planta de Matico por sus propiedades cicatrizantes, antibacterianas y microbiológicas, las cuales pueden combinarse con la acción bactericida de las nanopartículas de plata, producirá un efecto sinérgico antimicrobiano [1,3].

En la revista de agentes antimicrobianos, Krishnan, V. *et al* [13], se presenta un estudio de la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando el extracto acuoso de la fruta de pimienta negra (*Piper nigrum*) a 80 °C, empleando un método de síntesis biológico, que permite reducir el uso de reactivos químicos como agentes reductores. Se obtuvieron nanopartículas con un pico máximo de resonancia de plasmón superficial a los 441 nm, empleando Espectroscopía UV-Vis. En el análisis TEM se mostraron nanopartículas de forma esférica con un tamaño promedio de 20 a 40 nm. Se realizaron diversas pruebas encontrando una prometedora actividad anticancerígena contra las células del cáncer de mama y de faringe [13].

#### 1.4.4. APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata tienen un amplio rango de aplicaciones, se utilizan en electrónica, textiles, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria farmacéutica y alimentaria [14].

En el ámbito médico, las nanopartículas de plata se utilizan en apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumentos quirúrgicos y prótesis óseas, para evitar el crecimiento bacteriano. Así también, se está investigando el uso de las nanopartículas de plata en tratamiento de enfermedades como el VIH-1, ya que en estudios *in vitro* se ha demostrado que las nanopartículas interactúan con el virus inhibiendo la capacidad de este para unirse a las células huésped [14].

La actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata es ocasionada por la interacción con la membrana, la pared celular, aminoácidos y enzimas, obstrucción en el reclutamiento de energía, interacciones con el ADN y ARN y generación de especies reactivas de oxígeno [15].

Entre las aplicaciones específicas de las nanopartículas de plata se encuentran los hilos de sutura en seda, los cuales al poseer una capa de nanopartículas de plata que ayudan a prevenir las infecciones y contribuyendo a la cicatrización de los tejidos. Este tipo de hilo es considerado absorbible y de multifilamento; para su elaboración se emplea una técnica de ablación láser y se soportan las nanopartículas obtenidas a lo largo de la superficie del hilo de seda [16].

Otra aplicación es la elaboración de materiales dentales con nanopartículas de plata, las cuales son incorporadas a soluciones acuosas para la irrigación de raíces dentales, nuevos adhesivos o compositos. Además, se usan en el revestimiento de implantes de titanio, en formulaciones de

medicamentos, en enjuagues bucales para detener el avance de las caries y en enfermedad periodontal [17].

Finalmente, las nanopartículas se han empleado en productos de uso diario como: aerosoles, detergente, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas de paredes, productos cosméticos y prendas de vestir; logrando rápidos efectos antimicrobianos e incluso antiolor [14].

## 1.5. MATICO

La planta de Matico (*Piper aduncum*), es conocida también como hierba de soldado o chuzalongo (Figura 1.5.), es un arbusto perenne que puede alcanzar de 1 a 4 m de altura, familia de la pimienta. Tiene ramas grises y hojas aromáticas de color verde brillante, su fruto es de color negro y posee una semilla pequeña, oscura en su interior. Se distribuye en toda la cuenca amazónica, Perú, Brasil, Colombia, Paraguay, Bolivia y Ecuador. En Ecuador crece en la región interandina, entre 3000 y 3700 msn. Además, se lo puede encontrar en la orilla de los caminos y en la cordillera cerca de los matorrales [18]. Al mismo tiempo, en el Ecuador existe dos especies de Matico, *Piper aduncum* L. principalmente en las zonas del Carchi y Orellana y *Aristeguietia glutinosa* (Lam.) R.M. King y H. Rob, en Tungurahua y Pichincha [19].



**Figura 1.6. Planta de Matico, *Piper aduncum***

Presenta propiedades cicatrizantes, antibacterianas y antiinflamatorias debido a los principios activos que posee en sus hojas y ramas: aceites esenciales, ácido tánico, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides y triterpenoides. El principal componente cicatrizante del Matico es un tanino denominado proantocianidina, el cual se encuentra en un 5.7% en las hojas de la planta. Es por esto que el Matico es muy empleado en heridas, quemaduras, inflamaciones, así como otras condiciones, y cuando se encuentra en contacto con heridas o llagas recientes, detiene y reduce los derrames sanguíneos y ayuda a la cicatrización [18].

Los estudios farmacológicos realizados confirman los efectos cicatrizante, antiinflamatorio, antiséptico e inhibidor del Matico sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y en los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Trichophyton mentagrophyte* [20].

En esta disertación se realizaron pruebas preliminares empleando las hojas de *Aristeguietia glutinosa* (Lam.) R.M. King y H. Rob. y las hojas de *Piper aduncum* L. para la síntesis de nanopartículas de plata. El trabajo se realizó con la especie *Piper aduncum* L. debido a que la cantidad de extracto empleada para la síntesis fue menor.

## 1.6. TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

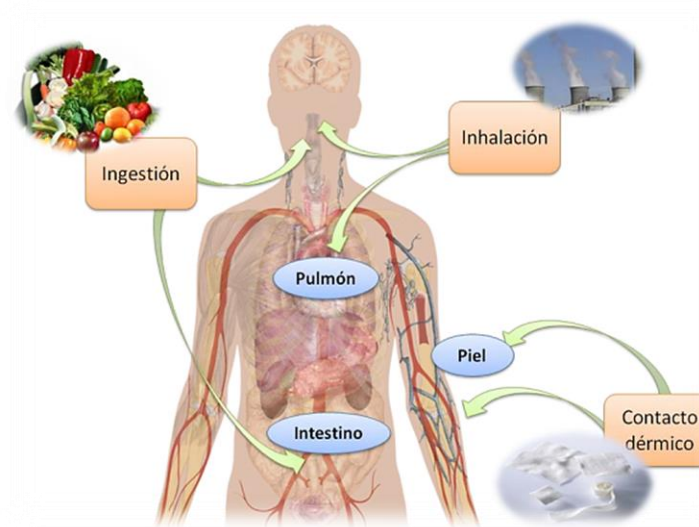
La toxicidad de las nanopartículas de plata es por lo general baja, debido a que los productos de consumo desprenden pequeñas cantidades de plata, que no tienen consecuencias importantes para la salud [21]. Sin embargo, el consumo de nanopartículas de plata en dosis altas o crónicas, puede ocasionar efectos adversos para la salud como: edemas pulmonares, machas marrones en la piel y órganos del cuerpo (argiria), entre otros [22].

Estudios en ratones han demostrado que la toxicidad es dependiente de la concentración, como las concentraciones de nanopartículas de plata entre 5 µg/mL inducen a necrosis o apoptosis de las células madre espermatogoniales de los ratones [23].

Para conocer las concentraciones exactas en que las nanopartículas pueden ser potencialmente tóxicas, se están realizando estudios en animales.

## 1.7. EXPOSICIÓN A LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Con el avance de la nanotecnología y el descubrimiento de nuevas aplicaciones de las nanopartículas de plata es necesario conocer las vías de exposición y la toxicidad de las mismas. Las principales vías de exposición son la oral, respiratoria y dérmica; sin embargo, con el implemento de nanopartículas de plata en productos de higiene materna, el sistema urogenital femenino se ha convertido en una potencial vía de exposición (Figura 1.6) [14].



**Figura 1.7. Principales vías de exposición de las nanopartículas de plata [14]**

Al ser las vías de exposición de las nanopartículas diversas, se realizó un estudio en donde se reveló que las nanopartículas de plata pueden presentar citotoxicidad al interactuar con proteínas y enzimas a nivel intracelular. A pesar de esto, los científicos sugieren que se aborde el tema más afondo desde un punto de vista médico [1].

## 1.8. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

### 1.8.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La técnica de espectroscopía ultravioleta-visible es una de las más utilizadas en el análisis químico para la caracterización de materiales ya que brinda información cualitativa y cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. El espectro visible se extiende entre 380 y 780 nm aproximadamente, mientras que el ultravioleta está entre 190 y 380 nm [24].

La absorción de la radiación de la luz provoca la excitación de los electrones desde los orbitales de más baja energía (HOMO, por sus siglas en inglés) hacia los orbitales de más alta energía (LUMO, por sus siglas en inglés) de las moléculas o átomos. Esta absorción de energía puede ser identificada mediante la técnica de absorción, ya que, es un fenómeno que ocurriría a una longitud de onda específica, característica del material y de su pureza [3].

Los espectrofotómetros están compuestos principalmente de: una fuente de radiación, selectores de longitud de onda, un recipiente para la muestra, un detector de radiación y un procesador de la señal [25].

Las fuentes de radiación emiten luz en un espectro continuo. Para la luz ultravioleta se emplean lámparas de deuterio o hidrógeno debido a que presentan un bulbo de cuarzo el cual es transparente a la luz ultravioleta. En la región visible se emplean lámparas de filamento de wolframio o de arco de xenón.

El selector de longitud de onda nos permite obtener un haz monocromático o una banda dependiendo del analito empleado, para ellos se emplean filtros y monocromadores.

Los filtros pueden ser de interferencia, para seleccionar longitudes de onda en función de la dirección del haz y de absorción para absorber la longitud de onda deseada.

Los monocromadores, están compuestos por: una rendija de entrada, un lente colimador, elementos dispersivos (prisma o redes de difracción), un lente focalizador y una rendija de salida.

Los recipientes de muestras para la región ultravioleta pueden ser de cuarzo o sílice, debido a que permiten el paso de la luz ultravioleta. En la región visible se emplean celdas de plástico y de vidrio.

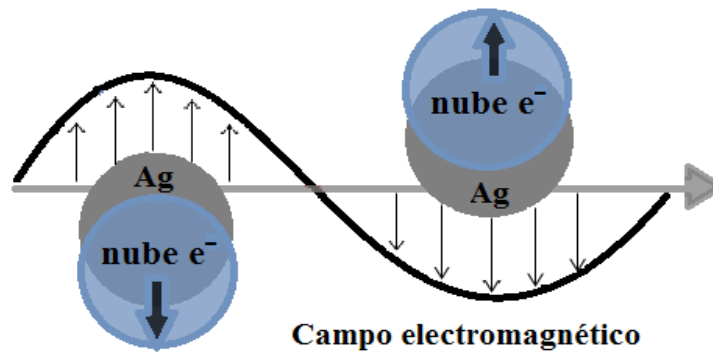
Los detectores proporcionan la señal eléctrica correspondiente a la potencia del haz de radiación. Existen cuatro tipos de detectores: fototubo multiplicador, celdas fotovoltaicas, diodos de silicio y dispositivo de transferencia de carga [25].

El espectrofotómetro mide la transmitancia de la muestra empleada, o la absorbancia que es el logaritmo negativo de la transmitancia ( $A = -\log T$ ). Para obtener la concentración de la muestra se emplea la Ley de Lambert y Beer, en la cual se detalla que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito. La ecuación empleada es:

$$A = -\log T = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1.1)$$

Donde **a** es la absorbancia medida en unidades de absorbancia,  **$\epsilon$**  es el coeficiente de excitación molar o absorptividad en L/mol.cm, **b** el camino óptico o diámetro de la celda empleada en cm y **c** la concentración en mol/L [24].

En las nanopartículas metálicas la absorción de la luz se produce por la resonancia de plasmones de superficie (RPS). Se encuentra ausente en los átomos individuales o en materiales en bulto, por lo cual es considerada un efecto de tamaño [2]. Este efecto se muestra a continuación en la Figura 1.7.



**Figura 1.8. Resonancia de los plasmones de superficie**

El plasmón superficial se genera por las excitaciones colectivas de los electrones presentes en la interface entre un conductor y un aislante, este fenómeno de las nanopartículas metálicas se describe como ondas electromagnéticas evanescentes. Debido a esto, la forma y la intensidad del espectro UV-Vis se ven influenciado por el tamaño, la forma, la naturaleza química e incluso el entorno químico [16].

En las nanopartículas de plata, la RPS se produce en un rango que va desde 390 a 420 nm [26], presentando un máximo de absorción cerca de los 400 nm cuando son esféricas y de tamaño pequeño. De la misma manera, la magnitud del pico y su ancho dependen del tamaño y de la forma de la nanopartícula. En nanopartículas esféricas se presenta un solo pico de resonancia de plasmón superficial, mientras que en nanopartículas anisotrópicas se pueden presentar dos o más picos [27].

### 1.8.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (FT-IR).

La espectroscopía de infrarrojos es empleada en la caracterización de nanopartículas debido a que nos permite analizar las posibles interacciones de las nanopartículas con los diferentes grupos funcionales presentes en el extracto de Matico [28].

El espectro infrarrojo abarca tres regiones denominadas: cercano, medio y lejano. El infrarrojo cercano comprende la radiación con longitud de onda entre 12800 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , el medio va de 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$  y el lejano de 200 a 10  $\text{cm}^{-1}$ .

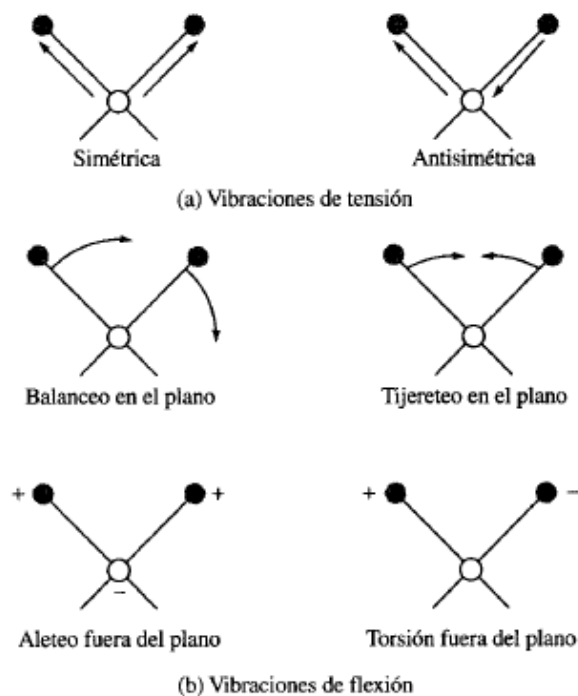
Además, se puede dividir al espectro infrarrojo en dos zonas: la zona de la huella digital que comprende números de onda entre 1500 y 400  $\text{cm}^{-1}$  y la zona de los grupos funcionales entre 4000 y 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

En esta técnica se produce la vibración y rotación de las moléculas; generando un cambio en su momento dipolar. Cuando la frecuencia de radiación incidente coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural de la molécula se produce una transferencia neta de energía, ocasionando un cambio en la amplitud de la vibración molecular y la absorción de la radiación.

Existen diferentes tipos de vibración y rotación de las moléculas:

- *Vibraciones de tensión*: se da por cambios en la distancia interatómica en el eje de enlace entre dos átomos.
- *Vibraciones de flexión*: se producen por un cambio en el ángulo entre dos enlaces, existen 4 tipos: tijereteo, balanceo, aleteo y torsión.

En la Figura 1.8., se pueden observar los tipos de vibración que presenta una molécula.



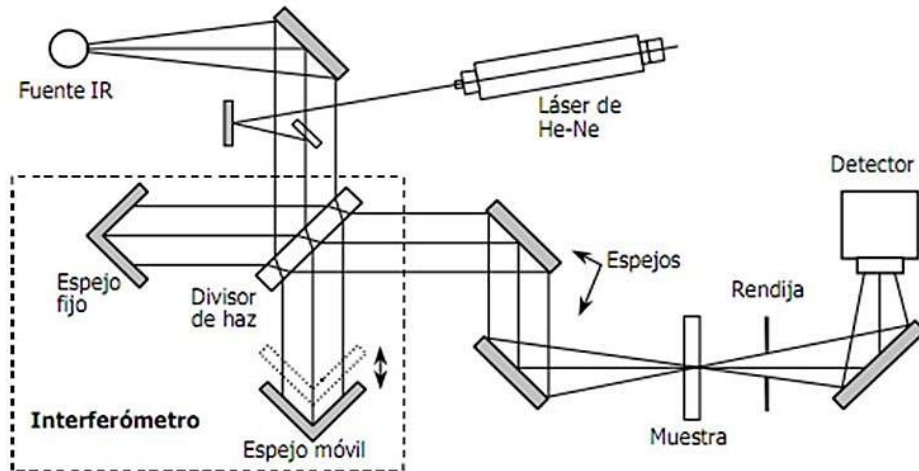
**Figura 1.9. Tipos de vibración de las moléculas [25]**

La absorción de la radiación se presenta en moléculas heteronucleares y polares, además del anhídrido carbónico y el agua; las moléculas homonucleares (halógenos, nitrógeno, oxígeno e

hidrógeno) no absorben en esta región. Para eliminar la absorción del anhídrido carbónico y el agua se trabaja con un espectro de fondo, denominado background.

Existen dos tipos de instrumentos comerciales basados en el principio de esta técnica: los dispersivos, que poseen una fuente, un monocromador, un compartimiento para la muestra y un detector; y los más usados en la actualidad, los equipos con transformada de Fourier (FTIR), que poseen una fuente, un interferómetro, un compartimiento para la muestra y un detector.

Los FTIR emplean un interferómetro de Michelson generan haces de luz con caminos ópticos diferentes, una parte del haz pasa a un espejo fijo y otra a un espejo móvil; cada uno con diferentes caminos óptico; ocasionando interferencias constructivas y destructivas que dan origen a un interferograma. Para obtener los espectros de absorción a partir del interferograma se emplean algoritmos que cambian los valores del dominio. A continuación, en la Figura 1.9., se muestra el esquema de FTI con interferómetro de Michelson [25].



**Figura 1.10. Esquema de un FTIR con interferómetro de Michelson [29]**

### 1.8.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El análisis de nanopartículas de plata por SEM nos permite obtener la forma y tamaño de las nanopartículas y a su vez el porcentaje de los elementos que se encuentran en ellas. Se obtienen imágenes en 3D, con una resolución comprendida entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio empleado [30].

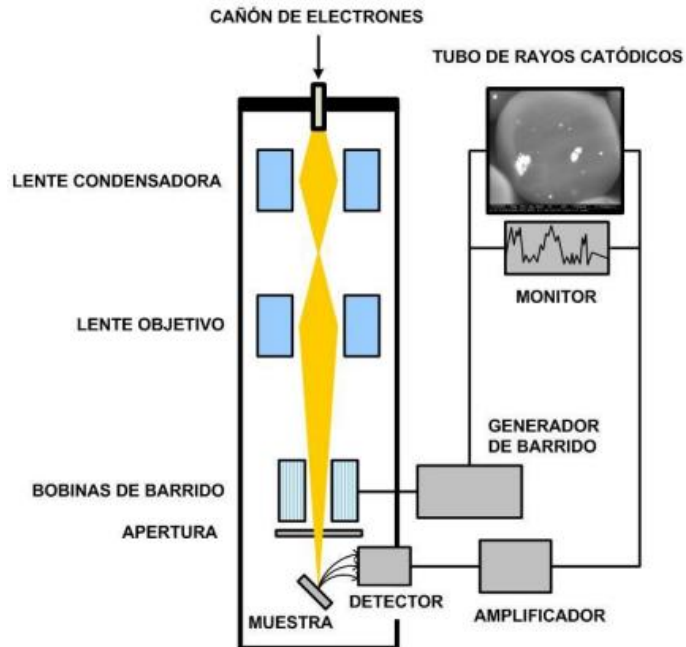
Para la determinación de la distribución y el porcentaje de los elementos presentes en las nanopartículas se empleó un detector EDX.

La microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se basa en el principio de la microscopia óptica, sustituyendo el haz de luz por un haz de electrones, para conseguir una mejor resolución [31].

En esta técnica se emplea un microscopio electrónico de barrido, el cual proporciona una imagen topográfica ampliada de la muestra. El aumento de la imagen se debe a la relación entre las dimensiones de la imagen final y el área de la muestra [30].

El funcionamiento del microscopio consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra. Para que la muestra pueda ser analizada debe ser conductora; cuando la muestra carece de esta propiedad, generalmente se la recubre con una fina capa de oro o carbón, otorgándole propiedades conductoras. La técnica empleada para la preparación de la muestra se denomina *sputtering* o pulverización catódica [31].

Los tres ejes principales de la técnica son, la fuente de electrones que ilumina la muestra, las lentes electromagnéticas que dirigen el haz de electrones hacia la muestra y el sistema que capta la señal del haz y la transforma en una imagen [32]. En la Figura 1.10., se aprecia el esquema de un microscopio SEM.



**Figura 1.11. Esquema de un microscopio SEM [30]**

Se pueden emplear tres tipos de fuentes para generar electrones [32]:

- Filamento de tungsteno: es el más económico, produce un haz de mayor tamaño, pero de corta duración.
- Filamento de hexaboruro de lantano: es más caro, necesita un vacío mayor y genera un haz de mayor duración y más fino.
- Emisor de efecto de campo: es más caro y por ende necesita un mayor vacío, pero genera un haz más fino.

La señal emitida por el haz de electrones al incidir sobre la muestra puede ser captada por varios detectores:

- Detector de electrones secundarios (SE): ofrece una imagen topográfica de gran resolución en blanco y negro de la superficie de la muestra.
- Detector de electrones retrodispersados (BSE): ofrece una imagen de menor resolución de la superficie de la muestra y es sensible a la variación en el número atómico de los elementos presentes en la superficie; generando imágenes con distintos tonos de gris, en las zonas que presentan elementos con variación en el número atómico.
- Detector de rayos X (EDX): ofrece información analítica cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes en la superficie de la muestra; debido a que la energía procedente de cada rayo X emitido es característica a cada elemento.
- Detector de rayos X (WSD): es similar al EDX, sin embargo, es capaz de diferenciar los picos de elementos con energías de emisión muy cercanas y detectar concentraciones bajas.
- Detector de electrones retrodisperso (BSED): aporta información de la estructura cristalina de la muestra, producida por los electrones que han sido difractados por la superficie de la muestra [33].

#### 1.8.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (FAAS)

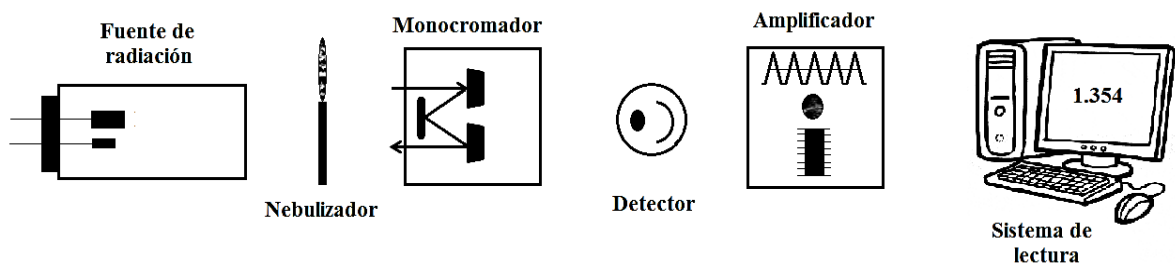
La espectroscopia de absorción atómica (FAAS por sus siglas en inglés), se empleó para la cuantificación del contenido de plata presente en las nanopartículas sintetizadas.

Es una técnica empleada para la detección y determinación de elementos químicos, en especial metálicos [34]. Para poder analizar los compuestos de una muestra, estos deben romperse en los átomos que los constituyen. Debido a esto, la muestra en solución pasa a través de un atomizador, donde es nebulizada mediante la mezcla de un flujo de gas oxidante y combustible. Finalmente es transportada a una llama donde se produce la atomización [25].

Un espectrofotómetro de Absorción Atómica está constituido por:

- Fuente de radiación: se emplean lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos. Las de cátodo hueco son las más empleadas, mientras que las de descarga sin electrodos se usan en análisis de elementos volátiles. Aquí se produce la excitación de los átomos del elemento y la emisión de radiación característica al mismo.
- Nebulizador: reduce el tamaño de las gotas de la solución.
- Monocromador: es un selector de longitud de onda que presenta ventanas de entrada y salida y rejillas de difracción.
- Detector: recibe la señal óptica enviada, generalmente se emplea un fototubo multiplicador, los cuales detectan y amplifican la señal [25].

En la Figura 1.11., que se muestra a continuación, se pueden observar las partes principales del espectrofotómetro de Absorción Atómica.

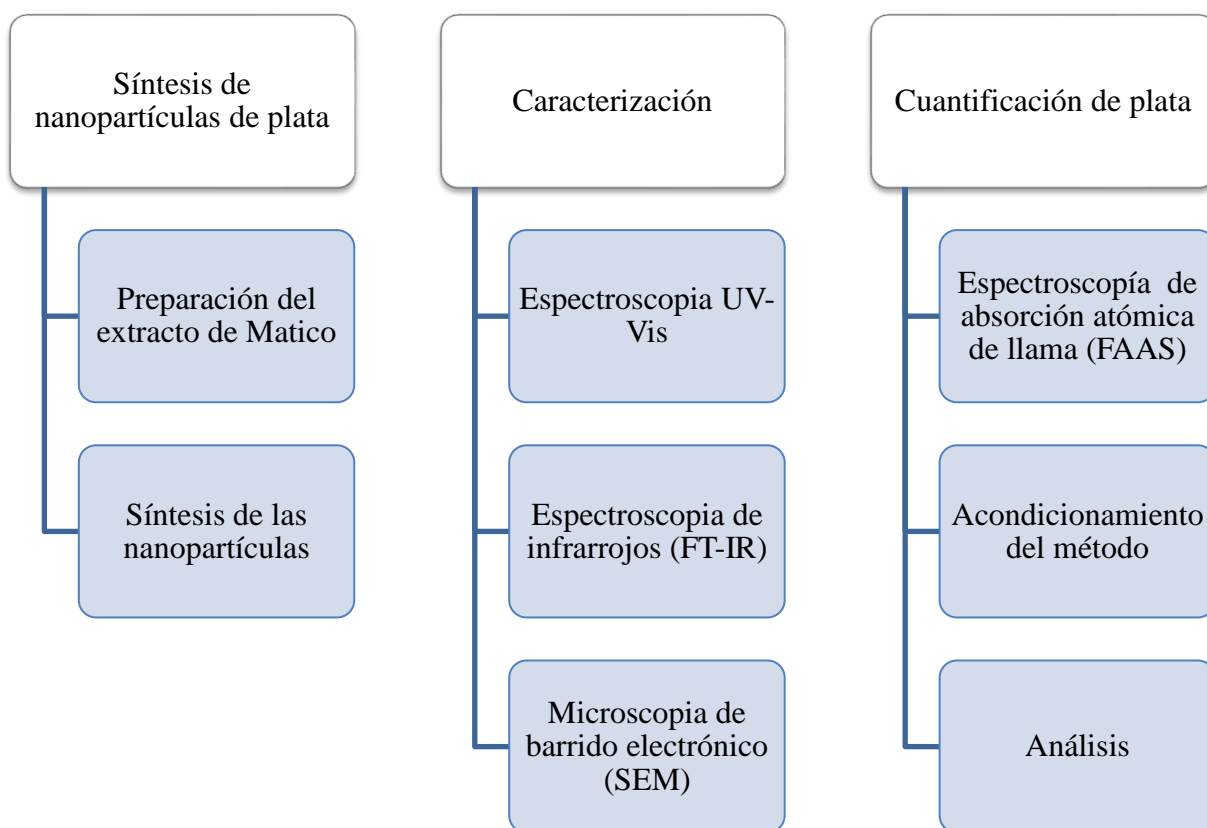


**Figura 1.12.** Esquema del espectrofotómetro de Absorción Atómica [35].

## CAPÍTULO II

### 2. MÉTODOS Y MATERIALES

El trabajo experimental se desarrolló en varias etapas, las cuales se encuentran detalladas a continuación, en la Figura 2.1.



**Figura 2.1. Esquema de metodología del trabajo experimental**

## 2.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Para la preparación del extracto se emplearon las hojas de la planta de Matico (*Piper Aduncum*), las cuales fueron recolectadas en el sector de Carapungo, provincia de Pichincha. Las hojas se lavaron y secaron a la sombra durante una semana. Adicionalmente, se secaron a 50 °C en estufa (marca P Selecta 200) por 24 horas.

La selección de la proporción agua/etanol se estableció a través de la optimización del método con extractos hidro – etanólicos al 25%, 50% y 75 %. De la misma manera, se realizaron síntesis empleando agua y etanol por separado. Se estableció que la proporción con mejores resultados fue la de 50%. (Ver anexo 1)

La preparación del extracto se realizó basándose en los procedimientos descritos por Hurtado, M. [15]. En un Erlenmeyer se pesó 1 g de muestra lavada, secada y triturada con un mortero y pistilo. Se añadieron 20 mL de la disolución agua/etanol al 50%, agitándose la solución a velocidad constante (3400 rpm) por 30 min y se filtró la mezcla al vacío, para análisis posteriores. El extracto se almaceno en un frasco ámbar en refrigeración.

## 2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

En la síntesis de las nanopartículas de plata se empleó como precursor metálico el nitrato de plata grado reactivo ( $\text{AgNO}_3$ ) 1mM (marca Scharlau, 99.8% de pureza) y como agente reductor el extracto de las hojas de Matico (*Piper aduncum*).

### 2.2.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE SÍNTESIS

Para optimizar el método de síntesis de las nanopartículas de plata se variaron los parámetros de la síntesis: cantidad del extracto, temperatura, pH, tiempo de reacción y concentración de nitrato de plata. Se variaron los parámetros uno por uno, tomando en cuenta valores referenciales descritos por Patel, U. *et al* [36], en cada caso. En la Tabla 2.1 se muestran los valores referenciales de cada parámetro.

**Tabla 2.1. Condiciones de prueba para la optimización de síntesis**

<b>Cantidad de extracto (mL)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Ph</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>[AgNO<sub>3</sub>] (mM)</b>
0,5	45	5	10	0,1
1,0	50	6	15	0,5
1,5	55	7	20	1,0
2,0	60	8	25	5,0
2,5	65	9	30	10,0
3,0		10		

Se prepararon 150 mL de una solución 1 mM de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), tomando para la síntesis 20 mL de la solución de  $\text{AgNO}_3$  en un Erlenmeyer a 60 °C, se agregaron 0.5 mL de extracto de Matico y 0,5 mL de hidróxido de sodio 0.1 M. Esta solución se mantuvo en agitación (3400 rpm) y temperatura constante por 20 minutos, en este tiempo se pudo evidenciar el cambio de color de la solución de amarillento a café – rojizo. Se tomó una alícuota de 1 mL de la misma para realizar los análisis correspondientes y se la almacenó en frascos ámbar en refrigeración para futuros análisis.

### 2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La caracterización de las nanopartículas se realizó mediante tres técnicas:

- Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis), establecimiento de rango de tamaño
- Microscopía de barrido electrónico (SEM-EDX), estimación de tamaño y forma de AgNPs
- Espectroscopía de infrarrojos (FT-IR), interacción AgNPs con componentes orgánicos del extracto
- Espectroscopía de absorción atómica (FAAS), determinación de concentración de plata y rendimiento de reacción

## 2.3.1. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-VIS)

### 2.3.1.1. INSTRUMENTACIÓN

En la obtención de los espectros UV-Vis de las soluciones de nanopartículas de plata se empleó el espectrofotómetro de doble haz Cary 60 (Agilent Technologies). Mostrado en la Figura 2.2., los datos obtenidos fueron analizados con el software Cary WinUV.

Las lecturas de absorbancia de las nanopartículas se realizaron a intervalos de 10 nm, en un rango entre 350 y 800 nm. En la corrección de la señal de fondo (*background*) se utilizó agua destilada.



**Figura 2.2. Espectrofotómetro UV-Vis, Cary 60**

### 2.3.1.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para el análisis de la solución coloidal de nanopartículas de plata obtenida, se realizó una disolución al 10%, con agua destilada, y se colocó la misma en celdas de plástico de 1 cm de ancho.

### 2.3.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (FT-IR)

#### 2.3.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Para la obtención de los espectros de infrarrojo de las nanopartículas sintetizadas se empleó el espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR, con acople ATR, Figura 2.3., y los datos obtenidos fueron analizados con el software Spectrum v5.0.1. Las lecturas de las muestras se realizaron en las siguientes condiciones: rango entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y 10 barridos.



**Figura 2.3. Espectrofotómetro FT-IR, Perkin Elmer Spectrum BX**

#### 2.3.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La solución de nanopartículas obtenida se colocó en una caja Petri y se secó en una estufa a 50 °C. Se obtuvo un polvo fino luego de raspar la caja Petri con las nanopartículas secas, el cual fue colocado sobre el cristal porta muestras para el correspondiente análisis.

#### 2.3.3. MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM-EDX)

##### 2.3.3.1. INSTRUMENTACIÓN

Para conocer el tamaño de las nanopartículas sintetizadas se empleó el Microscopio de Barrido Electrónico Phenom ProX, el cual se puede observar en la Figura 2.4. En el análisis de datos

se empleó el software ProSuite, con un voltaje de 10 kV y una intensidad en modo imagen. Adicionalmente, se realizó un análisis elemental EDX en el mismo equipo para determinar los elementos presentes en la muestra y sus respectivos porcentajes.



**Figura 2.4. Microscopio de Barrido Electrónico (SEM) Phenom World ProX**

#### 2.3.3.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las nanopartículas obtenidas fueron secadas en la plancha de calentamiento a 70 °C, se obtuvo un polvo de color negro que contenía las nanopartículas de plata, la muestra fue colocada en un pin metálico con adhesivo de carbono. Se comprobó que las nanopartículas colocadas se encuentren distribuidas uniformemente empleando un estéreo microscopio.

## 2.3.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA (FAAS)

### 2.3.4.1. INSTRUMENTACIÓN

Para determinar el contenido de plata en la solución de nanopartículas se empleó el espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AAnalyst 400, Figura 2.5., todos los datos se analizaron con el software WinLab 32.

En las lecturas se empleó una lámpara de plata de cátodo hueco y un flujo de aire-acetileno. Se trabajó en las siguientes condiciones: longitud de onda 328.1 nm, flujo de aire 10.00 L/min y flujo de acetileno 2.50 L/min.



**Figura 2.5. Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Perkin Elmer AAnalyst 400**

#### 2.3.4.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ESTÁNDARES

Las muestras y los estándares de plata se prepararon con agua destilada tipo 1, las muestras tenían una dilución 1/100. Los estándares tuvieron las siguientes concentraciones 0,5, 1, 2, 3 y 5 ppm, estos se prepararon a partir de un estándar de referencia de  $996,0 \pm 3,0$  ppm de plata.

Adicionalmente, se realizó fortificaciones de 1 y 4 ppm para calcular el porcentaje de recuperación del analito y se calcularon los límites de detección y cuantificación del método empleado.

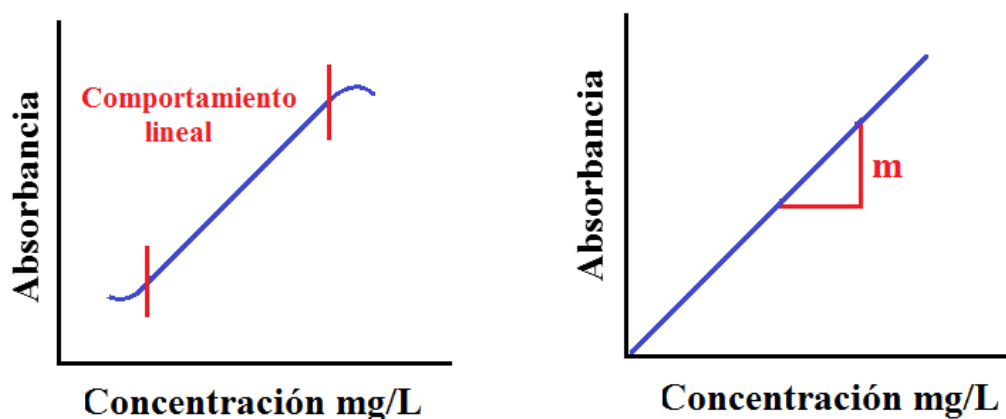
#### 2.3.4.3. ACONDICIONAMIENTO DEL MÉTODO

Para verificar que los resultados obtenidos son veraces se realizó la regresión lineal de la curva de calibración y se determinó el límite de detección y cuantificación del método. Adicionalmente, se realizaron fortificaciones para calcular el porcentaje de recuperación del analito.

#### 2.3.4.4. REGRESIÓN LINEAL Y LINEALIDAD

La linealidad se refiere al intervalo de concentraciones del analito en el que la señal emitida es una función lineal de la concentración [37].

El rango lineal se puede determinar a través de un gráfico de concentración vs respuesta, el cual es conocido como recta de calibrado. Después de realizar el gráfico se observa el comportamiento de la curva y se establece cualitativamente el rango lineal. Finalmente se realiza una curva de calibración graficando los datos de concentración (x) vs respuesta (y) [38]. Las curvas de calibrado y calibración se observan a continuación en la Figura 2.6.



**Figura 2.6. Representación de las curvas de calibrado y calibración [39]**

Luego de obtener la curva de calibración se debe evaluar la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r) y el punto de corte o intercepto con el eje Y ( $L_0$ ). En la siguiente ecuación se muestra la relación entre la concentración y la absorbancia:

$$Y = mx + L_0 \quad (1.2)$$

Para determinar la linealidad se emplea el coeficiente de correlación, el cual indica la relación entre la concentración y la respuesta. Se puede alcanzar máximo valores de -1 y 1; en la práctica es recomendable que el coeficiente de correlación se mayor o igual a 0.999 [39].

El coeficiente de correlación se puede obtener empleando la siguiente ecuación:

$$R^2 = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_i(x_i - \bar{x})^2][\sum_i(y_i - \bar{y})^2]}} \quad (1.3)$$

#### 2.3.4.5. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

Se define como la mínima concentración o cantidad de analito que puede ser detectada o medida con exactitud y precisión aceptables [40].

Para calcular el límite de detección se emplea la siguiente ecuación:

$$LOD = \bar{X}_B + 3\sigma_B \quad (1.4)$$

#### 2.3.4.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Se define como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud [41].

Para calcular el límite de cuantificación se emplea la siguiente ecuación:

$$LOQ = \overline{X}_B + 10\sigma_B \quad (1.5)$$

#### 2.3.4.7. FORTIFICACIÓN

La fortificación es la adición de una cantidad determinada de analito a una muestra [38]. Empleando los resultados obtenidos de las muestras fortificadas se puede calcular el porcentaje de recuperación del analito, el cual permite conocer la capacidad que tiene el procedimiento para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra, se lo expresa como porcentaje [40].

El porcentaje de recuperación se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\overline{C}_x - C_B}{C_A} \times 100 \quad (1.6)$$

Donde:

$C_x$ = concentración promedio de la muestra fortificada

$C_B$ = concentración del blanco

$C_A$ = concentración real adicionada



## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Los extractos 100% agua y agua/etanol al 75 % se descartaron debido a que se necesitó exponer las nanopartículas sintetizadas para obtener una lectura por UV- Vis. El extracto 100% etanol, se descartó debido a que presentaba un pico similar al de las nanopartículas a los 417 nm, como se puede observar en el Anexo 2.

Los extractos al 50 y 25% agua/etanol presentan un pico de absorbancia entre 600 y 700 nm (Anexo 2), por lo cual no interfieren en la síntesis de nanopartículas. Se realizaron procesos de síntesis con las dos mezclas y al analiza los resultados se decidió trabajar con el extracto agua/etanol al 50%, debido a que las nanopartículas obtenidas presentaban un pico de resonancia de plasmón superficial más estrecho, simétrico y con mayor absorbancia (Anexo 1).

El extracto obtenido de las hojas de la planta de Matico (*Piper aduncum*) se observa en la Figura 3.1. Al inicio del proceso de extracción el extracto presenta color verde característico de las hojas empleadas; durante el proceso se torna ligeramente verde-amarillento.



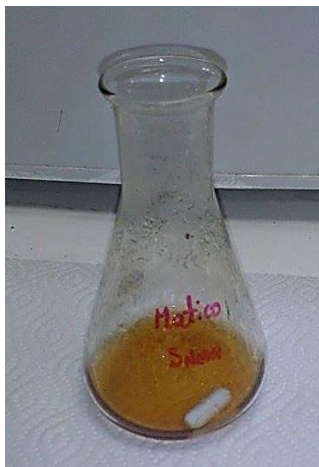
**Figura 3.1. Extracto de las hojas de la planta de Matico (*Piper aduncum*).**

### 3.2. ACONDICIONAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SÍNTESIS

Durante el proceso de síntesis el color del extracto no es un impedimento para observar la formación de las nanopartículas debido a que la cantidad de extracto empleada es ínfima y el color característico de las nanopartículas obtenidas es café – ámbar.

Se realizaron pruebas preliminares de la síntesis empleando solo extracto de Matico, Figura 3.1., sin variar el pH, para comprobar la efectividad del agente reductor.

Se obtuvo una solución con nanopartículas de color amarillo-anaranjado brillante (Figura 3.2.). La solución fue analizada por espectroscopía UV-Vis, la absorbancia varió radicalmente de un día a otro evidenciando la baja estabilidad de las nanopartículas.



**Figura 3.2. Nanopartículas de plata con extracto de Matico, sin variación de pH.**

Las condiciones en las que se realiza la síntesis permiten controlar el tamaño, la morfología, la estabilidad y la agregación de las nanopartículas. En este caso, se controló la cantidad de extracto, la concentración del nitrato de plata, la temperatura de síntesis, el tiempo de reacción y el pH [42]. Tomando en cuenta la metodología expuesta en la sección 2.2.1. y la descripción de los parámetros en la Tabla 2.1.

Se colocaron 0,5 ml de extracto de Matico para evitar disminuir la probabilidad de agregación de las nanopartículas. Se realizaron pruebas empleando una mayor cantidad de extracto, como se puede observar, en la Tabla 3.1. Al emplear más de 1 mL, la solución se tornaba verdosa y las lecturas en el UV-Vis arrojaban espectros con picos adicionales entre 600 y 700 nm, lo cual sugiere la presencia de nanopartículas agregadas en la solución y residuos del extracto que no intervienen en la síntesis.

**Tabla 3.1. Variación de la cantidad de extracto en la síntesis de nanopartículas de plata**

Cantidad	$\lambda$	Absorbancia	Observaciones
0,5	408	1,437	-
1	413	1,434	-
1,5	411	1,616	Nanopartículas con color verde de fondo, presentan doble pico de absorbancia máxima y ruido.
2	417	1,512	
	676	0,914	
2,5	375	1,785	
	654	0,978	

Respecto a la adición del precursor, se sintetizaron nanopartículas de plata empleando nitrato de plata 1 mM. Se realizaron pruebas empleando diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ , que se pueden observar en la Tabla 3.2. Con las concentraciones 0.1 y 0.5 mM se obtuvieron nanopartículas con una baja absorbancia, lo cual indica que la concentración de plata es inferior a la esperada. Los extractos de concentraciones 5.0 y 10.0 mM presentaron en los espectros UV-Vis ruido y varios picos, por lo cual la diferenciación del pico máximo de absorción de las nanopartículas se tornó muy complicado.

**Tabla 3.2. Variación de la concentración de la sal precursora en la síntesis de nanopartículas de plata**

[AgNO <sub>3</sub> ]	$\lambda$	Absorbancia
0,1	398	0,435
0,5	409	0,834
1	404	1,35
5	Complicación en el establecimiento del pico de absorción máxima	
10		

Otro parámetro monitoreado fue la temperatura de síntesis. Se obtuvo resultados adecuados al trabajar entre 45 y 65 °C, como se muestra en la Tabla 3.3. Se eligió trabajar a 60 °C debido a que los espectros UV-Vis presentaban picos más estrechos y simétricos. De la misma manera, al emplear temperaturas más bajas se pierde la concentración de plata y al utilizar temperaturas muy altas, el proceso de síntesis sería difícil el escalamiento industrial. La temperatura empleada es alta debido a que las moléculas que se encuentran en la superficie están en constante intercambio y al emplear temperaturas superiores se logra que las nanopartículas permanezcan en solución, evitando que se depositen en la superficie [43].

**Tabla 3.3. Variación de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de plata**

<b>T °C</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b>Absorbancia</b>
45	404	1,258
50	404	1,171
55	403	1,247
60	405	1,352
65	408	1,432

Al realizar las pruebas para determinar el tiempo de reacción óptima, las síntesis tuvieron una duración entre 10 y 30 min, como se evidencia en la Tabla 3.4. Se obtuvo resultados considerables en todos los tiempos; sin embargo, luego de los 20 min la absorbancia tendía a disminuir. Por este motivo, se eligió realizar la síntesis durante 20 min y de esta manera obtener nanopartículas con una mayor concentración de plata.

**Tabla 3.4. Variación del tiempo en la síntesis de nanopartículas de plata**

<b>Tiempo (min)</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b>Absorbancia</b>
10	402	1,453
15	404	1,537
20	404	1,512
25	404	1,492
30	405	1,461

Finalmente, se controló el pH de la síntesis, realizando pruebas de pH 5 a pH 10, representadas en la Tabla 3.5., el pH óptimo es 9 debido a que las nanopartículas obtenidas presentaban espectros UV-Vis con picos definidos y estrechos. Adicionalmente, en este pH se podía obtener resultados reproducibles y de gran estabilidad.

**Tabla 3.5. Variación del pH en la síntesis de nanopartículas de plata**

<b>pH</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b>Absorbancia</b>
5	415	0,829
6	402	1,222
7	411	1,359
8	404	1,330
9	403	1,383
10	402	1,319

### 3.2.1. SÍNTESIS DE AS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Se sintetizaron nanopartículas de plata empleando el extracto de las hojas de Matico (*Piper aduncum*), según el procedimiento descrito en la sección 2.2., se lograron sintetizar nanopartículas en suspensión, como se puede observar en la Figura 3.3. Durante la reacción se evidenció el cambio de coloración de la solución de transparente a café - ámbar, confirmando

de esta manera la formación de nanopartículas registrada en varios estudios, entre ellos Fletes, N. [28].



**Figura 3.3. Nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de Matico.**

La coloración café – ámbar característico de las nanopartículas no presentó ningún cambio notable durante 120 días, corroborando así su estabilidad en refrigeración a 4 °C; incluso días después, en el momento de desechar las nanopartículas sintetizadas estas no mostraron modificaciones en su coloración ni consistencia, lo cual es una señal de que las nanopartículas no se encuentran agregadas; de acuerdo al fenómeno de absorción de plasmón.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

#### 3.3.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

En la sección 3.2.1., se confirmó la obtención de las nanopartículas de plata debido al cambio de coloración durante la síntesis. A través de la espectroscopia UV-Vis se comprueba la presencia y el rango de tamaño de las nanopartículas en la solución, debido a la aparición del pico de absorción máxima alrededor de los 400 nm, el cual es característico de las nanopartículas de plata.

Un factor crucial en la determinación del tamaño y forma de las nanopartículas es la posición y la forma de la banda del plasmón superficial, debido a que cuando existe un incremento de tamaño la banda de absorción suele desplazarse a longitudes de onda mayores [44].

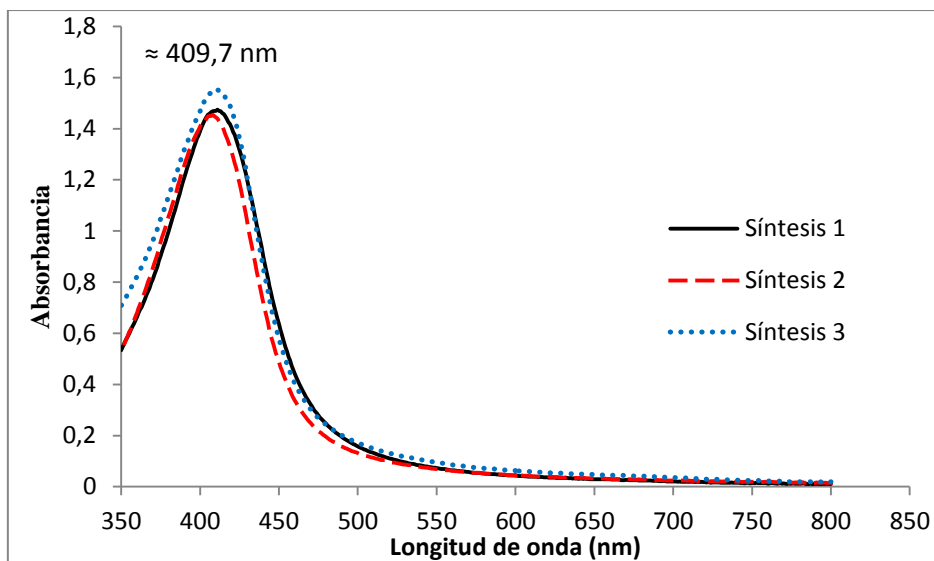
Se realizaron diversas pruebas variando los parámetros de síntesis hasta obtener un resultado óptimo, en el que las nanopartículas se encuentren a una menor longitud de onda, presentan un pico de absorbancia simétrico y estrecho, una alta concentración que se evalúa mediante la absorbancia, y finalmente gran estabilidad de la solución. En la Tabla 3.6., se detallan las condiciones óptimas con las que se realizaron las síntesis para obtener los resultados esperados.

**Tabla 3.6. Parámetros y condiciones óptimas de síntesis**

<b>Parámetros</b>	<b>Condiciones óptimas</b>
Cantidad de extracto (mL)	0,5
Temperatura (°C)	60
pH	9
Tiempo (min)	20
[AgNO <sub>3</sub> ] (mM)	0,1

En la Figura 3.4., se observan espectros UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas en las condiciones óptimas mencionadas en la Tabla 3.6. En los mismos no existe una disminución en la intensidad del pico de absorbancia, ni la aparición de hombros en los espectros a longitudes de onda mayores. Por lo cual se puede asumir que las nanopartículas obtenidas con los parámetros óptimos de síntesis no se encuentran agregadas.

Además, se presume que las nanopartículas obtenidas son cuasi - esféricas, debido a que presentan una sola banda de resonancia de plasmónica superficial y si estas fueran anisotrópicas presentarían dos o más bandas de resonancia, dependiendo de la forma de las nanopartículas [3].



**Figura 3.4. Espectro UV-Vis síntesis óptima de nanopartículas**

Para conocer el rango de tamaño aproximado de las nanopartículas se muestra a continuación en la Tabla 3.7. los valores reportados por Pradeep. Así mismo, el tamaño de las nanopartículas será mayor a medida que el pico de absorbancia máxima se desplace a longitudes de onda mayores [43].

**Tabla 3.7. Tamaño aproximado de las nanopartículas de plata dependiendo del pico de absorción máxima en el espectro UV-Vis [43]**

Tamaño aproximado (nm)	Pico absorbancia máxima (nm)
10 – 14	400
35 - 50	430
60-80	438

Al comparar los valores obtenidos de las síntesis con los datos expuestos en la Tabla 3.7., la nanopartículas se encuentran en un rango de tamaño entre 14 y 35 nm, debido a que no se pueden considerar dentro de los grupos expuestos sino entre sus extremos.

Los resultados obtenidos se compararon con los de Krishnan, V. *et al.* [13], donde se empleó en la síntesis de nanopartículas de plata extracto de la fruta de la Pimienta negra (*Piper nigrum*) como agente reductor, obteniéndose partículas con un pico de resonancia de plasmón superficial a los 441 nm, según las cifras reportadas en la Tabla 3.7., el rango de tamaño aproximado de las nanopartículas es mayor a 80 nm.

Según Shanmuga, P. *et al.* [45], al emplear el extracto de las hojas de Betle (*Piper betle*) se obtuvo un pico de absorbancia máxima a los 444nm. El rango de tamaño aproximado de las nanopartículas es mayo a 80 nm.

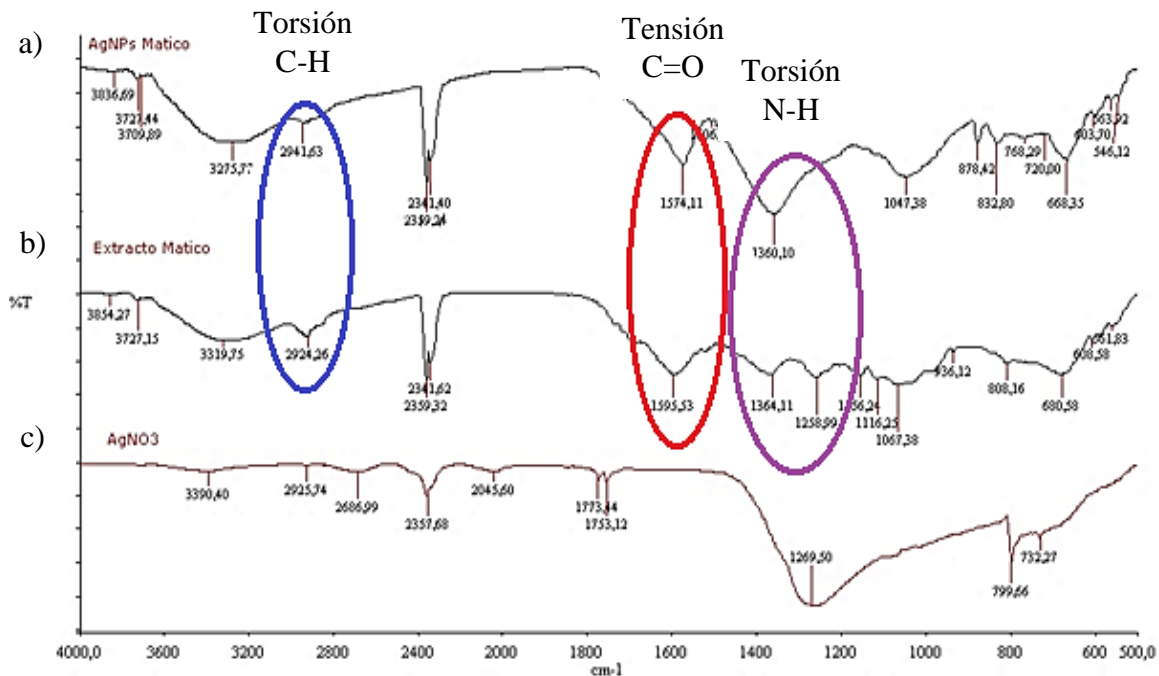
Las nanopartículas sintetizadas con *Piper aduncum* presentan un rango de tamaño menor al reportado en los estudios antes mencionados. Esto se debe a que las condiciones de síntesis son diferentes en cada caso y el extracto empleado en los otros estudios es acuoso, mientras que el empleado en esta disertación es hidro - etanólico al 50%.

### 3.3.2. ESPECTROSCOPIA DE TRANSFORMADAS DE FOURIER (FT-IR)

El análisis espectroscópico FT-IR se empleó para determinar o detectar las especies químicas que se encuentran enlazadas en la superficie de las nanopartículas y de la misma manera observar las interacciones entre el extracto y las nanopartículas obtenidas. En la Figura 3.5 se observan los espectros del extracto de Matico, el nitrato de plata y las nanopartículas sintetizadas. El espectro del nitrato de plata empleado para la síntesis de las nanopartículas se encuentra representado en la Figura 3.5.a.

El espectro del extracto de las hojas de Matico, se observa en la Figura 3.5.b. permite analizar los principales grupos funcionales correspondientes al mismo. Se aprecia una banda de baja intensidad, correspondiente a la tensión del enlace C-H a los  $2924.26\text{ cm}^{-1}$ . Una banda de tensión del enlace C=O, de intensidad media a los  $1595.53\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda a los  $1364.11\text{ cm}^{-1}$ , de baja intensidad, ocasionada por la torsión del enlace N-H. [46].

El espectro de la nanopartículas de plata sintetizadas se puede observar en la Figura 3.5.c. presenta una banda de baja intensidad localizada a los  $2941.63\text{ cm}^{-1}$ , ocasionada por la tensión del enlace C-H, una banda de tensión del enlace C=O, de intensidad media, a los  $1574.11\text{ cm}^{-1}$ , y una banda a los  $1360.10\text{ cm}^{-1}$ , debida a la torsión de los enlaces N-H, la cual se debe al solapamiento de dos bandas presentes en el espectro del extracto, lo cual permite evidenciar la participación de las amidas secundarias o aminas primarias en el proceso de reducción.



**Figura 3.5. Espectro FTIR del nitrato de plata (c), extracto de Matico (b) y nanopartículas de plata (a)**

Los posibles compuestos químicos responsables de la torsión C-H, tensión C=O y torsión N-H, que se analizaron en los espectros de la Figura 3.5. a y b se detallan en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.8. Compuestos químicos responsables de las bandas en los espectros IR [47]**

<b>Torsión C-H</b>	<b>Tensión C=O</b>	<b>Torsión N-H</b>
Piperitona	Flavonoides	Piperizina
Resina	Lignano	Saponinas
Antocianina	Cumarina	Proteínas (base cuaternaria)
Cariofileno	Alcaloides	Amidas: cinnamoilamidas y alquilamidas
	Ácido: acético, mevalónico y shikímico	

Mallikarjuna, K. *et al.* [48], al emplear extracto de las hojas de Betle (*Piper betle*) para sintetizar nanopartículas de plata y caracterizarlas por FT-IR encontró bandas a los 2920, 1640 y 1378  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales son similares a los resultados obtenidos al emplear *Piper aduncum*. De igual manera Garg, S. [49], al emplear el extracto de los granos de pimienta negra negro (*Piper nigrum*) y analizarlos por FT-IR, obtuvo bandas a los 1631 y 3433  $\text{cm}^{-1}$ , siendo en este caso, bandas diferentes a las obtenidas con *Piper aduncum*, debido a que la parte de la planta empleada para la realización del extracto es diferente.

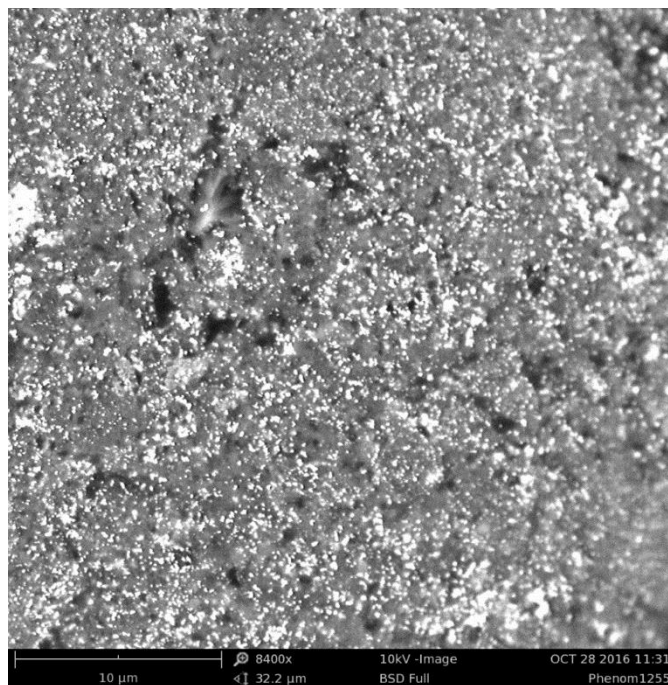
Con los resultados obtenidos se puede sugerir que los principales grupos funcionales presentes en el extracto de matico corresponden al ácido acético, mevalónico y shikímico [47], los cuales son responsables de la reducción gracias a los grupos carbonilo presentes en su

estructura; sin embargo, el mecanismo de reducción y estabilización de las nanopartículas de plata no puede ser definido con esta información, debido a que se requieren estudios y análisis más profundos, como la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), que permite extraer información química útil para estudios de verificación y caracterización de nuevos compuestos [50].

### 3.3.3. MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM-EDX)

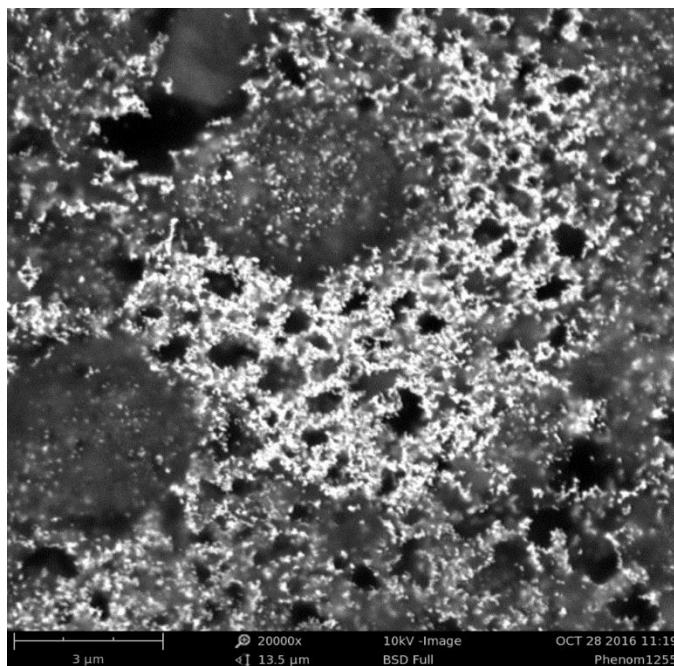
La espectroscopia UV-Vis corrobora la presencia de las nanopartículas de plata en la solución y su rango de tamaño aproximado. No obstante, la Microscopia de Barrido Electrónico (SEM) permite estimar el tamaño y la forma que presentan las nanopartículas de una manera más precisa. Al emplear un detector EDX esta técnica permite determinar los elementos presentes y el porcentaje de los mismos que se encuentran en la superficie de las nanopartículas.

En la Figura 3.6., se observa una vista panorámica de las nanopartículas de plata en el sustrato a 8.400X. Las nanopartículas sintetizadas son polidispersas y algunas presentan aglomeraciones puntuales.



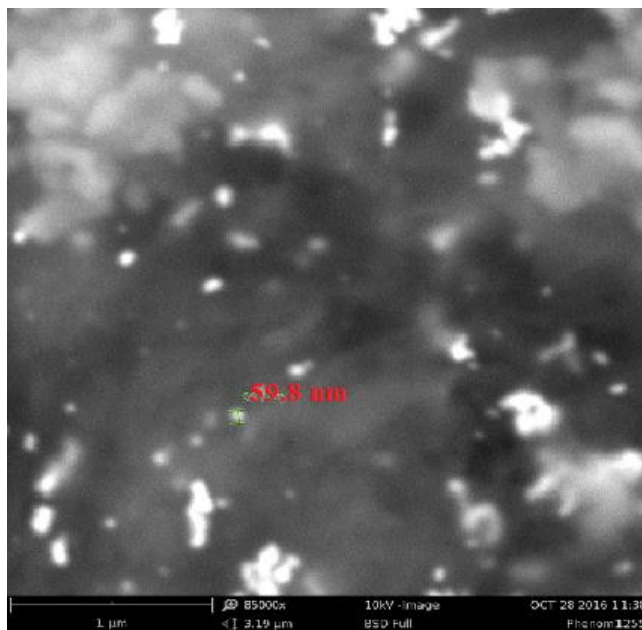
**Figura 3.6. Imagen SEM nanopartículas de plata sintetizadas a 8.400 X**

En la Figura 3.7., se puede observar las nanopartículas de plata sintetizadas y apreciar el sustrato sobre el que se encuentran, el extracto de Matico, a 20.000X. Las nanopartículas presentan brillo característico, debido a la interacción entre la superficie de plata y los electrones de la fuente de emisión, estas se encuentran en su mayoría agregadas con zonas de polidispersión, esto se puede atribuir a la interacción orgánica de los residuos de matico, debiendo evaluarse a futuro técnicas alternativas de secado para descartar una influencia de fluctuación térmica en la agregación de las nanopartículas.



**Figura 3.7. Imagen SEM nanopartículas de plata sintetizadas a 20.000 X**

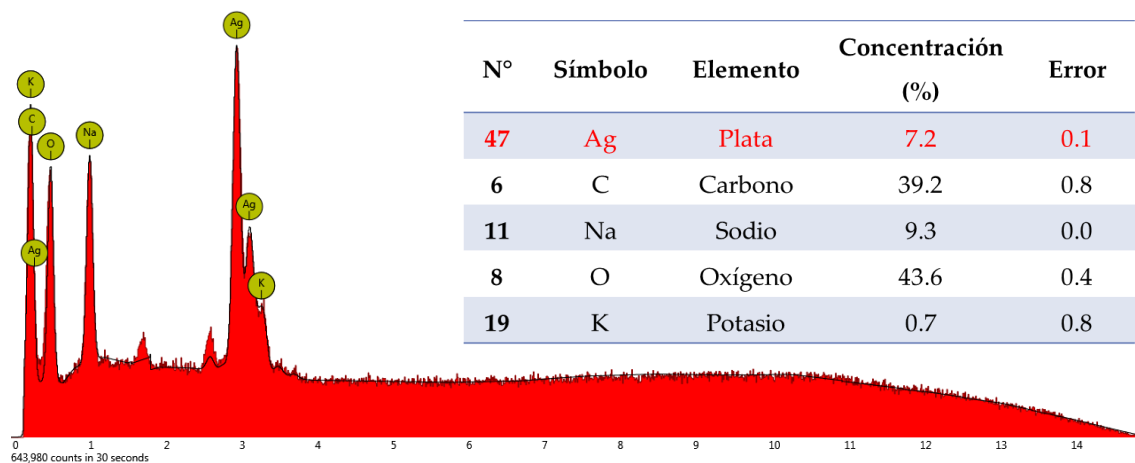
En la Figura 3.8., se puede apreciar el tamaño aproximado de las nanopartículas el cual se encuentra en 59.8 nm, dependiendo el área seleccionada de la muestra empleada. Al comparar el tamaño de las nanopartículas analizadas en el SEM, con las analizadas por UV-Vis, se puede observar una gran diferencia en los tamaños, debido a que el análisis en UV-Vis estima rangos de tamaño de las nanopartículas solas, mientras que el análisis SEM estima de mejor manera los tamaños de partícula.



**Figura 3.8. Imágenes SEM del tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas a 85.000 X**

Con el detector EDX presente en el SEM se pudo analizar la superficie de las nanopartículas, para obtener información de los elementos químicos que se encuentran presentes en ella y sus respectivos porcentajes.

En la Figura 3.9. se observa el espectro EDX de las nanopartículas, en el cual existen señales fuertes en la región de la plata, lo cual nos permite confirmar la presencia de plata en las mismas. Así mismo, se puede observar en el inserto los porcentajes de la composición elemental de las nanopartículas.



**Figura 3.9. Imagen SEM de las nanopartículas de plata y tabla de composición elemental**

Las nanopartículas sintetizadas presentan 7.2 % de plata, un valor poco representativo debido al recubrimiento del residuo orgánico de las nanopartículas. Así mismo, el porcentaje de carbono reportado es de 39.2%, debido a la naturaleza orgánica del extracto y a la capa adhesiva sobre la que se colocaron las nanopartículas, la cual está constituida de carbono. Del mismo modo, se obtiene un porcentaje de oxígeno del 43.6%, el cual proviene de la naturaleza orgánica del extracto. El porcentaje de sodio es del 9.3%, atribuible al hidróxido de sodio empleado en la estabilización. La presencia de potasio en un 0.7%, puede asignarse al extracto de naturaleza orgánica empleado.

Cabe mencionar que el equipo permite eliminar las interferencias de otros elementos que permitirían determinar mejor la concentración de plata; sin embargo, al tener un extracto orgánico de interés, esta posibilidad se descartó.

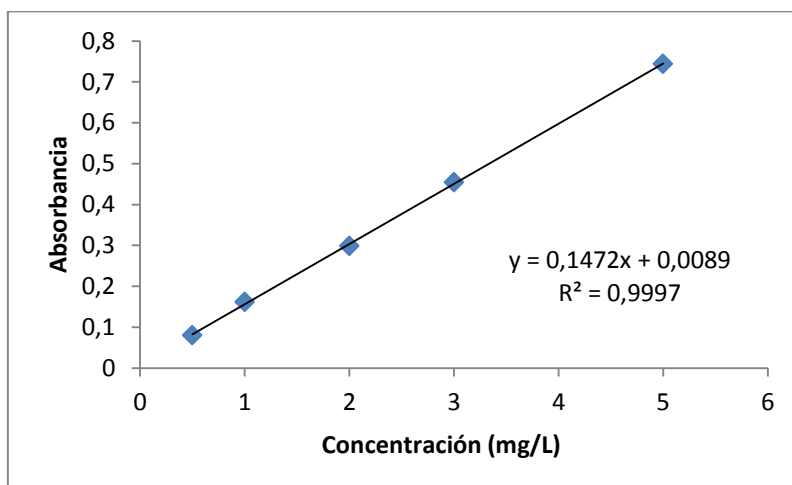
### 3.3.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA (FAAS)

Se empleó la espectroscopia de absorción atómica de llama para determinar la concentración de plata coloidal presente en las nanopartículas. Previo al análisis se realizó el acondicionamiento del método.

### 3.3.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MÉTODO

#### 3.3.5.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

Para el acondicionamiento se elaboró una curva de calibración, la cual se puede observar en la Figura 3.10., que se muestra a continuación.



**Figura 3.10. Curva de calibración para la determinación de plata iónica**

### 3.3.5.2. REGRESIÓN LINEAL DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN, LINEALIDAD Y

#### LÍMITES DE CONFIANZA

En la Tabla 3.11., se detallan los componentes de la ecuación de la recta de regresión lineal y los límites de confianza establecidos para el análisis.

**Tabla 3.9. Componentes de la ecuación de la recta de regresión lineal e intervalo de confianza de la recta.**

<b>Ecuación de la recta</b>	$y = 0,1472x + 0,0089$
<b>Pendiente (a)</b>	0.1472
<b>Ordenada (b)</b>	0,0089
<b>Coefficiente de correlación (<math>R^2</math>)</b>	0,9997

### 3.3.5.3. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

En la tabla 3.12., se detallan los valores obtenidos para la determinación de los límites de cuantificación y detección.

**Tabla 3.10. Valores para la determinación de los límites de detección y cuantificación**

<b>Blancos</b>	<b>Señal</b>	<b>Concentración</b>
1	0,002	-0,047
2	0,002	-0,047
3	0,001	-0,054
4	0,002	-0,047
5	0,002	-0,047
6	0,002	-0,047
7	0,002	-0,047
8	0,002	-0,047
9	0,002	-0,047
10	0,002	-0,047
<b>Media</b>		-0,048
<b>Desviación Estándar</b>		0,002
<b>LOD</b>		0,006
<b>LOQ</b>		0,021

Se realizaron lecturas de blancos reactivos para comprobar que no existe influencia de los mismos en la determinación de la concentración de plata de las nanopartículas sintetizadas.

Estos valores se muestran a continuación en la Tabla 3.13.

**Tabla 3.11. Datos de señal y concentración de los blancos reactivos**

<b>Blanco</b>	<b>Señal (UA)</b>	<b>Concentración Ag (mg/L)</b>
1	0,001	<LOD
2	0,001	
3	0,002	
4	0,001	
5	0,002	

Con el análisis de los blancos reactivos se pudo observar que la concentración de plata obtenida fue menor a la concentración determinada por el límite de detección del método. Por lo cual, se comprueba que no existe la presencia de plata en el Matico.

#### 3.3.5.4. FORTIFICACIONES EMPLEANDO ESTÁNDAR

Para realizar las fortificaciones se tomaron en cuenta dos puntos de la curva de calibración, ubicado al inicio y al final de la misma, se eligió trabajar con concentraciones de 1.000 y 4.000 mg/L. Los datos se registran en la Tabla 3.7., a continuación.

**Tabla 3.12. Porcentaje de recuperación de plata**

<b>Concentración</b>	<b>Señal</b>	<b>Concentración</b>	<b>% Recuperación</b>	<b>Media (%)</b>	<b>Desv. Estand.</b>
1ppm	0,158	1,013	101,29	100,61	0,679
	0,156	0,999	99,93		
	0,157	1,006	100,61		
4ppm	0,592	3,961	99,03	98,07	1,252
	0,578	3,866	96,65		
	0,589	3,941	98,52		

Con los datos obtenidos de las fortificaciones se calculó el porcentaje de recuperación promedio para 1.000 y 4.000 mg/L, obteniéndose porcentajes de 100.61 y 98.07 %, respectivamente, con una desviación estándar de 0.679 y 1.252, para cada caso.

### 3.3.6. DETERMINACIÓN DE PLATA EN LA DISOLUCIÓN COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS

Se trabajó con una concentración inicial de nitrato de plata de 98.01 mg/L. El valor práctico final del contenido de plata presente en las muestras se obtuvo multiplicando la media de los resultados por el factor de dilución, que en este caso fue 100. Los resultados se pueden

observar en la Tabla 3.8. Se obtuvo una concentración práctica final de 101.744 mg/L y un porcentaje de rendimiento del 96.68%.

**Tabla 3.13. Valor teórico y práctico de la concentración de plata y porcentaje de rendimiento de la reacción.**

<b>NPs</b>	<b>Señal</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
1	0,148	0,945
2	0,148	0,945
3	0,147	0,938
4	0,154	0,986
5	0,181	1,169
6	0,174	1,122
<b>Media</b>		1,017
<b>Desv. Estandar</b>		0,102
<b>Factor de dilución 100</b>		101,744
<b>Valor teórico</b>		105,239
<b>Rendimiento (%)</b>		96,68

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. CONCLUSIONES

Se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de plata empleando extracto hidro-etanólico de Matico al 50% como agente reductor, estableciendo un método biológico alternativo, que permite la obtención de nanopartículas de plata de una manera fácil, rápida, económica y amigable con el medio ambiente.

En el análisis por espectroscopía UV-Vis el pico de absorción máxima característico de las nanopartículas se observó alrededor de los 409.7 nm, con lo cual se definió que el rango tamaño de las nanopartículas oscilaría entre 14 y 35 nm. Estos valores difieren de los obtenidos por Microscopia de Barrido Electrónico (SEM), el cual estimó un tamaño de partícula de 59.8 nm, debido a la interacción orgánica de los residuos de Matico. Se obtuvieron nanopartículas cuasi - esféricas y polidispersas, con aglomeraciones puntuales.

En el análisis por EDX se halló un 7.2% de plata elemental en las nanopartículas, debido al recubrimiento del extracto, razón por la que se realizó un análisis por FAAS se obtuvo una concentración de plata coloidal de 105,239 mg/L y un porcentaje de rendimiento del 96.68 %.

En el análisis FT-IR, se aprecia una presencia o modificación de las bandas a  $1574.11\text{ cm}^{-1}$  que, de acuerdo a la composición química en las hojas de Matico, se puede señalar como posibles compuestos reductores a los ácidos: acético, shikimico y mevalónico,

## 4.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el secado de las nanopartículas para el análisis SEM mediante técnicas alternativas, como la liofilización, para descartar la aglomeración de las nanopartículas por la fluctuación de energía que puede aportar el secado en estufa.

Se aconseja la determinación de dispersión de luz dinámica (DLS) para definir los radios hidrodinámicos y analizar el grado de funcionalización, así como la corroboración de los tamaños de partícula a partir de un estudio en microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Se sugiere realizar nuevos estudios incrementando la concentración de las nanopartículas de plata para poderlas emplear con fines biomédicos, en la elaboración de productos tópicos con propiedades cicatrizantes, antibacterianas y antiinflamatorias.

Se plantea la opción de profundizar los estudios en el mecanismo de reducción y estabilización de las nanopartículas a través de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), permitiendo ampliar la información química para estudios de verificación y caracterización de nuevos compuestos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas, *Anales de Química*, 105(1), pp 33-41.
- [2] Berlmares, S., Torres, E., Coparán, J., Arriaga, J. y Elizondo, N. (2013). Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y hierro por el método de físicoquímica verde. Foro de divulgación Científica y tecnológica. México.
- [3] Aguilar, M. (2009). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre colletotrichum gloesporioides*. Disertación de Doctorado en Tecnología avanzada, Instituto Politécnico Nacional, México.
- [4] Red Venezolana de nanotecnología. Nanotecnología en la antigüedad y en la naturaleza. Recuperado de: <http://redvnano.ivic.gob.ve/>, 24 de mayo del 2016.
- [5] Nieto, V. (1998). *La vidriera española, ocho siglos de luz*. Editorial Nerea. ISBN 978-84-89569-23-2.
- [6] La ciencia de forma sencilla. Cuando la nanotecnología se usaba en la antigüedad sin saberse. Recuperado de: <http://www.xatakaciencia.com/nanotecnologia/cuando-la-nanotecnologia-se-utilizaba-en-la-antigüedad-sin-saberse>, 24 de mayo del 2016.
- [7] Mendoza, G. y Rodríguez, J. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso, *Perfiles Latino Americanos*, 29, pp 162-169.
- [8] Roldán, M., Frattini, A., Sanctis, O. y Pellegrini, N. (2005). Nanopartículas metálicas con formas diversas, *Anales AFA*, 17, 212, pp 33-34.

- [9] Kestens, V., Roebben, G., Herrmann, J. et al. (2016). Challenges in the size analysis of a silica nanoparticle mixture as candidate certified reference material. *Journal of Nanoparticle Research*, 18 (171). doi:10.1007/s11051-016-3474-2.
- [10] Solis, J. (2014). Ibero investigación. Recuperado de: <http://www.investigacion.ibero.mx/blog/para-que-sirven-las-nanoparticulas-metalicas>, 03 de enero de 2017.
- [11] Russon, M. Romans Used Nanotechnology to Turn Lycurgus Cup From Green to Red 1,600 Years Ago. Recuperado de: <http://www.ibtimes.co.uk/romans-used-nanotechnology-turn-lycurgus-cup-green-red-1600-years-ago-1468746>, 09 de enero 2017.
- [12] Cruz, J. (2012). *Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de lactoferrampina con potencial antibiótico contra Eschericha coli O157:H7*. Disertación de Masterado en Química, Universidad industrial de Santander, Bucaramanga.
- [13] Krishnan, V., Bupesh, G., Manikandan, E., Thanigai, A., Magesh, S., Kalyanaraman, R. y Maaza, M. (2016). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Piper nigrum Concoction and its Anticancer Activity against MCF-7 and Hep-2 Cell Lines . *Journal of Antimicrobial Agents*, 2(3), pp 1-5. ISSN:2472-1212.
- [14] Ávalo, A., Haza, A., Mateo, D. y Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente, *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7 (2), pp 1-7. ISSN: 1988-2688.

- [15] Verástegui, J. (2014). *Determinación del perfil farmacocinético de la plata después de la administración de nanopartículas de plata en dos modelos animales*. Disertación de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- [16] López, G., Morales, R., Olea, O., Sánchez, V., Trujillo, J., Varela, V. y Vilchis, A. (2013). *Nanoestructuras metálicas: síntesis, caracterización y aplicaciones*. Barcelona, España. Reverté.
- [17] Sauro, S. (2015). Nanotecnología aplicada al desarrollo de nuevos materiales dentales con capacidad terapéutica. Recuperado de: <https://www.interempresas.net/Medico-hospitalario/Articulos/148479-Nanotecnologia-aplicada-al-desarrollo-nuevos-materiales-dentales-capacidad-terapeutica.html>, 18 de julio del 2016.
- [18] Sanín, F. (2015). *Determinación de las propiedades físico - químicas del jabón líquido elaborado a partir de la planta medicinal Piper Aduncum, Matico, para uso dermatológico*. Titulación de química y farmacéutica, Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- [19] Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft, H. y Granda, G. Plantas útiles del Ecuador. Aplicaciones, retos y perspectivas. pp 137, 209.
- [20] Hurtado, M. (2015). *Caracterización fotoquímica de dos extractos alelopáticos obtenidos de Cinnamon canella y Piper angustifolium, mediante cromatografía y/o espectrofotometría*. Disertación de Ingeniera en Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador.
- [21] Green Facts. Facts on Health and the Environment. Recuperado de: <http://copublications.greenfacts.org/es/nanoparticulas-plata/index.htm>, 18 de julio del 2016.

- [22] La PRL en la exposición de los trabajadores a las nanotecnologías. Junta de Castilla y León (2015).
- [23] Laredo, M. (2014). *Propiedades antimicrobianas y cito-toxicidad de las nanopartículas de plata depositadas en placas de titanio -In vitro*. Disertación de Masterado. Universidad Autonoma San Luis Potosi.
- [24] Flores, C. (2014). *Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida*. Disertación de Doctorado. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- [25] Skoog, D., Holler, F. y Neiman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid. España.
- [26] Rojas, S. (2016). *Evaluación de las propiedades bactericidas de tejidos impregnados con nanopartículas de plata*. Disertación de Ingeniería Química. Escuela Politécnica Nacional.
- [27] Torrecilla, A. (2014). *Determinación del contenido de plata en nanomateriales de plata inorgánicos y poliméricos mediante digestión asistida por microondas y espectroscopía de absorción atómica de llama*. Disertación de química. Universidad de la Rioja.
- [28] Fletes, N. y Rosas, G. *Síntesis verde de nanopartículas de plata usando extracto acuoso de valeriana officinalis y su evaluación como agentes antibacteriales. XII encuentro de participación de la mujer en la ciencia*.
- [29] Universidad Pedagógica Experimental Libertador - Sánchez, J. (2009). *Infrarrojo*, Venezuela.

- [30] Fages, E. (2006). *Investigación de fibras de polipropileno aditivadas con nanopartículas de plata para la mejora de propiedades bioactivas en el sector textil*. Disertación de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- [31] Construcción. Patología, rehabilitación y construcción. La microscopia electrónica de barrido SEM. Recuperado de: <https://www.patologiasconstruccion.net/2012/12/la-microscopia-electronica-de-barrido-sem-i-concepto-y-usos/>, 20 de octubre 2016.
- [32] Martí, D. (2011). SCAI. Unidad de microscopia electrónica de barrido. Recuperado de: [http://www.scai.uma.es/servicios/area\\_microscopia/sem/sem.html](http://www.scai.uma.es/servicios/area_microscopia/sem/sem.html), 20 de octubre 2016.
- [33] Universidad Politécnica de Valencia. (2012). Servicio de microscopia electrónica. Recuperado de: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753120normalc.html>, 20 de octubre 2016.
- [34] Walton, H. y Reyes, J. (2005). *Análisis Químico e Instrumental Moderno*. Barcelona. España.
- [35] Rocha, E. (2000) *Principios básicos de espectroscopía*; Editorial UACH, México.
- [36] Patel, J. Panchal, U., Panchal, M. y Maykawana, B. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles using the leaf extracts and their microbial activity, *Journal of Advance Chemical Sciences*. 1(3), pp 82-85. ISSN: 2394-5311
- [37] Romero, F. y Gama, S. Herramientas estadísticas aplicadas a la validación de métodos analíticos. Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/HerramientasEstadisticasVALIDACION\\_25952.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/HerramientasEstadisticasVALIDACION_25952.pdf), 20 de octubre 2016.

- [38] Sistema Integrado de Gestión de Laboratorios (SIGLA). Aseguramiento de calidad en los laboratorios regionales. PG.AE.06. Versión Vigente N° 01.
- [39] Instituto de Salud Pública. (2012). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Santiago de Chile.
- [40] IDEAM- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2006). Estandarización de métodos analíticos. Colombia
- [41] Velandia, J. (2008). *Validación del método analítico para la cuantificación de bacitrina en la elaboración de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria*. Disertación de Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Bogotá.
- [42] Camacho, J. y Deschamps, L. (20163). *Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobiana*. Disertación de Ingeniería Química. Universidad de Cartagena. Cartagena.
- [43] Pradeep, T. (2012). *A Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*, 1<sup>ra</sup> edición, McGraw Hill, Nueva Deli.
- [44] Ronquillo, E., Aguilar, M., Guzmán, J. y San Martín, E. (2011). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando extractos de plantas. *XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ*. México D.F.
- [45] Shanmuga, P., Jeyasundari, J. y Brightson, A. (2014). Synthesis of silver nano particles using piper betle and its antibacterial activity, *Eur. Chem. Bull*, 3(10), pp1014-1016.

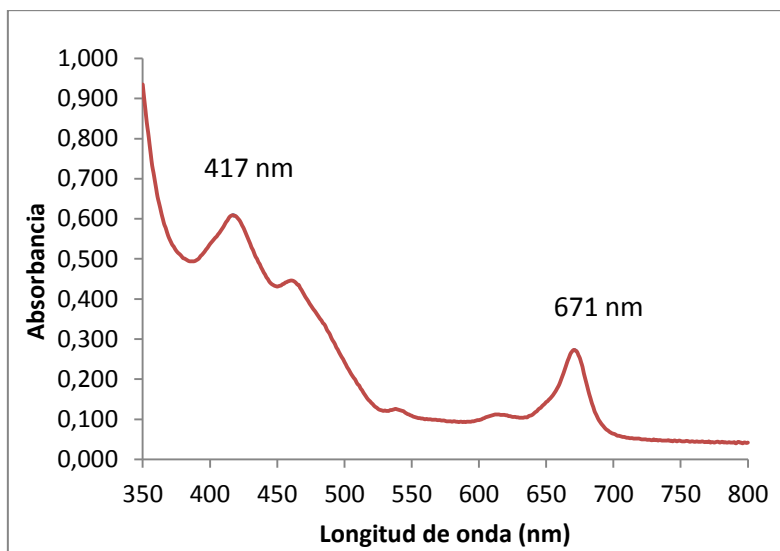
- [46] Espectroscopia Infrarroja. Interpretación básica y tablas. Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tablas\\_20787.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tablas_20787.pdf), 25 de noviembre del 2016.
- [47] Albarracín, G. y Gallo, S. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. Disertación de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- [48] Mllikarjuma, K., Dillip, G., Narasimba, G., Sushma, N. y Prasad, B. (2012). Phytofabrication and characterization of silver nanoparticles from *Piper betle* broth. *Research Journal of Nanotechnology*, 2(1), pp 17-23. ISSN 1996-5044
- [49] Garg, S. (2012). Rapid biogenic synthesis of silver nanoparticle using black pepper (*Piper nigrum*) corn extract. *International Journal of Innovations in Biological and Chemical Sciences*, 3, pp 5-10.
- [50] ThermoFisher Scientific. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/nuclear-magnetic-resonance-nmr.html>, 10 de enero 2017.

## ANEXOS

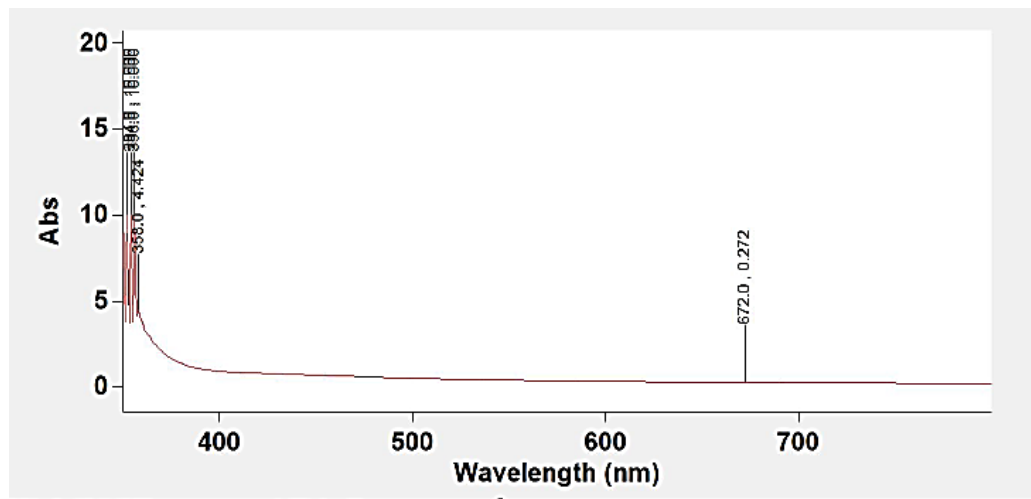
Anexo 1. Elección de la mejor proporción del extracto para la síntesis de nanopartículas.

<b>Extracto</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Observaciones</b>
100% agua	406	0.905	Las nanopartículas fueron expuestas por 24 para obtener una lectura en el UV-Vis
25% agua/etanol	414	0.968	
50% agua/etanol	404	1.512	-
75% agua/etanol	398	1.059	-
100% Etanol	417	0,667	No se realizaron síntesis por la presencia de un pico similar a las nanopartículas en el espectro del extracto.

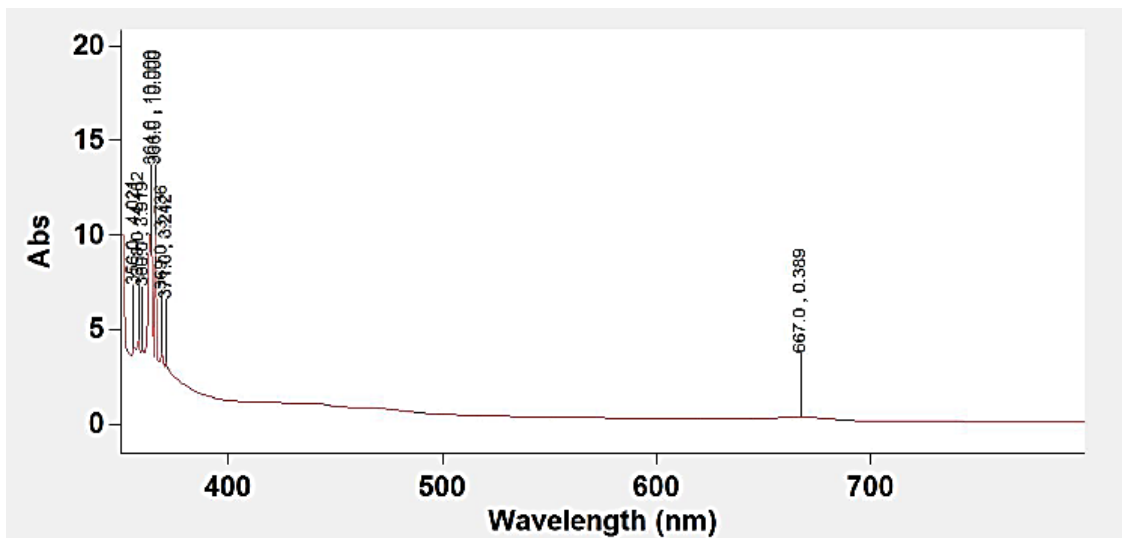
Anexo 2. Espectros de los extractos de las hojas de Matico



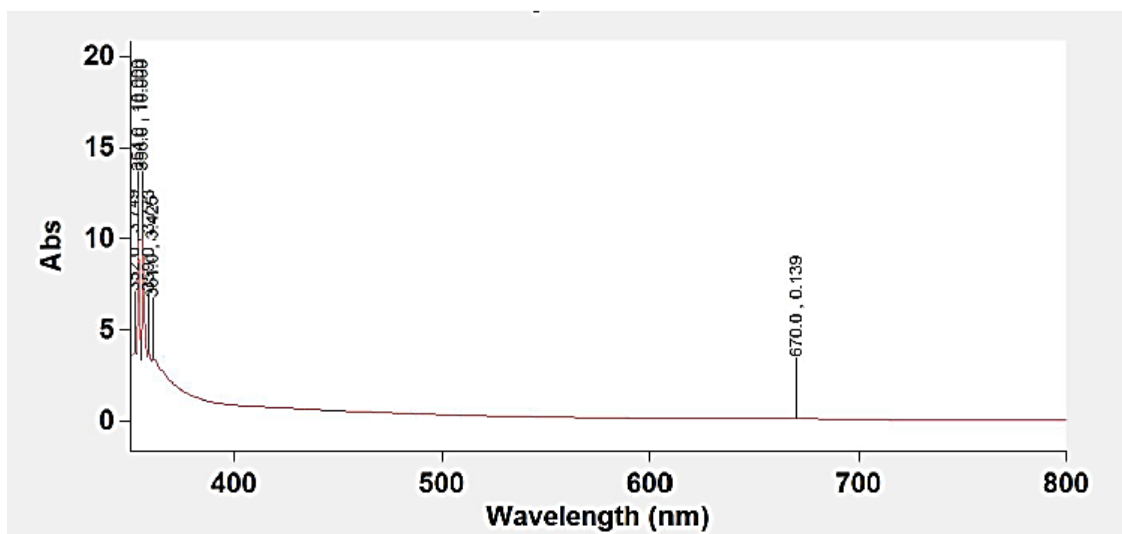
**Espectro UV-vis del extracto de las hojas de Matico en etanol al 100%**



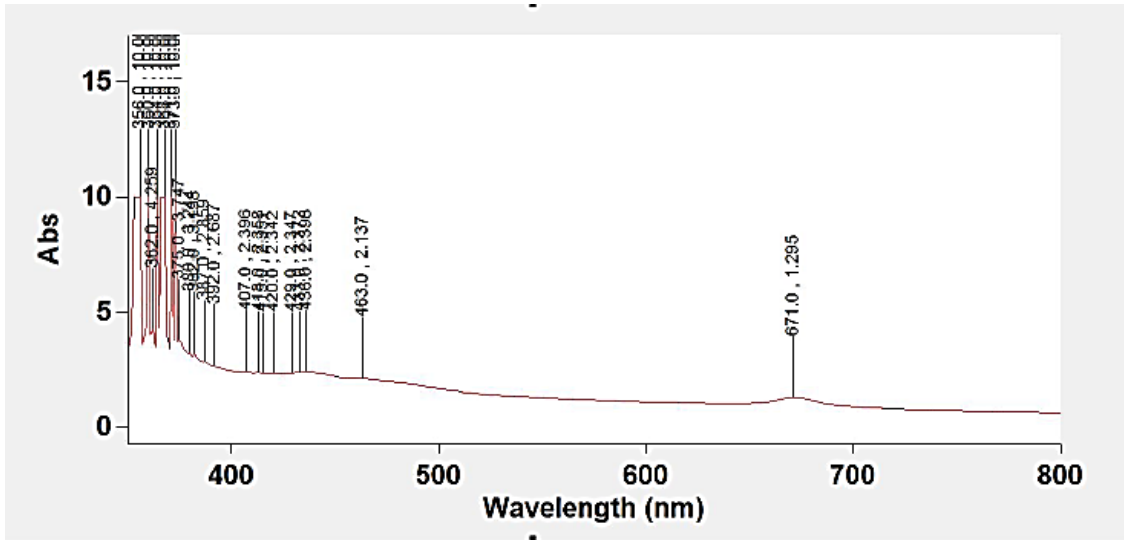
**Espectro UV-vis del extracto de las hojas de Matico en etanol al 25% agua/etanol**



**Espectro UV-vis del extracto de las hojas de Matico en etanol al 50% agua/etanol**

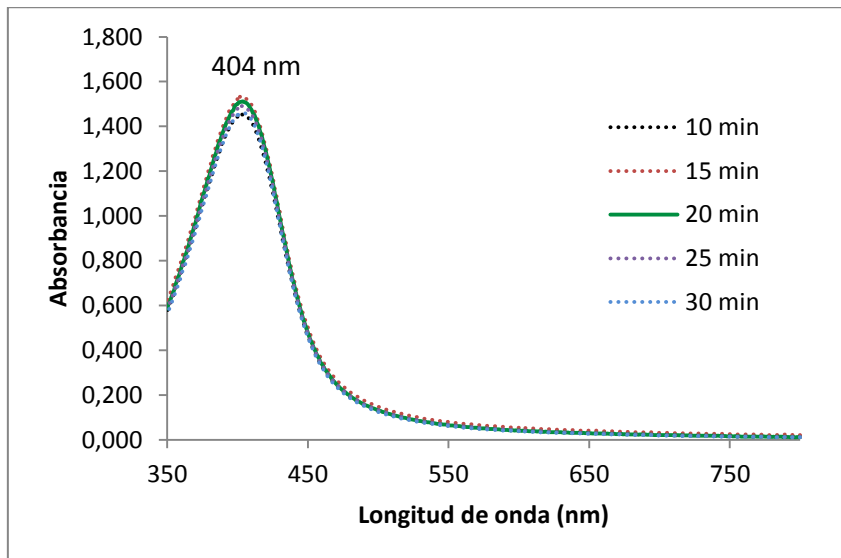


**Espectro UV-vis del extracto de las hojas de Matico en etanol al 75% agua/etanol**

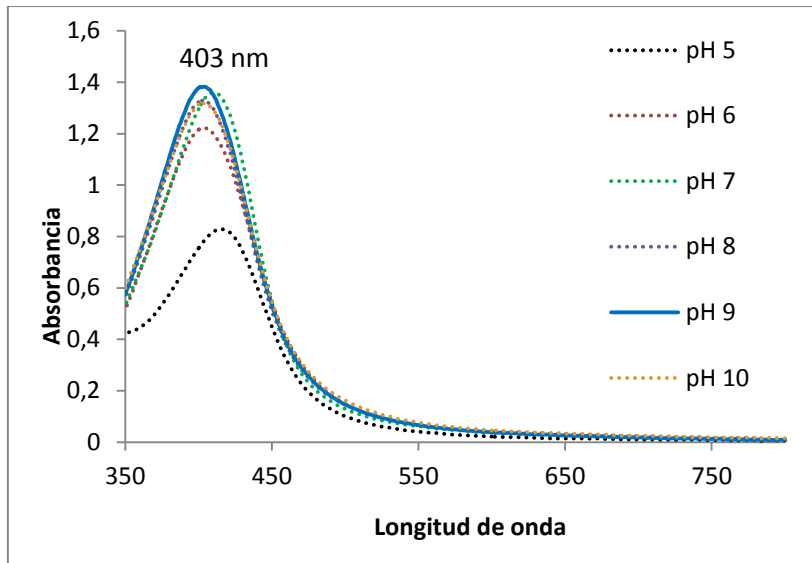


**Espectro UV-vis del extracto de las hojas de Matico en agua al 100%**

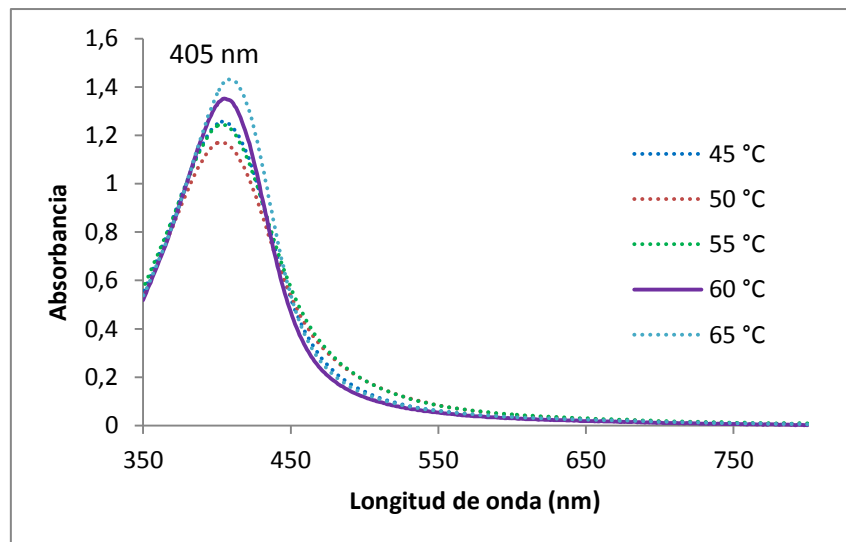
Anexo 3. Espectros de algunos parámetros de la optimización de las nanopartículas de plata.



**Espectro UV-Vis nanopartículas de plata con variación del tiempo de reacción**



**Espectro UV-Vis nanopartículas de plata con variación de pH durante la síntesis**



**Espectro UV-Vis nanopartículas de plata con al variar la temperatura de síntesis**

## **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

### **DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN**

Yo, Nathaly Yessenia Santorum Saaverda, C.I. 1723541262, autora del trabajo de graduación titulado: “Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando extracto de las hojas de Matico (*Piper aduncum*) como un agente reductor”, 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, 09 de enero de 2017

Srta. Nathaly Yessenia Santorum Saavedra

C.I. 1723541262