

Universidad del Papaloapan

Terra Ubellima, Mens Aperta

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTOS DE
CÁSCARA DE PIÑA (*Ananas comosus*)

PRESENTA

MITZI JOELY RAMIREZ HERNANDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Dr. Mario Valera Zaragoza

Director de tesis

Dr. Omar Viñas Bravo

Codirector de tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO DEP 2020/MCQ/002
ASUNTO Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 2 de marzo de 2020

C. MITZI JOELY RAMIREZ HERNÁNDEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores:

Dr. Erick Adrián Juárez Arellano	UNPA	Presidente
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dr. Mario Valera Zaragoza	UNPA	Vocal
Dr. Aurelio Ramírez Hernández	UNPA	1er Suplente
Dr. Edgar García López	Cátedra CONACyT	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales

Atentamente

terra abscondita, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C c p Dr. Mario Valera Zaragoza – Director de tesis
C c p L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares
C c p Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 48001, Tuxtepec, Oax.
Tel. 011 287 8729240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

V. Carretera al S. N., Ciudad Universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 011 281 8729240



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2020/0103
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 13 de marzo de 2020

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas de la **C. Mitzi Joely Ramirez Hernández**, matrícula **17130003**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Síntesis de nanopartículas de plata con extractos de cáscara de piña (*Ananas comosus*)**". para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jü



Dr. Adolfo López Torres

Director de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Mitzi Joely Ramirez Hernández – Estudiante
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729300

Dedico esta Tesis con todo mi amor: a **Dios** quien inspiro mi espíritu para la realización de este estudio, por darme salud y bendición para alcanzar mis metas como persona y como profesional.

AGRADECIMIENTOS

Si mis pobres amigas del mundo nanométrico conservasen el vigor mental del que gozaban cuando empezamos a redactar esta tesis, no tendría yo la necesidad de representarlas en estos párrafos, en los que desean, dar las gracias a sus lectores y críticos del mundo macro:

A mis directores de tesis el Dr. Mario Valera y Dr. Omar Viñas a los que agradezco la oportunidad de trabajar con ellos, por sus conocimientos y experiencias y sobre todo por su infinita paciencia ¡Muchísimas gracias!

Al Dr. Aurelio Ramirez gracias por sus consejos y sobre todo por su amistad, a la Dra. Ariana que gracias a sus preguntas y observaciones ayudó en la consolidación de esta tesis, al Dr. Miguel Ángel Peña gracias por compartir sus conocimientos y apoyo en el área biológica, al Dr. Diego Borin por su ayuda en el laboratorio de cultivo celular y sus consejos.

A mi familia, que siempre estuvieron presentes en cada una de mis etapas apoyándome siempre en cada paso y decisión tomada. A mis tíos Berna y Zuly siempre brindándome su apoyo para estudiar en esta ciudad. A Milthon, por su compañía en esta aventura ¡Gracias infinitas!

Que decir de mis compañeras de guerra: Silvia, Dulce, Nuria y Thalía, por hacer amenos mis días durante este periodo de mi vida estudiantil y sobre todo por su amistad. A Keyla, Edgar y Celia que aun sin conocerme no dudaron en tenderme su mano, gracias. Y también, a todos mis compañeros de la UNPA que a falta de espacio no he podido nombrarlos.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación y permitirme crecer como profesionista e investigadora.

Por esto y más, muchas gracias.

Contenido

Contenido.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	ix
I. INTRODUCCION.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNps).....	3
2.1.1 Propiedades ópticas.....	3
2.1.2 Propiedades antimicrobianas.....	5
2.1.3 Propiedades anticancerígenas.....	5
2.1.4 Síntesis de nanopartículas de plata.....	7
2.1.5 Síntesis verde de nanopartículas de plata.....	8
2.1.6 Proceso de formación de nanopartículas de plata.....	9
2.1.7 Compuestos polímero/ nanopartículas de plata.....	10
2.2 ETILENO-CO-VINILACETATO (EVA).....	11
2.3 PIÑA (<i>Ananas comosus</i>).....	12
III. ANTECEDENTES.....	15
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
V. JUSTIFICACIÓN.....	18
VI. HIPÓTESIS.....	19
VII. OBJETIVOS.....	20
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
VIII. METODOLOGÍA.....	21
8.1 MATERIALES.....	21
8.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
8.2.1 Obtención de extractos acuosos de cáscara de piña por dos métodos: infusión (ECPI) y asistida por ultrasonido (ECPU).....	22
8.2.2 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNps).....	22
8.2.3 Elaboración de nanocompuestos EVA/AgNps.....	23
8.2.4 Caracterización.....	24

8.2.4.1	Análisis termogravimétrico (TGA).....	24
8.2.4.2	Espectroscopía UV-Vis.....	24
8.2.4.3	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	24
8.2.4.4	Difracción de rayos X (DRX)	25
8.2.4.5	Análisis fitoquímico de los extractos de cáscara de piña	25
8.2.4.6	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	26
8.2.4.7	Determinación de la citotoxicidad mediante el ensayo de MTT	26
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
9.1	Obtención y caracterización de extractos acuosos de cáscara de piña por dos métodos: infusión y ultrasonido.....	27
9.1.1	Análisis termogravimétrico (TGA).....	27
9.1.2	Espectroscopía UV-Vis.....	28
9.1.3	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	29
9.1.4	Difracción de rayos X (DRX)	31
9.1.5	Análisis fitoquímico	31
9.2	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNps).....	34
9.2.1	Monitoreo de síntesis de AgNps.....	34
9.2.2	Espectroscopía UV-Vis.....	38
9.2.3	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	39
9.2.4	Difracción de rayos X (DRX)	42
9.2.5	Análisis termogravimétrico (TGA).....	45
9.2.6	Microscopía electrónica de transmisión TEM	46
9.2.7	Ensayos de la citotoxicidad por el método MTT en la línea celular MCF-7 y células mononucleares	49
9.3	ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS EVA/AgNps-AgClNps	53
9.3.1	Difracción de rayos X (DRX)	53
9.3.2	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	55
9.3.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	57
X.	CONCLUSIONES.....	59
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de morfologías de AgNps (a) Nanoesferas ¹² , (b) Nanocubos ¹³ , (c) Nanoalambres ¹⁴	3
Figura 2. Fenómeno de LSPR en nanopartículas metálicas.....	4
Figura 3 Espectros UV-Vis de (a) nanoesferas de Ag ¹⁷ , (b) nanocubos de Ag ¹⁶ , (c) nanoalambres de Ag ¹⁴	5
Figura 4. Mecanismo de toxicidad de nanoplata ²³	6
Figura 5. Representación esquemática del proceso de síntesis con extractos de plantas basada en la imagen de Ghosh y col. ³⁵	9
Figura 6. Representación esquemática del proceso de formación de AgNps basada en la imagen de Ghosh y col. ³⁵	9
Figura 7. Tipos de núcleos y su formación de AgNps.....	10
Figura 8. Copolímero etileno-co-vinilacetato	11
Figura 9. Piña (Ananas comosus)	12
Figura 10. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.....	21
Figura 11. Sistema utilizado para la síntesis de AgNps.	23
Figura 12. Termogramas de pérdida de peso de (a) ECPI y (b) ECPU.	27
Figura 13. Espectros UV-Vis de los extractos ECPI y ECPU.	29
Figura 14. Espectros FTIR de los extractos ECPI y ECPU.....	29
Figura 15. Difractograma de los extractos ECPI y ECPU.....	31
Figura 16. Identificación de taninos en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.	32
Figura 17. Identificación de compuestos polifenólicos en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.	32
Figura 18. Identificación de cumarinas en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.....	33
Figura 19. Identificación de flavonoides en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.....	33
Figura 20. Formación de AgNps en el sistema RIamb.....	34
Figura 21. Formación de AgNps en el sistema RUamb.	35
Figura 22. Formación de AgNps en el sistema RI60.....	35
Figura 23. Formación de AgNps en el sistema RU60.	36
Figura 24. Formación de AgNps en el sistema RI80.....	36
Figura 25. Formación de AgNps en el sistema RU80.	37
Figura 26. Formación de AgNps en el sistema RI100.....	37
Figura 27. Formación de AgNps en el sistema RU100.	38

Figura 28. Espectros UV-Vis de AgNps con (a) ECPI y (b) ECPU.....	39
Figura 29. Espectros FTIR de AgNps con (a) ECPI y (b) ECPU.....	40
Figura 30. Magnificación de los espectros FTIR mostrando las señales indicadas como 1, 2, 3 y 4 de los productos de reacción con (a y c) ECPI y (b y d) ECPU.....	41
Figura 31. Magnificación de los espectros FTIR de los productos de reacción indicando la desaparición de las señales i, j y m provenientes de los extractos (a) ECPI y (b) ECPU.....	42
Figura 32. Difractogramas de las AgNps con (a) ECPI y (b) ECPU.	42
Figura 33. Termogramas de pérdida de masa de los sistemas AgNps-AgClNps (a) RIamb, (b) RI60, (c) RI80 y (d) RI100.	45
Figura 34. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RIamb, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de las nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.....	46
Figura 35. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RI60, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de las nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.	47
Figura 36. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RI80, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de las nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.	47
Figura 37. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RI100, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.	48
Figura 38. Gráfica de los resultados de citotoxicidad de AgNps-AgClNps de los sistemas RIamb, RI60, RI80, RI100 sobre células MCF-7.....	49
Figura 39. Gráfica de los resultados de citotoxicidad de los extractos de los sistemas ECPIamb, ECPI60, ECPI80 y ECPI100 sobre células MCF-7.....	50
Figura 40. Micrografías de la prueba MTT frente a células MCF-7.....	51
Figura 41. Gráficos de los resultados de citotoxicidad en células mononucleares de (a) AgNps-AgClNps de los sistemas RI60 y RI80, (b) Extractos de los sistemas ECPI60 y ECPI80	52
Figura 42. Películas EVA/AgNps-AgClNps (a) RIamb, (b) RI60, (c) RI80 y (d) RI100.	53
Figura 43. Difractograma de las películas EA/AgNps-AgClNps.	53
Figura 44. Espectros FTIR de las películas (a) EAamb, (b) EA60, (c) EA80 y (d) EA100.	55
Figura 45. Señal 1 y 2 en los espectros FTIR de las películas EA/AgNps-AgClNps.	56
Figura 46. Deformación de la señal e en el espectro FTIR de EA80.	57
Figura 47. Termogramas de las películas (a) EAamb, (b) EA60, (c) EA80 y (d) EA100.	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos métodos físicos, químicos y fotoquímicos para la síntesis de AgNps ³¹	7
Tabla 2. Métodos verdes de síntesis de AgNps usando extractos de plantas.....	8
Tabla 3. Algunos componentes fitoquímicos de la cascara de piña (Ananas comosus)	13
Tabla 4. Códigos de reacción de AgNps	22
Tabla 5. Códigos de elaboración de nanocompuestos EVA/AgNps	23
Tabla 6. Pruebas fitoquímicas cualitativas	25
Tabla 7. Bandas de absorción asignadas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en ECPI y ECPU	30
Tabla 8. Resultados del análisis fitoquímico cualitativo.....	31
Tabla 9. Bandas de absorción asignadas al espectro de AgNO ₃	40
Tabla 10. Comparación de ángulos de difracción experimental con estándar Ag COD 9008459. ...	43
Tabla 11. Comparación de ángulos de difracción experimental con estándar AgCl COD 9011666. 44	
Tabla 12. Comparación de ángulos de difracción experimental con estándar Ag COD 9008459 y estándar AgCl COD 96901167.	54
Tabla 13. Bandas de absorción asignadas a los grupos funcionales del copolímero EVA.....	56

I. INTRODUCCION

En la actualidad, las nanopartículas ocupan un amplio campo en la investigación científica, gracias a su potencial para ser utilizadas en sectores como textil¹, agrícola², de cosmética³, construcción⁴ y en biomedicina⁵ por citar algunos ejemplos.

La síntesis tradicional de nanopartículas involucra la utilización de disolventes, agentes reductores y estabilizantes que pueden ser de tipo inorgánico, metales, óxidos metálicos, etc. Así mismo, la mayoría de las metodologías de síntesis requieren condiciones o equipos especiales. Una de las mayores preocupaciones causadas a partir de estas técnicas es la formación y acumulación de desechos tóxicos en el medio ambiente, lo cual puede afectar de forma considerable a todos los organismos que habitan en él y por consiguiente el cambio del equilibrio ecológico. Por estas razones, en las recientes investigaciones se ha puesto empeño en buscar y desarrollar nuevos métodos de síntesis que sean amigables con el medio ambiente, asequibles y de fácil realización.

Las nuevas estrategias de síntesis han recaído principalmente en el aprovechamiento de plantas, semillas, frutas y microorganismos como agentes para fabricar nanopartículas. Por ejemplo; se ha reportado la síntesis de nanopartículas de oro usando extractos de hojas de hibisco⁶, síntesis de nanopartículas de óxido de cobre utilizando distintas cepas de *Penicillium*⁷, síntesis de nanopartículas de dióxido de titanio a partir de extractos de hojas del árbol Pariyata⁸, de nanopartículas de plata usando extractos de cascara de papaya⁹, etc.

Con base en el potencial de uso de nanopartículas, las nanopartículas de plata son conocidas por tener un amplio espectro de propiedades biológicas y han sido incorporadas en distintos soportes, los cuales en su mayoría son de carácter polimérico (celulosa, polivinilpirrolidona, almidón, etc.); desarrollando así productos antimicrobianos, antiparasitarios, antioxidantes y recientemente productos con propiedades anticancerígenas y antidiabéticas.

Debido a lo anterior, en la presente investigación se realizó la síntesis de nanopartículas de plata (AgNps) con extractos acuosos de cáscara de piña (*Ananas comosus*) para evaluar su actividad anticancerígena y su inclusión en la matriz polimérica etileno acetato de vinilo (EVA).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNps)

Se ha reportado que las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen un tamaño promedio menor a 100 nm y cada nanopartícula puede contener de 15,000 a 20,000 átomos de plata¹⁰. La mayor parte de las AgNps poseen una estructura de tipo núcleo-coraza, el núcleo constituido por átomos Ag^0 puede variar de tamaño y forma dando origen a distintas morfologías, por ejemplo: nanoesferas, nanocubos, nanoalambres, nanoplatos triangulares (Figura 1), y una coraza que puede ser de tipo orgánico como polivinilpirrolidona o citrato o de tipo inorgánico como sulfuro o cloruro de plata¹¹.

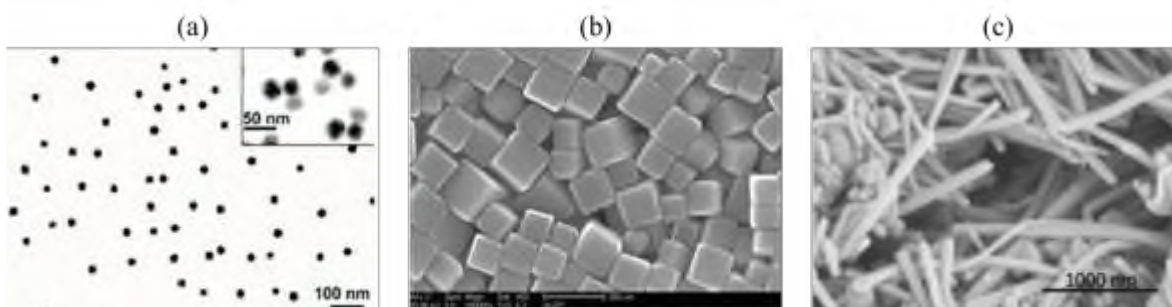


Figura 1. Tipos de morfologías de AgNps (a) Nanoesferas¹², (b) Nanocubos¹³, (c) Nanoalambres¹⁴.

Las AgNps presentan mejores propiedades eléctricas, magnéticas y catalíticas con que las partículas de plata de mayor tamaño. Por ello, las posibles aplicaciones de las nanopartículas de Ag tienen un amplio alcance. No obstante, su importancia se debe principalmente a sus propiedades ópticas y a sus propiedades antimicrobianas y más recientemente a su actividad anticancerígena.

2.1.1 Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas están determinadas por la aparición de plasmones de superficie localizados (LSP), estos son oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos los cuales se manifiestan con la

aparición de una intensa banda de absorción en la región del espectro visible (resonancia de plasmón de superficie localizado, por sus siglas en inglés LSPR).¹⁵

El fenómeno de LSPR (Figura 2) ocurre cuando las nanopartículas tienen un tamaño menor que la longitud de radiación incidente, en consecuencia, esta radiación induce un dipolo eléctrico desplazando a una parte de los electrones móviles deslocalizados generando así una carga neta negativa en un lado de las nanopartículas y como el resto de los núcleos y sus electrones internos no se han desplazado, constituyen una carga opuesta positiva.¹⁵

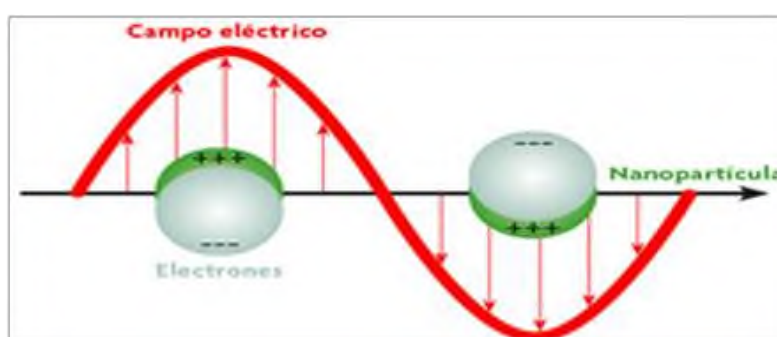


Figura 2. Fenómeno de LSPR en nanopartículas metálicas.

Esta interacción es dependiente de la morfología, tamaño, cristalinidad y naturaleza química de las nanopartículas además, de las condiciones físicas y químicas del medio circundante alrededor de las mismas¹⁵. Por ejemplo las nanoesferas de Ag (Figura 3a) presentan una absorción alrededor de 410-430 nm, esto se debe a que la frecuencia de absorción del plasmón es la misma en cualquier dirección donde se propague la radiación por efecto de su morfología. Los nanocubos de plata (Figura 3b) muestran un pico de 407 nm que normalmente se atribuye a la resonancia de plasmón de superficie dipolo en plano¹⁶. Los nanoalambres de Ag (Figura 3c), presentan absorciones alrededor de 380 nm correspondiente a la absorción transversal junto con el pico característico de nanoplata en 410 nm y en 350 nm la absorción longitudinal¹⁴

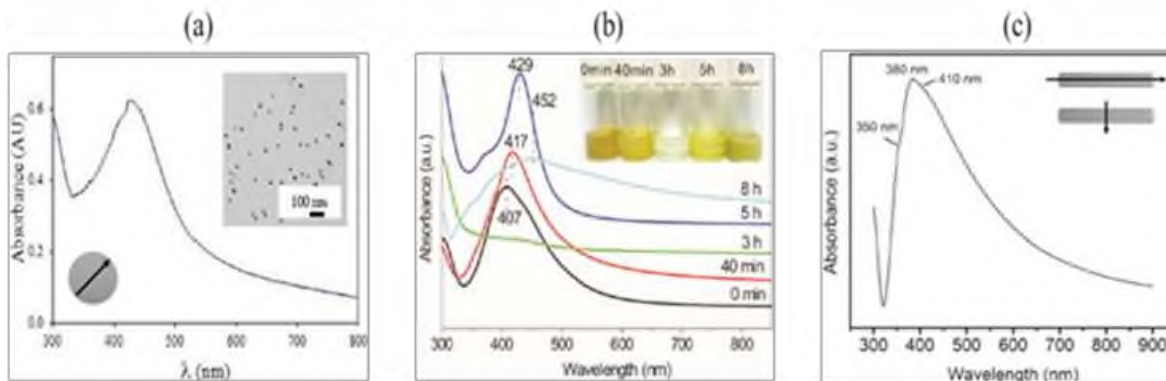


Figura 3. Espectros UV-Vis de (a) nanoesferas de Ag^{17} , (b) nanocubos de Ag^{16} , (c) nanoalambres de Ag^{14} .

2.1.2 Propiedades antimicrobianas

Las nanopartículas de Ag presentan propiedades antimicrobianas que dependen de factores como tamaño, morfología, concentración de AgNps, etc. Para comprender mejor la propiedad antimicrobiana de las NP de Ag, es esencial describir el mecanismo de acción, el cual se divide en dos pasos. El primer paso consiste en la liberación de iones de Ag^+ , el segundo paso es la interacción del ion Ag^+ con la membrana celular, lo que resulta en la inhibición de las funciones de las proteínas bacterianas, lo que detiene la proliferación microbiana y conduce a la muerte celular¹⁸. Esta capacidad ha sido evaluada frente a cepas de *S. typhi*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*¹⁹ y *K. pneumoniae*²⁰, entre otras.

2.1.3 Propiedades anticancerígenas

Se ha demostrado que las AgNPs tienen importantes actividades bactericidas y antiangiogénicas, siendo atractivas en la investigación de sus potenciales efectos anticancerígenos²¹. Sin embargo, los mecanismos no se conocen claramente debido a características como el tamaño y forma. A pesar de la influencia de estas características, existen distintas teorías mediante las cuales se ha tratado de explicar el mecanismo de acción de las AgNps sobre células cancerígenas.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo son generalmente aceptados como los mecanismos probables de toxicidad inducida por nanopartículas ²². AshaRani y col. ²³ propusieron un mecanismo de toxicidad, el cual consiste en la captación de AgNps principalmente a través de la endocitosis, afectando la función mitocondrial y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales ocasionan daño al ADN y posteriormente la inhibición de la proliferación celular (Figura 4). De igual manera los autores plantean que las AgNps actúan mediante transitorios de calcio intracelular (Ca^{+2}) provocando así daño en el citoesqueleto y por consecuencia la inhibición de la proliferación celular.

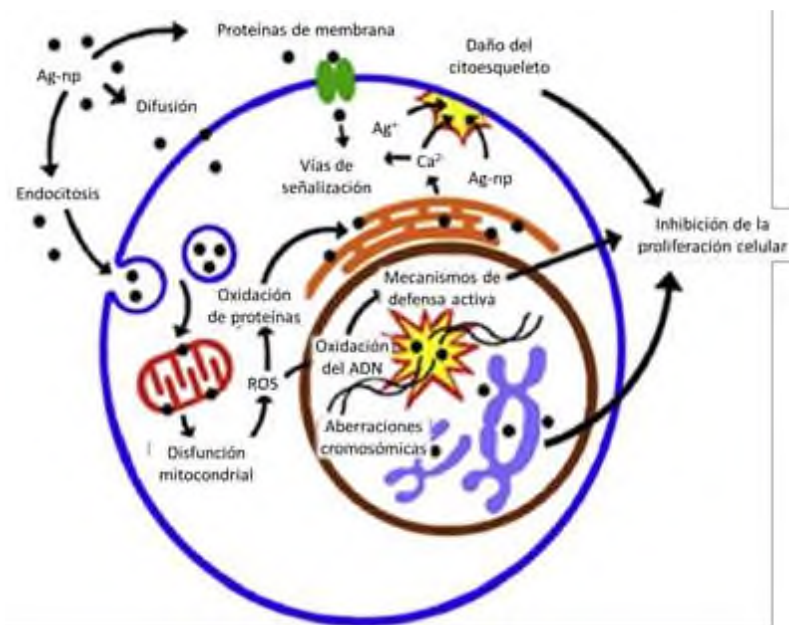


Figura 4. Mecanismo de toxicidad de nanopartícula ²³.

Bressan y col. ²⁴ demostraron la acumulación de AgNps fuera de las mitocondrias por lo que sugieren daño mitocondrial directo, lo cual perturba la función de la cadena respiratoria e induce la generación de ROS y por consiguiente el estrés oxidativo.

Otra teoría sugiere que la viabilidad celular se ve afectada gracias al deterioro de la membrana celular, esto es posible debido a la gran afinidad entre AgNps con el azufre y fósforo presentes en las proteínas de la membrana lo que ocasiona la fuga del contenido celular y por lo tanto la muerte de la célula ²⁵.

2.1.4 Síntesis de nanopartículas de plata

Existen dos grandes categorías de métodos para sintetizar AgNps: Top-down, el cual consiste en la reducción de un material de tamaño adecuado hasta llegar a la escala nanométrica y Bottom-up en donde la nanoestructura se construye átomo por átomo. Una clara ventaja de Bottom-up es la posibilidad de obtener AgNps con defectos comparativamente menores en contraste con Top-down ²⁶.

De los distintos métodos englobados en las categorías anteriores, la reducción química es el método aplicado con más frecuencia ²⁷. Sin embargo, estos métodos convencionales (Tabla 1) no solo son costosos y requieren condiciones estrictas, sino también son ambientalmente hostiles debido a los químicos tóxicos que son utilizados ²⁸. Se han utilizado sustancias peligrosas como borohidruro de sodio e hidroxilamina para la síntesis de nanopartículas en métodos acuosos. Por lo tanto, ha surgido la necesidad de desarrollar procesos ecológicos, económicos y eficientes para sintetizar nanopartículas de plata ^{29,30}.

Tabla 1. Algunos métodos físicos, químicos y fotoquímicos para la síntesis de AgNps³¹

Método	Precursor de plata	Agente reductor	Agente estabilizante	Tamaño de partícula
Reducción química	AgNO ₃	NaHB ₄	Surfactina	3-28
Reducción química	AgNO ₃	Citrato de sodio	Citrato de sodio	30-60
Reducción química	AgNO ₃	NaHB ₄	DDA	~7
Reducción química	AgNO ₃	Etilenglicol	PVP	5-25
Síntesis física	AgNO ₃	Descarga de arco eléctrico	Citrato de sodio	14-27
Reducción fotoquímica	AgNO ₃	Luz UV	-	4-10
Reducción fotoquímica	Ag ₂ SO ₄	Rayos X	-	~28

NaHB₄: borohidruro de sodio; DDA: ácido dodecanoico; PVP: polivinilpirrolidona

Actualmente, se está llevando a cabo una extensa investigación con sistemas biológicos como microorganismos, plantas, residuos alimentarios o sus extractos que pueden emplearse como agentes reductores para la síntesis de AgNps; se ha reportado que estos materiales pueden contener diversas combinaciones de biomoléculas como aminoácidos, vitaminas y polisacáridos que tienen el potencial reductor y que son benignos desde el punto de vista ambiental ³².

2.1.5 Síntesis verde de nanopartículas de plata

Algunos métodos de síntesis denominados verdes utilizan sistemas biológicos como extractos de plantas para fabricar AgNps (Tabla 2). Una clara diferencia con los métodos convencionales es que en estos no se usa agente surfactante, agente de cobertura y/o plantilla ³³. En los métodos de síntesis con sistemas biológicos es preferible el uso de plantas o residuos alimentarios sobre microorganismos, ya que los primeros no necesitan del mantenimiento de cultivos celulares ³⁴. Por ello, la utilización de extractos de plantas o residuos alimentarios para producir AgNps está tomando una gran notoriedad. La razón por la cual estos extractos funcionan bien es porque biomoléculas como polisacáridos, polifenoles, aldehídos, cetonas, proteínas, saponinas, taninos, terpenoides y vitaminas pueden reducir el ion metálico y estabilizar las nanopartículas en las formas y tamaños deseados^{29,35}.

Tabla 2. Métodos verdes de síntesis de AgNps usando extractos de plantas.

Sistema	Parte de la planta	Autor
<i>Argyrea nervosa</i>	hojas	Saratele y col. ³⁶
<i>Musa paradisiaca</i>	cáscara	Bankar y col. ³⁷
<i>Citrus sinensis</i>	cáscara	Konwarh y col. ³⁸
<i>Dactylopius coccus</i>	casara	Goudarzi y col. ³⁹
<i>Zea mays L.</i>	pelos de elote	Patra y col. ⁴⁰
<i>Carica papaya</i>	cáscara	Kokila y col. ⁹
<i>Stevia rebaudiana</i>	hojas	Yilmaz y col. ⁴¹

2.1.6 Proceso de formación de nanopartículas de plata

La síntesis de AgNps (Figura 5) es un proceso simple que comienza mezclando una solución de sal metálica (por lo general AgNO_3) con una solución de extracto de planta o residuo alimentario. Este proceso se ve influenciado por parámetros como la naturaleza del extracto, concentración del extracto y de sal metálica, tiempo de reacción, temperatura, agitación y pH de la mezcla de reacción ³⁵.



Figura 5. Representación esquemática del proceso de síntesis con extractos de plantas basada en la imagen de Ghosh y col.³⁵

Numerosos estudios indican que el mecanismo general de formación de AgNps es una reacción de tipo óxido-reducción (Figura 6), en la cual los iones Ag^{1+} son reducidos a Ag^0 gracias a los metabolitos presentes en el extracto, una vez que los átomos se encuentran en estado basal comienza la formación de núcleos los cuales con predecesores de partículas mas grandes.

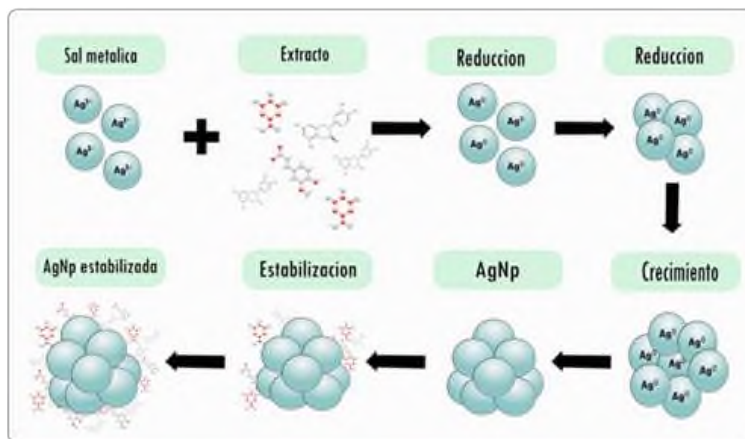


Figura 6. Representación esquemática del proceso de formación de AgNps basada en la imagen de Ghosh y col.³⁵

Se considera que los núcleos precursores de partículas granulares y planas se forman mediante el crecimiento en dirección del plano (111). Cuando estos son de tipo policristalino la morfología de la AgNp será de tipo granular y cuando los núcleos son monocristalinos la morfología es plana (Figura 7). Progresivamente, las partículas vecinas más pequeñas comienzan a ensamblarse en sus caras de baja energía, lo que finalmente da como resultado la formación de nanopartículas termodinámicamente estables^{35,42}.

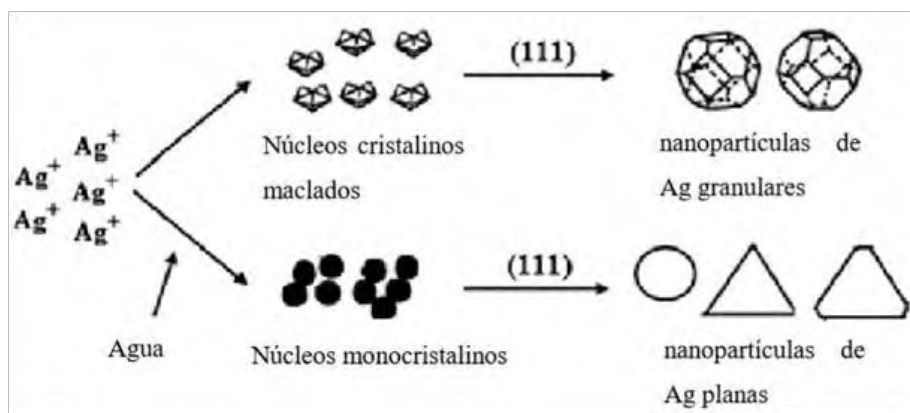


Figura 7. Tipos de núcleos y su formación de AgNps.

2.1.7 Compuestos polímero/ nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata tienen una excelente actividad biológica, sin embargo, aspectos como la aglomeración y la liberación controlada de estas son los principales problemas por resolver; una estrategia para solucionar estos inconvenientes es el atrapamiento de AgNps en diversos sustratos y matrices. En este contexto, los polímeros son los materiales de primera prioridad debido a sus estructuras flexibles, con grupos funcionales adecuados en largas cadenas poliméricas que pueden permitir la incorporación y la inmovilización de nanopartículas para formar nanocompuestos⁴³.

Para realizar estos compuestos poliméricos es importante tener en cuenta algunas características, tales como el peso molecular, morfología, la naturaleza y el carácter hidrofílico-lipofílico del polímero, así como la interacción polímero-solvente y la relación en peso polímero-AgNPs⁴⁴.

En general, hay varias matrices poliméricas para la síntesis de nanocompuestos polímero/AgNps como almidón, carboximetil-celulosa sódica, β -D-glucosa ⁴⁵, celulosa, polivinil alcohol (PVA), quitosano, quitina, poli(etilenglicol-dimetacrilato-co-acrilonitrilo) entre otros, con excelentes resultados en actividad biológica, evidenciando así que la actividad de las AgNps se mantiene a pesar de estar dispersadas en el polímero.

2.2 ETILENO-CO-VINILACETATO (EVA)

El etileno acetato de vinilo EVA, es un polímero termoplástico formado por unidades repetitivas de etileno y acetato de vinilo (Figura 8). Se designa como EVA (por sus siglas en inglés, ethylene vinyl acetate). Es un material plástico liviano, el cual se puede encontrar en bloques, láminas o pellets. El EVA ofrece la ventaja de ser un material el cual se puede imprimir, troquelar, cortar, pegar, pintar o lavar ⁴⁶. La cristalinidad, el punto de fusión, la rigidez y la polaridad del EVA están determinados predominantemente por el contenido de acetato de vinilo ⁴⁷.

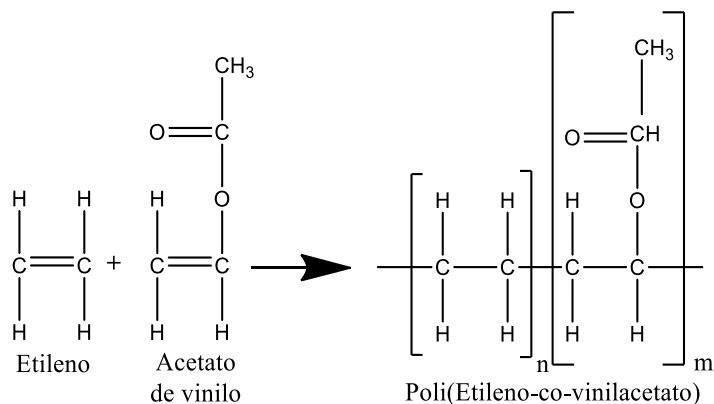


Figura 8. Copolímero etileno-co-vinilacetato

La amplia utilización del EVA se debe a la simplicidad de procesamiento mediante calor, su bajo costo y flexibilidad ⁴⁸. Es uno de los copolímeros más útiles como aislante de cables, suelas de zapatos, adhesivo de fusión en caliente o como recubrimiento, y en el campo de la biomedicina ha sido usado como sustrato para la liberación controlada de fármacos en dispositivos intravítreos para el tratamiento de la inflamación y enfermedades en ojos, también ha sido utilizado como un recubrimiento liberador de antibióticos en catéteres uretrales y en páncreas artificiales^{49,50}.

2.3 PIÑA (*Ananas comosus*)

La piña (*Ananas comosus*) es una fruta económicamente importante debido a su sabor único, es el elemento más importante de la familia de las bromeliáceas y sigue a las bananas, mangos y cítricos en términos de la producción mundial de frutas tropicales ⁵¹.

De acuerdo con datos presentado por SAGARPA, en el año 2017 se cosecharon 945,210.08 toneladas de piña en México, de las cuales Oaxaca contribuyó con 130,436.59 toneladas y de estas 34,440.00 toneladas pertenecen al municipio de San Juan Bautista Tuxtepec ⁵².

Por lo general, la piña (Figura 9) tiene como fin su consumo como fruta fresca, en jugos, concentrados, en almíbar, etc. Debido al procesamiento de la piña se generan grandes cantidades de residuos sólidos y líquidos, de los cuales la cáscara representa la porción más grande (30-42 %), seguida por el corazón (9-10 %) y el tallo (25 %) ⁵³; en ocasiones estos residuos se utilizan parcialmente como alimento o compostaje para la fertilización ⁵⁴, para la producción de etanol, ácido cítrico o vinagre. Sin embargo, la mayor parte del tiempo tiende a descartarse lo que causa problemas ambientales como la contaminación y en consecuencia, pérdida económica.

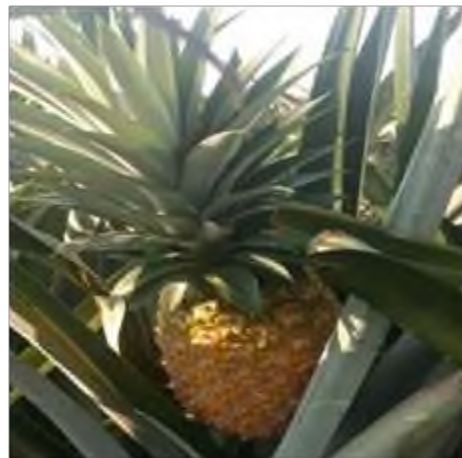
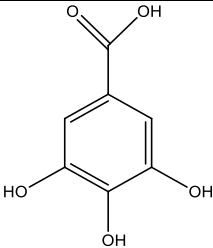
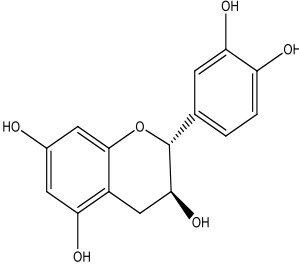
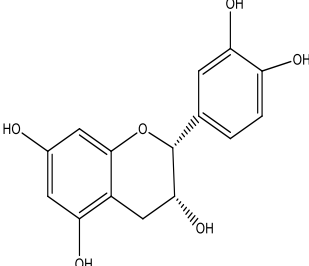
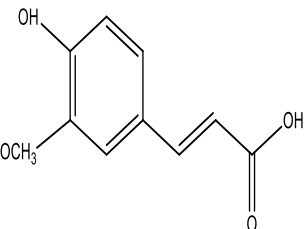
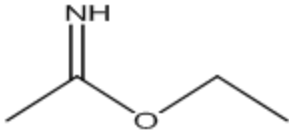
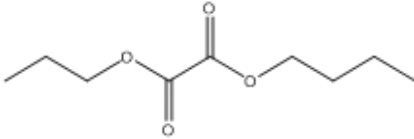
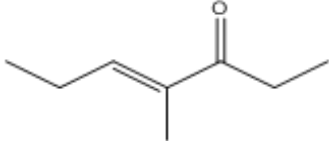

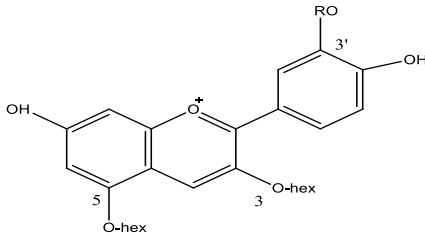


Figura 9. Piña (*Ananas comosus*)

La cáscara de piña contiene biopolímeros como celulosa, hemicelulosa y lignina ⁵⁵, también contiene compuestos como catequina, epicatequina, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido etanídico éster etílico, éster butílico de butilpropilo, propano, 4-hepten-3-ona-4-metil, ácido carbámico monoamón, glicidol, flavonoides, derivados de diglicéridos de hidroxicinamoilo, diferuloil espermidina, cianidina trihexósido, cianidina dihexósido entre otros (Tabla 3)⁵⁶⁻⁵⁸.

Tabla 3. Algunos componentes fitoquímicos de la cascara de piña (Ananas comosus)

Nombre	Estructura
Ácido gálico	
Catequina	
Epicatequina	
Ácido ferúlico	

Nombre	Estructura
Ácido etanídico éster etílico.	
Ácido oxálico butil propil éster	
4-Hepten-3-ona,4-metil	
Peróxido de di-terc-butilo	
Cianidina dihéxosido y trihéxosido	

III. ANTECEDENTES

García y colaboradores⁵⁹, reportaron la síntesis de nanopartículas Fe-TiOx magnéticas con cáscara de piña (CPa-Fe/TiOx) y borohidruro de sodio (NaBH₄) para evaluar su capacidad de absorción de As(V). Los resultados por TEM indicaron la obtención de nanopartículas esféricas con 5,7 nm de diámetro distribuidas en la superficie de la cáscara de piña con una relación molar Ti: Fe de 2: 1, mientras que los resultados por DRX mostraron que el material es amorfo. Los espectros IR del CPa-Fe/TiOx indicaron la existencia de grupos hidroxilos y carboxilos en el material compuesto.

Palem y colaboradores⁶⁰, reportaron un estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas, antimicrobianas y anticancerígenas de AgNps sintetizadas con extracto acuoso de ruibarbo (RS-AgNPs) y de nanocompuestos de plata reticulados con quitosano (CSHD-AgNCs). La caracterización por TEM reveló que las RS-AgNPs tienen un tamaño <5 nm y CSHD-AgNCs un tamaño de 5-100 nm. Ambos sistemas presentaron una estructura cubica centrada en las caras. La propiedad anticancerígena de RS-AgNPs y CSHD-AgNCs se evaluaron contra la línea celular HeLa mediante el método MTT durante 24 h. Los resultados demostraron que los RS-AgNPs tienen una toxicidad mayor en comparación con CSHD-AgNCs.

Bello y colaboradores⁶¹, reportaron la síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de *Hyphaene thebaica*, los análisis por TEM mostraron la formación de AgNps de aproximadamente 20 nm. Se analizó su actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer, el efecto de AgNps fue más notorio en la línea celular de cáncer de próstata PC3 (IC₅₀ 2.6 mg/ml) seguido de cáncer de mama MCF-7 (IC₅₀ 4.8 mg/ml) y por último cáncer de riñón HepG2 (IC₅₀ 6.8 mg/ml).

Emeka y colaboradores ⁶², reportaron el uso de hojas de piña para la síntesis de nanopartículas de Ag. Las nanopartículas obtenidas se sometieron a análisis UV-vis a diferentes tiempos de síntesis, lo cual permitió controlar la formación de nanopartículas de plata a través del muestreo a intervalos de tiempo. La evidencia de bandas del plasmón de superficie (SPB) entre 440 y 460 nm evidenciaron la formación de nanopartículas de plata. Los resultados por TEM mostraron la obtención de partículas de 12.4 nm.

Ahmad y colaboradores ⁶³, reportaron la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando jugo de pulpa de piña para reducir el nitrato de plata acuoso a plata metálica. Las micrografías obtenidas por TEM mostraron partículas esféricas con un tamaño promedio de 12 nm. El patrón de XRD mostró picos de Bragg característicos de los planos (111), (200), (220) y (311), considerando estructuras cristalinas tipo cubica centrada en la cara (fcc). Los autores mostraron que los antioxidantes presentados en el jugo de piña reducen sinérgicamente los iones de Ag. El proceso de reacción fue simple para la formación de nanopartículas de plata y las AgNPs fueron bastante estables, incluso después de 4 meses de incubación.

Dentro de nuestro grupo de investigación, en un trabajo preliminar, Flores ⁴² reportó la síntesis de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de la planta *Stevia rebaudiana* y la incorporación de las nanopartículas obtenidas en almidón para obtener biopelículas nanoestructuradas. Los resultados mostraron que las AgNps se forman en menor tiempo cuando se suministra temperatura al sistema de reacción. Además, la concentración molar de la sal AgNO_3 influye en la morfología de las nanopartículas. Mediante el estudio morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observó que cambios en la velocidad de agitación y de incorporación de la sal AgNO_3 permite la obtención de morfologías tales como nanobarras, nanoplatos triangulares y nanoplatos hexagonales.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La plata es uno de los materiales más utilizados debido a las distintas propiedades que presenta cuando se encuentra en tamaño nanométrico. Debido a su amplia utilización, su producción se ha visto incrementada, sin embargo, los métodos convencionales involucran la utilización de agentes reductores y/o estabilizantes y la acumulación de residuos tóxicos, por lo tanto, es deseable utilizar métodos alternativos que sean amigables con el medio ambiente.

La fabricación de nanopartículas mediada por residuos de productos agrícolas ha sido propuesta como una alternativa económica y respetuosa con el ambiente, favoreciendo así la obtención de nanopartículas con el menor daño ambiental posible. A pesar de la alta capacidad de acción biológica que pueden tener las nanopartículas de plata, no son aprovechadas, debido a que pueden colapsar y aglomerarse afectando su funcionalidad. No obstante, uno de los inconvenientes presentes en la síntesis de nanopartículas de plata es su dispersión por ello se ha planteado la utilización de matrices de distintos tipos para solucionar este problema.

V. JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente utilización de nanopartículas de plata, su producción se ha visto incrementada, no obstante, dos de los principales retos en la síntesis de nanopartículas de plata es la utilización de un método amigable con el medio ambiente y la correcta dispersión de nanopartículas en matrices de diferentes tipos, por ello en la presente investigación se propone el uso de la cascara de piña (*Ananas comosus*) como posible agente reductor y estabilizador en la síntesis de nanopartículas de plata, potencializando así el aprovechamiento de estos subproductos, dándole valor agregado y provocando un menor impacto ambiental; conjuntamente la inmovilización de AgNPs en copolímero etileno acetato de vinilo (EVA) podría generar materiales con capacidades biológicas importantes debido a las posibles propiedades anticancerígenas de las nanopartículas de plata.

VI. HIPÓTESIS

Algunos metabolitos presentes en los extractos de la cascara de piña (*Ananas comosus*) podrían funcionar como agente reductor y/o estabilizador en la síntesis de nanopartículas de plata lo cual podría generar nanopartículas que presenten compatibilidad con la matriz polimérica EVA (etileno acetato de vinilo) para preparar materiales con capacidades anticancerígenas.

VII. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Preparar nanocompuestos EVA/AgNps utilizando nanopartículas de plata obtenidas por síntesis con extracto de cáscara de piña (*Ananas comosus*) y analizar su actividad anticancerígena.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener extractos de cáscara de piña (*Ananas comosus*) por dos métodos: infusión y ultrasonificación y caracterizar térmica y estructuralmente.
- Obtener nanopartículas de plata (AgNPs) usando los extractos de cáscara de piña (*Ananas comosus*) y caracterizar térmica, estructural y morfológicamente.
- Preparar nanocompuestos poliméricos EVA/AgNPs y analizar su comportamiento estructural y térmico.
- Estudiar el comportamiento anticancerígeno de las AgNps obtenidas en células de cáncer de mama MCF-7.

VIII. METODOLOGÍA

8.1 MATERIALES

Para la síntesis de nanopartículas de plata se utilizaron extractos acuosos de cáscara seca de piña (*Ananas comosus*) MD-2, recolectada en plantíos de la región del Papaloapan, Oaxaca y la sal metálica nitrato de plata (AgNO_3) adquirida en Sigma-Aldrich, con peso molecular de 169.87 uma y numero CAS 7761-88-8. Para la elaboración de las películas se utilizó el polímero etileno acetato de vinilo (EVA) Elvax 40W, adquirido de DuPont Co. y disolventes hexano (C_6H_{14}) y diclorometano (CH_2Cl_2) adquirido en Sigma-Aldrich.

8.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este trabajo de investigación se dividió en 3 etapas. En la primera etapa se obtuvieron los extractos de la cascara de piña seca. En la segunda etapa se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de plata (AgNps). Por último, en la tercera etapa se realizó la elaboración de nanocompuestos EVA/AgNps. En cada etapa se realizaron las respectivas caracterizaciones de los productos obtenidos (Figura 10).

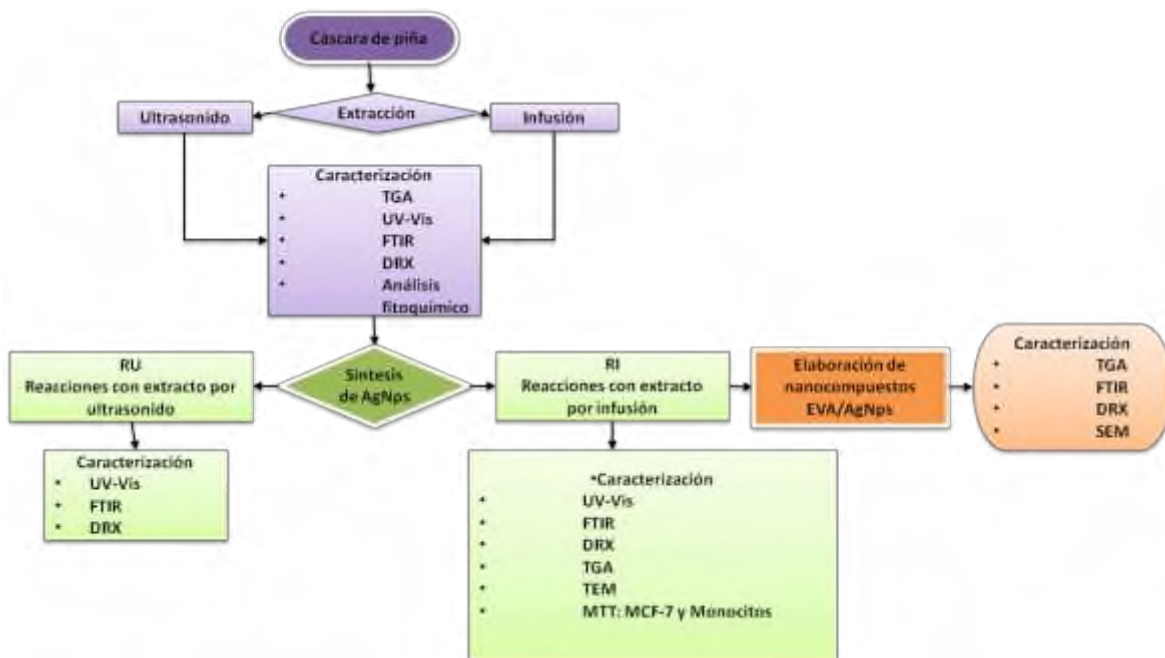


Figura 10. Diagrama de flujo del desarrollo experimental

8.2.1 Obtención de extractos acuosos de cáscara de piña por dos métodos: infusión (ECPI) y asistida por ultrasonido (ECPU)

Se utilizó cascara de piña la cual fue secada hasta peso constante, posteriormente se trituro y se obtuvieron los extractos acuosos de la siguiente forma:

Extracto de cascara de piña por infusión (ECPI): se pesaron 100 g de cáscara de piña seca, se colocaron en un papel filtro cafetero y se llevó a cabo la infusión con 1 L de agua destilada en cafetera óster®. La solución se filtró al vacío y se llevó a rotaevaporación a 50 °C, 250 rpm y 42 mbar.

Extracto de cascara de piña por ultrasonido (ECPU): se pesaron 100 g de cáscara de piña seca, se procedió a diluir en 1 L de agua destilada y se llevó a extracción asistida por ultrasonido en baño ultrasónico Branson™ en dos ciclos de 15 min y un periodo de reposo de 5 min entre cada ciclo. La solución se filtró al vacío y se llevó a rotaevaporación a 50 °C, 250 rpm y 42 mbar.

8.2.2 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNps)

La síntesis se realizó utilizando como precursor la sal metálica AgNO₃ (nitrato de plata) y como agente reductor los extractos acuosos obtenidos anteriormente. Las AgNps fueron sintetizadas en un sistema a reflujo con baño maría (Figura 11), utilizando una relación de 90 % de AgNO₃ (con una concentración de 10 mM) y 10 % de extracto (con una concentración de 10 % peso/volumen) a 500 rpm durante un periodo de 2 h, teniendo como parámetro variable la temperatura (Tabla 4). Posteriormente, los productos se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis y después fueron secadas a 110 °C por 24 h para posteriores caracterizaciones.

Tabla 4. Códigos de reacción de AgNps

ECPI	Temperatura [°C]	ECPU
RI _{amb}	Ambiente	RU _{amb}
RI ₆₀	60	RU ₆₀
RI ₈₀	80	RU ₈₀
RI ₁₀₀	100	RU ₁₀₀



Figura 11. Sistema utilizado para la síntesis de AgNps.

8.2.3 Elaboración de nanocompuestos EVA/AgNps

La elaboración de las películas EVA/AgNps se realizó por el método casting, dispersando AgNps en 2 ml de hexano (C_6H_{14}) después se añadió 5 ml de diclorometano (CH_2Cl_2) y por último se agregó 0.5 g de EVA con 40 % de acetato de vinilo, este proceso se realizó a 400 rpm durante 4 h con una concentración de 20 mg de AgNps obtenidas con extracto por infusión, esto debido a que el método de extracción por infusión presento ventajas sobre el método de extracción por ultrasonido.

Tabla 5. Códigos de elaboración de nanocompuestos EVA/AgNps

Contenido de AgNps	Código			
20 mg	EAamb	EA60	EA80	EA100

8.2.4 Caracterización

Las siguientes técnicas fueron empleadas para caracterizar estructural, térmica y biológicamente a los extractos ECPI y ECPU, los productos de reacción (AgNps) y a los nanocompuestos EVA/AgNPs.

8.2.4.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

El comportamiento térmico fue analizado en el equipo de análisis termogravimétrico modelo STA 6000, marca Perkin Elmer. Los extractos de cascara de piña y los productos de reacción (AgNps) fueron analizados en un rango de 30 a 800 °C y para los nanocompuestos EVA/AgNPs se utilizó un rango de 30 a 900 °C. Todos los experimentos fueron corridos a una velocidad de 20 °C/min y bajo una atmósfera inerte de nitrógeno con flujo de 20 mL/min.

8.2.4.2 Espectroscopía UV-Vis

Los espectros de los extractos de cascara de piña y productos de reacción (AgNps) fueron obtenidos en un espectrofotómetro ultravioleta visible de doble haz modelo Lambda 25 L-600-00BB, marca Perkin Elmer, en el rango de 200 nm a 700 nm.

8.2.4.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de los extractos de cáscara de piña ECPI y ECPU, productos de reacción (AgNps) y nanocompuestos EVA/AgNPs se obtuvieron en un espectrofotómetro DYNASCAN modelo Spectrum 100, Perkin Elmer utilizando un interferómetro de reflectancia total atenuada (ATR) en un rango de 4000 a 600 cm^{-1} .

8.2.4.4 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción se obtuvieron en un difractómetro de rayos X marca Bruker Axs, modelo D8 Advance con un generador de radiación de Cu K α , con filtro de Ni. Para los extractos y productos de reacción (AgNps) se utilizaron rejillas de 1mm a 40 kV y 30 mA desde 10 a 90° en 2 θ con un tamaño de paso de 0.1. Para los nanocompuestos EVA/AgNPs se utilizaron rejillas de 1 mm desde 5 a 80° en 2 θ con un tamaño de paso de 0.1 y rotación de 30 rpm.

8.2.4.5 Análisis fitoquímico de los extractos de cáscara de piña

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos de cascara de piña ECPI y ECPU consistió en pruebas cualitativas con métodos estándar reportados por Yadav y col. ⁶⁴ y Vinodhini y col. ⁶⁵.

Tabla 6. Pruebas fitoquímicas cualitativas

Fitoconstituyentes	Prueba	Resultado a observar
Taninos	2ml extracto + 2ml H ₂ O + 2 o 3 gotas FeCl ₃ (5%)	Precipitado verde
Compuestos polifenólicos	1ml extracto + 1ml Pb(OAc) ₄ (10%)	Precipitado blanco
Cumarinas	2ml extracto + 3ml NaOH (10%)	Coloración amarilla
Flavonoides	2ml extracto + 3ml NaOH (10%)+ HCl diluido	Coloración amarilla y posteriormente incolora

H₂O: agua destilada ; FeCl₃: cloruro férrico ; Pb(OAc)₄: acetato de plomo;
NaOH: hidróxido de sodio; HCl: ácido clorhídrico

8.2.4.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 operado a un voltaje de aceleración de 80 kV. Las muestras fueron previamente preparadas para su observación: primero fueron diluidas con acetona y sonicadas durante 20 minutos, fueron depositadas en rejillas portamuestras, fueron secadas a temperatura ambiente y observadas por el TEM.

8.2.4.7 Determinación de la citotoxicidad mediante el ensayo de MTT

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó la prueba de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y células mononucleares. Se sembraron 2×10^4 de células MCF-7 y 2×10^5 de células mononucleares contenidas en 100 μ L en cada pozo y se incubaron a 37 °C, a 5% de CO₂ por 24 h. Pasado este tiempo, se adicionaron 0.05 mg/mL de los productos en estudio, partiendo de un stock de 10 mg/mL preparados en PBS. Se realizaron diluciones seriadas de los compuestos 1:2. Se incubó por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Después, se adicionó 10 μ L de la solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL preparado en PBS para células MCF-7 y 10 μ L de MTT para células mononucleares. Las células MCF-7 se incubaron por 4 h, mientras que las células mononucleares se incubaron por 6 h, ambas a 37 °C y 5% de CO₂, se retiró el medio y se añadió 100 μ L de DMSO, y se incubó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron los cristales de formazan y se midió la absorbancia a 595 nm.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las 3 distintas etapas y respectivas caracterizaciones fueron realizadas de acuerdo con el desarrollo experimental planteado en el subtema 8.2 (Figura 10).

9.1 Obtención y caracterización de extractos acuosos de cáscara de piña por dos métodos: infusión y ultrasonido

La primera etapa consistió en la obtención de los extractos por infusión (ECPI) y por ultrasonido (ECPU).

9.1.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

De acuerdo al termograma de ECPI (Figura 12a) la primer etapa de degradación ocurrió en 90 °C con una pérdida de masa del 2 %, la segunda etapa de degradación representó una pérdida del 25 % de masa a una temperatura de 188 °C y la tercer etapa fue en 300 °C, con una pérdida de masa del 37 %, dejando un 36 % de masa residual.

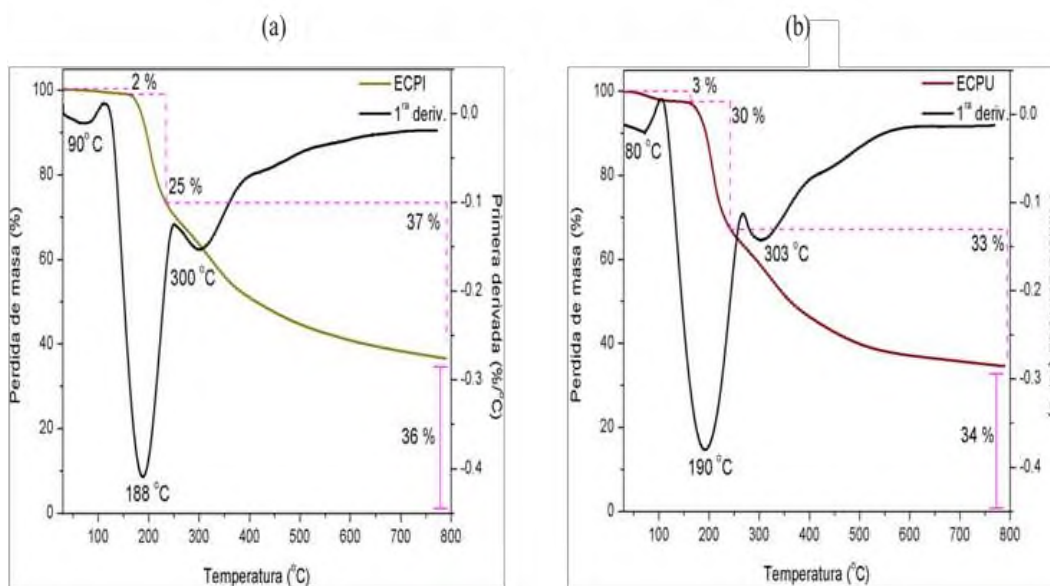


Figura 12. Termogramas de pérdida de peso de (a) ECPI y (b) ECPU.

El termograma de ECPU (Figura 12b) mostró la primer etapa de degradación a 80 °C con un 3 % de pérdida de masa. Una segunda etapa ocurrió en 190 °C con un 30 % de pérdida de masa y la tercera etapa fue a 303 °C y representó una pérdida de masa del 33 % dejando una masa residual del 34 %.

Comparando estos resultados con los termogramas de algunos biopolímeros presentes en la cáscara de piña como celulosa, la cual tiene un rango de degradación entre 315 y 400 °C, hemicelulosa alrededor de 220 y 315 °C, lignina con temperaturas que van de los 200 a 720 °C, y de metabolitos, como ácido gálico que presenta temperaturas de degradación en 266 °C, miricetina entre 340 y 370 °C y ácido ferúlico a 173 °C^{55,66-71} no es posible asignar de forma directa la descomposición de los extractos a familias o compuestos específicos, debido al amplio rango de temperaturas en los que recaen sus valores. No obstante, se determinaron los porcentajes de pérdida de masa y la estabilidad térmica de los extractos y por consiguiente se pueden considerar las condiciones en las que estos componentes no se vean afectados por efecto de la temperatura durante la síntesis de AgNps.

9.1.2 Espectroscopía UV-Vis

Los extractos de cáscara de piña contienen fitoquímicos importantes como antocianinas, taninos, catequinas, terpenoides, carotenoides y principalmente flavonoides; estos compuestos han sido relacionados con la formación de AgNps y presentan sistemas conjugados en su estructura por lo que es posible observarlos a través de UV-Vis. Los resultados obtenidos para los extractos ECPI y ECPU (Figura 13) muestran una única banda de absorción para ambos casos localizada entre 260 nm y 360 nm con una λ_{\max} alrededor de 284 nm, lo cual puede ser debido a la interacción entre estos tipos de metabolitos.

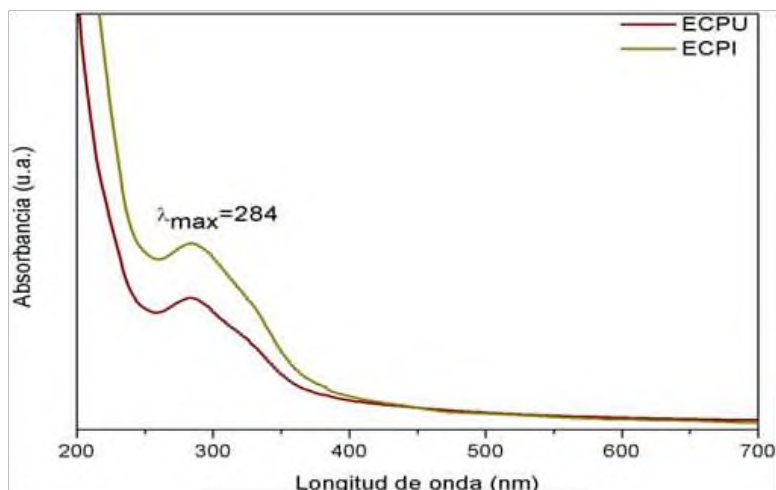


Figura 13. Espectros UV-Vis de los extractos ECPI y ECPU.

9.1.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los extractos ECPI y ECPU fueron caracterizados con FTIR para conocer los grupos funcionales presentes y posiblemente predecir su papel en la síntesis de AgNps. Estos extractos contienen biomoléculas como polifenoles, carbohidratos, flavonoides y otros, los cuales poseen grupos funcionales activos como hidroxilos, amino, aldehídos, ácidos carboxílicos, carbonilos. Se cree que varios de ellos cumplen un rol importante en la formación de AgNps⁷².

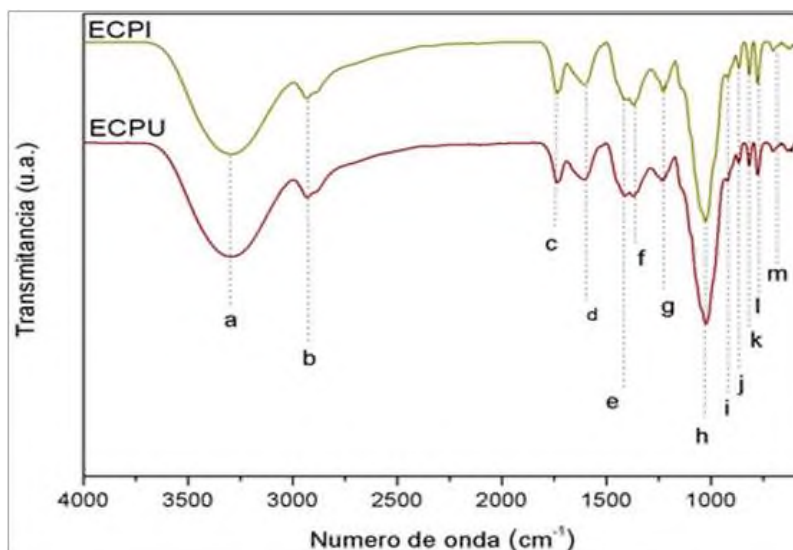


Figura 14. Espectros FTIR de los extractos ECPI y ECPU.

Los espectros FTIR de ambos extractos (Figura 14) mostraron distintas bandas de absorción (Tabla 7), de las cuales se destacan: la banda (a) alrededor de 3300 cm^{-1} , la cual pertenece a los movimientos vibracionales de estiramiento correspondientes al grupo funcional hidroxilo. Estos grupos son debido a la presencia de compuestos polifenólicos⁹ como ácido gálico⁷³, taninos⁷⁴, flavonoides⁷⁵, polisacáridos y terpenos⁷⁶. La señal (b) alrededor de 2930 cm^{-1} es atribuida al estiramiento del enlace C-H de tipo alquilo⁷⁷ o estiramiento aromático de taninos⁷⁴. La banda (c) localizada en 1732 cm^{-1} corresponde a los movimientos de estiramiento del grupo carbonilo en taninos⁷⁴, lignina o hemicelulosa⁷⁸. La banda (d) en 1604 cm^{-1} fue asignada a los movimientos de vibración del enlace C=C de anillos aromáticos⁷⁹ presente en flavononas y terpenoides⁸⁰, y taninos⁷⁴. La señal (e) en 1410 cm^{-1} se atribuye a la vibración del enlace C=C en anillos aromáticos del ácido gálico⁷³. La banda (f) en 1216 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace C-O en alcoholes terciarios. La banda (g) en 1026 cm^{-1} se relaciona con la vibración del enlace C-O en taninos⁷⁴, compuestos aromáticos y flavonoides⁸¹. Desde la banda (h) hasta la banda (m) se encuentran señales relacionadas con la vibración del enlace C-H fuera del plano en anillos aromáticos del ácido gálico⁷³ o catequina⁸².

Tabla 7. Bandas de absorción asignadas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en ECPI y ECPU

Banda	Numero de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3300	O-H	Estiramiento
b	2930	C-H	Estiramiento en alquilo
c	1732	C=O	Estiramiento
d-e	1604-1410	C=C	Estiramiento en anillos aromáticos
f	1216	C-O	Tensión del enlace C-O en alcoholes
g	1026	C-O	Vibración del enlace C-O en taninos, compuestos aromáticos y flavonoides
h-i-j-k-l-m	1023-920-867-817-777-704	C-H	Vibración del enlace C-H fuera del plano en anillos aromáticos

9.1.4 Difracción de rayos X (DRX)

Este análisis se realizó para conocer el tipo de estructuras presentes en los extractos (Figura 15). Se observaron señales en una posición 2θ de 19.35 y 18.70 respectivamente. La aparición de estos picos probablemente sea debido a que en los extractos haya algunos metabolitos de carácter semicristalino. No obstante, la amplitud de las señales es indicativo de estructuras mayormente amorfas.

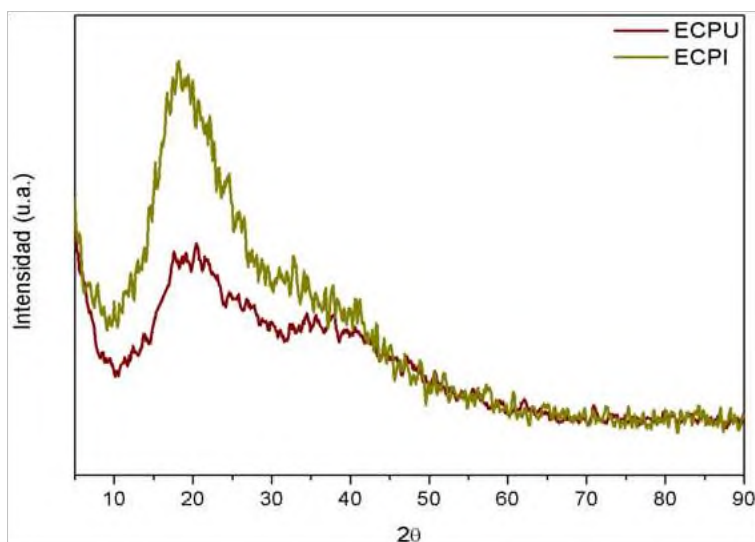


Figura 15. Difractograma de los extractos ECPI y ECPU.

9.1.5 Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico de los extractos de cáscara de piña se llevó a cabo de acuerdo con la metodología planteada en el punto 8.2.4.5. Los resultados observados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del análisis fitoquímico cualitativo

Fitoconstituyentes	Resultado a observar	ECPI	ECPU
Taninos	Precipitado verde	+	+
Compuestos polifenólicos	Precipitado blanco	+	+
Cumarinas	Coloración amarilla	-	-
Flavonoides	Coloración amarilla y después incolora	-	-

+Positivo - Negativo

Taninos

Esta prueba dio positivo para ambos extractos (Figura 16), se observó un cambio de color amarillo claro a color ocre, unos minutos después el precipitado se depositó en el fondo del tubo de ensayo.

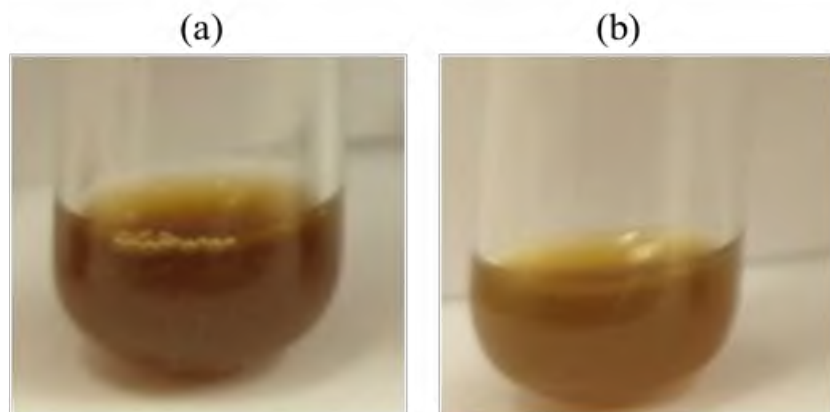


Figura 16. Identificación de taninos en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.

Compuestos polifenólicos

En este ensayo (Figura 17), ambas muestras presentaron la formación del precipitado color blanco al agregar acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$). Después de unos minutos, este precipitado se depositó en el fondo del tubo de ensayo.

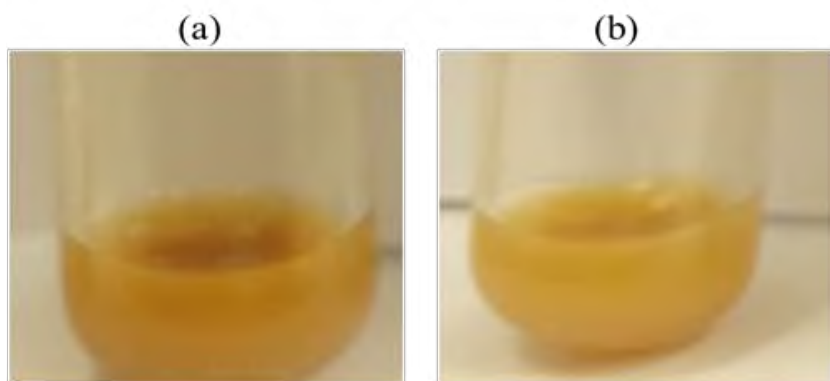


Figura 17. Identificación de compuestos polifenólicos en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.

Cumarinas

Esta prueba (Figura 18) consistió en adicionar NaOH para observar una tonalidad amarilla. Sin embargo, debido al color de los extractos no se percibió ningún cambio aparente.

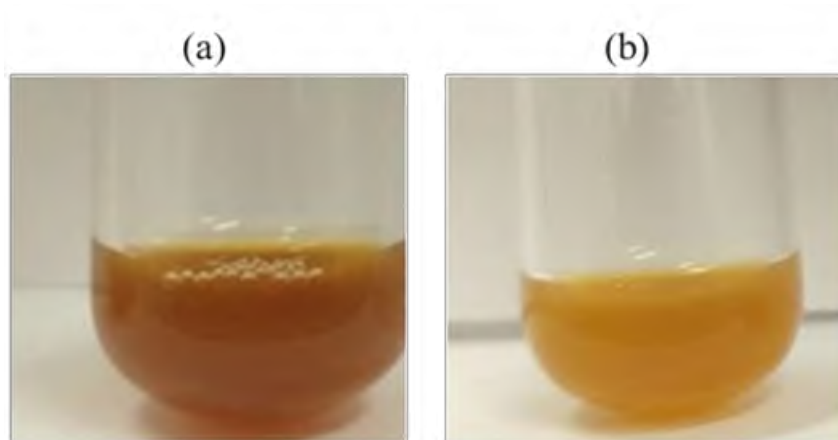


Figura 18. Identificación de cumarinas en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.

Flavonoides

Para esta prueba (Figura 19) el resultado esperado es una tonalidad amarilla y después la desaparición de este color. Nuevamente, debido al color de los extractos no se observó ningún cambio perceptible al ojo humano.

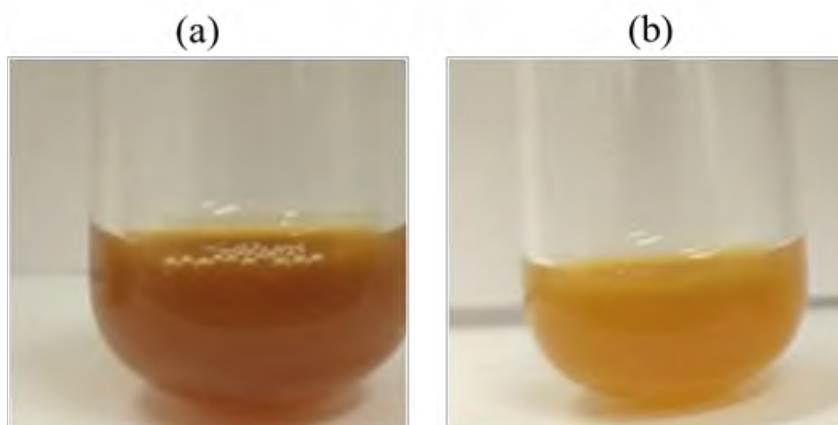


Figura 19. Identificación de flavonoides en extractos (a) ECPI y (b) ECPU.

9.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNps)

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de AgNps se realizó a reflujo teniendo como parámetro variable la temperatura, los productos de estas síntesis fueron caracterizadas de la siguiente manera.

9.2.1 Monitoreo de síntesis de AgNps

Una de las características que poseen las AgNps es un fenómeno conocido como resonancia de plasmón. La resonancia de plasmón sucede cuando la luz visible interacciona con las AgNps ocasionando la oscilación colectiva de los electrones superficiales dando como resultado un comportamiento colorimétrico perceptible al ojo humano y es dependiente del tamaño y morfología. Este comportamiento ha sido empleado por distintos grupos de investigación para conocer el progreso de la síntesis y con ello la formación de nanopartículas de plata^{83,84}.

Sistemas con temperatura ambiente: RI_{amb} y RU_{amb}

Para RI_{amb} (Figura 20) se observó el primer cambio de color a los 20 min de iniciada la reacción, a los 50 min apareció un color café el cual fue incrementando de tonalidad hasta llegar a un café-rojizo al finalizar la reacción.

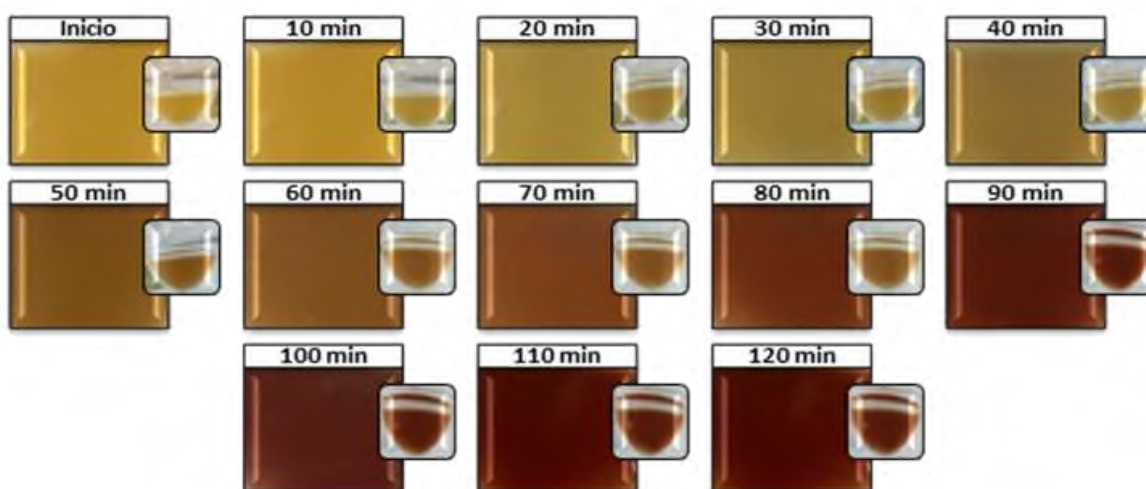


Figura 20. Formación de AgNps en el sistema RI_{amb} .

Para RU_{amb} (Figura 21) el primer cambio de color sucedió a los 40 min de reacción, la aparición de un color café se suscitó a los 70 min y aumentó de tonalidad a un café-rojizo hasta el fin de la reacción.

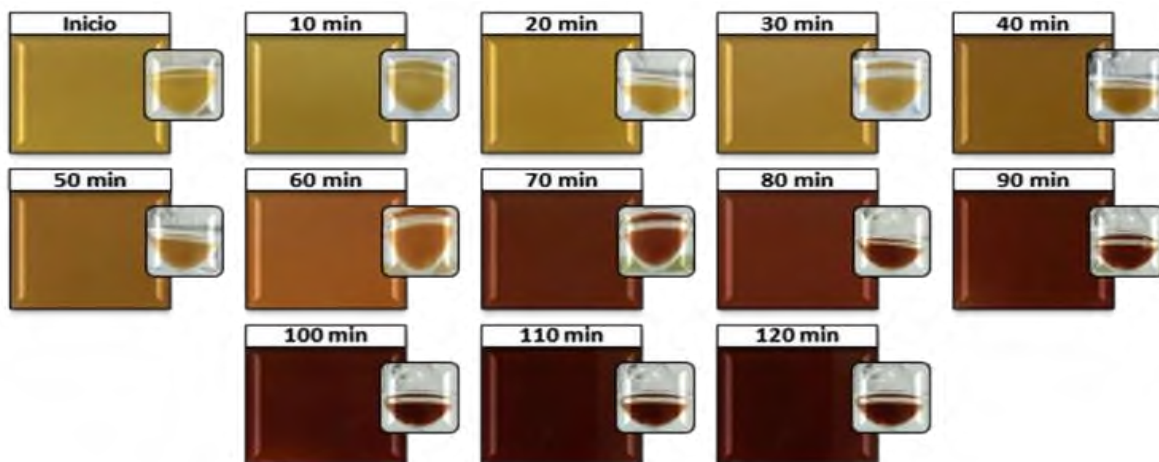


Figura 21. Formación de AgNps en el sistema RU_{amb} .

Sistemas con temperatura 60 °C: RI_{60} y RU_{60}

Estas reacciones se realizaron de la siguiente forma, RI_{60} con extracto ECPI y RU_{60} con extracto ECPU, ambas comenzaron cuando la mezcla alcanzó los 60°C. Para RI_{60} (Figura 22) se presentó un cambio de color a los 10 min de reacción, el segundo cambio se presentó a los 20 min con un color café-rojizo, hasta los 60 min se observó un color café oscuro el cual se mantuvo constante hasta finalizada la reacción.

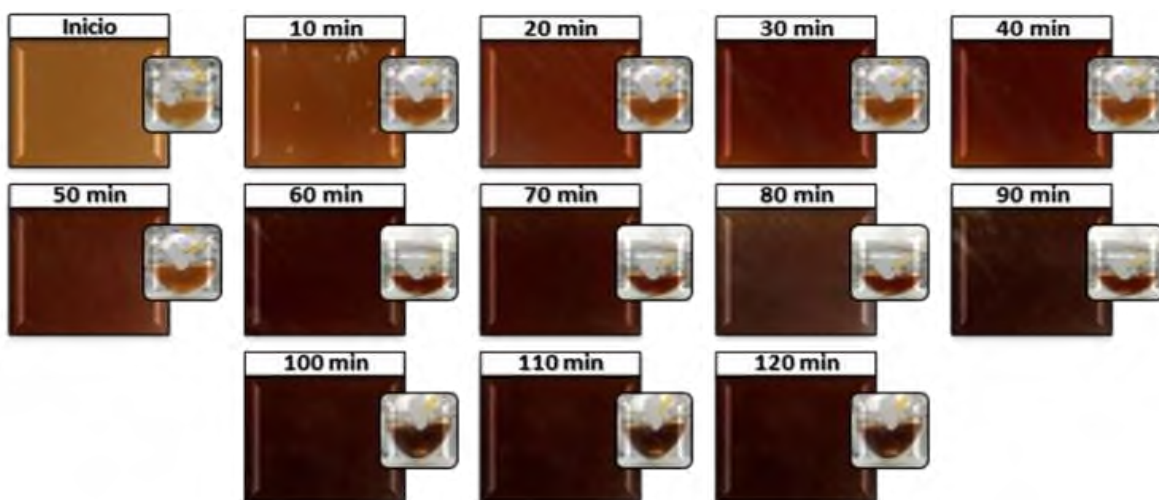


Figura 22. Formación de AgNps en el sistema RI_{60} .

Para RU₆₀ (Figura 23) el primer cambio de color se presentó a los 10 min de haber iniciado, a los 50 min se presentó un tono café-rojizo que se tornó café oscuro a los 70 min, este color permaneció constante hasta finalizada la reacción.

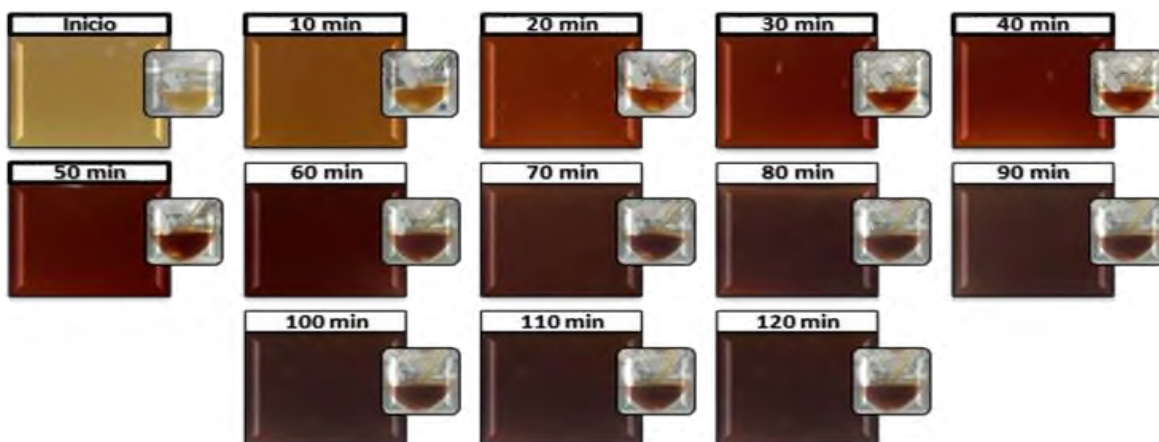


Figura 23. Formación de AgNps en el sistema RU60.

Sistemas con temperatura 80 °C: RI₈₀ y RU₈₀

Estas reacciones se realizaron de la siguiente forma, RI₈₀ con extracto ECPI y RU₈₀ con extracto ECPU, ambas comenzaron cuando la mezcla alcanzó los 80°C. Para RI₈₀ (Figura 24) el primer cambio ocurrió a los 10 min con la aparición de un color café-rojizo, a los 50 min se apreció un cambio a color café oscuro el cual permaneció hasta el fin de la reacción.

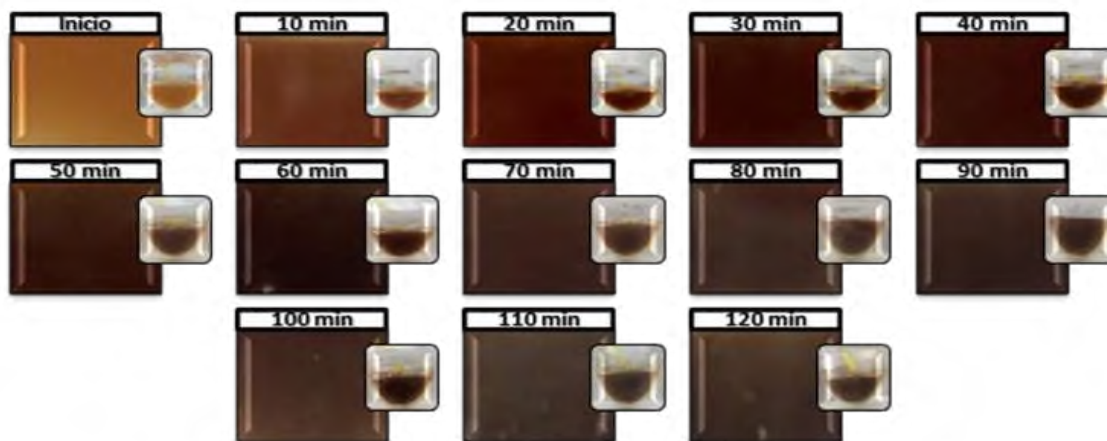


Figura 24. Formación de AgNps en el sistema RI80.

Para RU₈₀ (Figura 25) no hay cambios notables de color, solo se puede apreciar un color café hasta los 30 min y a partir de allí la coloración es café oscuro.

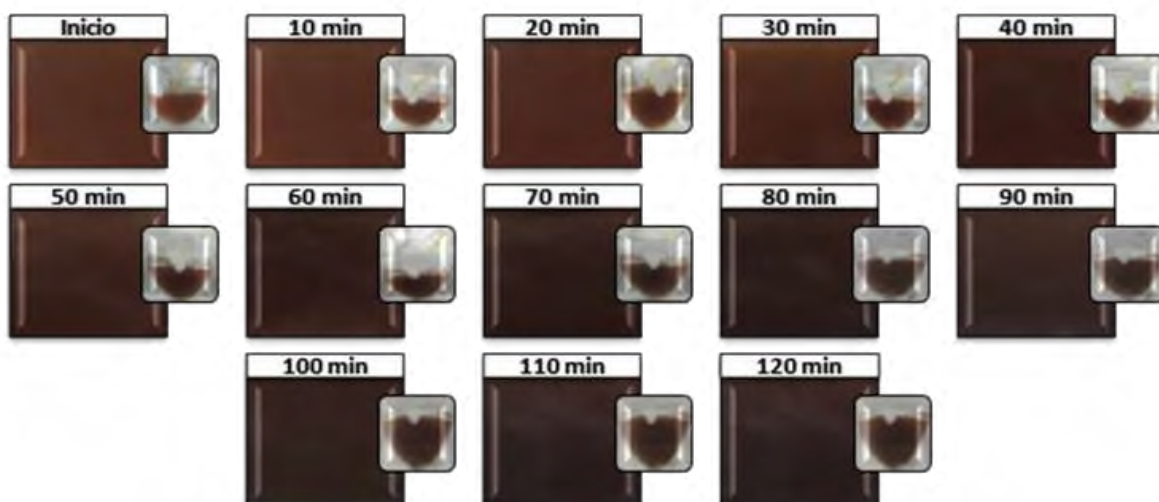


Figura 25. Formación de AgNps en el sistema RU80.

Sistemas con temperatura 100 °C: RI₁₀₀ y RU₁₀₀

Estas reacciones se realizaron de la siguiente forma, RI₁₀₀ con extracto ECPI y RU₁₀₀ con extracto ECPU, ambas comenzaron cuando la mezcla alcanzó los 100°C. Para RI₁₀₀ (Figura 26) el primer cambio de café-rojizo a café oscuro sucedió a los 10 min, posteriormente aumentó de tonalidad hasta el fin de la reacción.

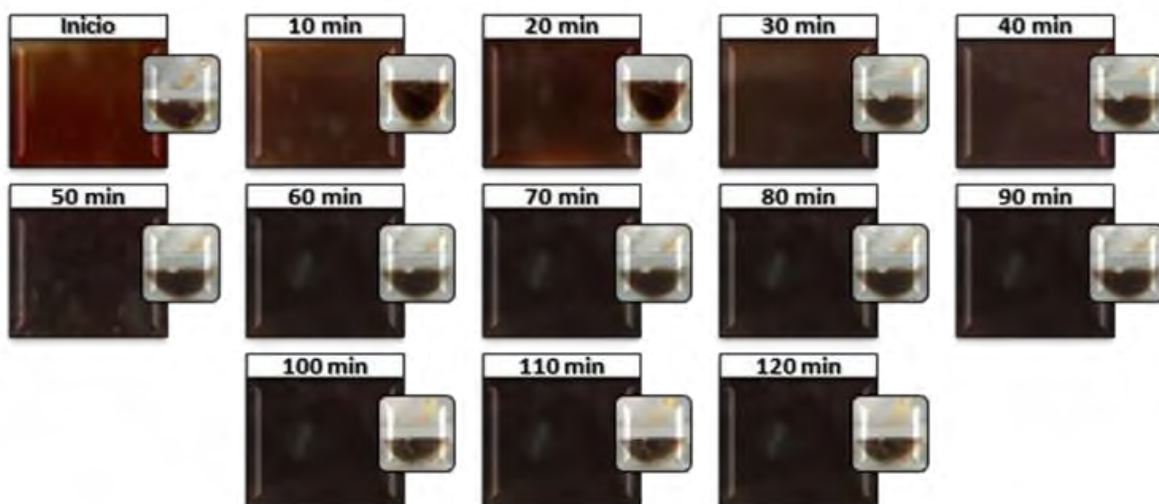


Figura 26. Formación de AgNps en el sistema RI100.

Para RU₁₀₀ (Figura 27) solo se apreció un cambio de color a los 10 min de café a café oscuro, este color se mantuvo constante durante toda la reacción.

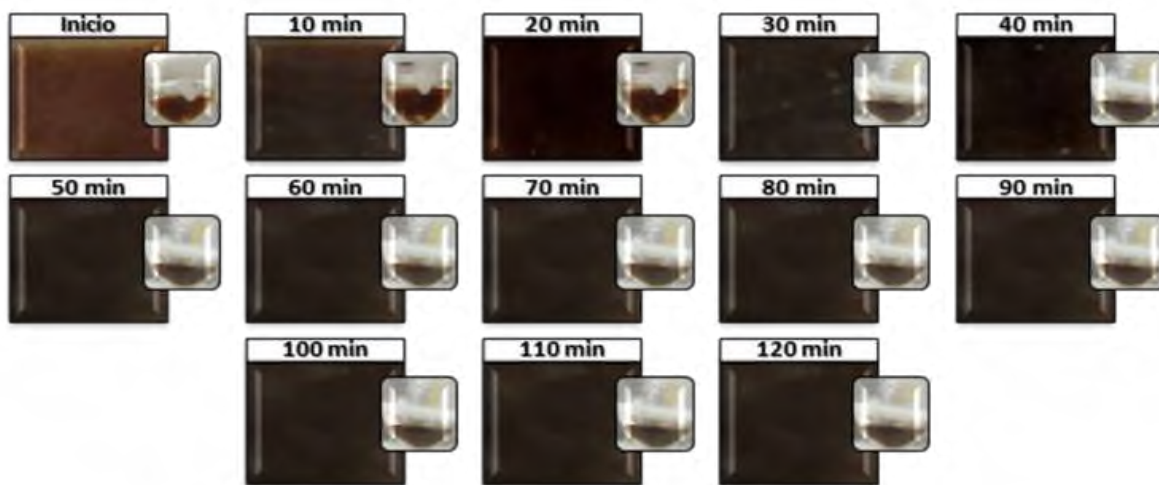


Figura 27. Formación de AgNps en el sistema RU100.

Con base en los resultados anteriores se observó que las síntesis con ECPI y ECPU a distintas temperaturas presentaron una tonalidad café-rojiza característica de nanopartículas de Ag sintetizadas con extractos vegetales, resultados similares a lo reportado por Mehmood y col.⁸⁵ y Patra y col.⁴⁰. La aparición de este color se debe a la excitación de los electrones confinados en la nanopartícula y por consiguiente los cambios en los niveles de energía electrónica⁸⁶. De acuerdo a la observación de las distintas tonalidades presentadas en el proceso de síntesis, el color café-rojizo relacionado a la formación de AgNps se obtuvo en un lapso de entre 10 y 20 min cuando se incrementó la temperatura a 60, 80 y 100°C en contraste con temperatura ambiente que necesito 2 h para producir el mismo resultado.

9.2.2 Espectroscopía UV-Vis

La resonancia de plasmón es un fenómeno óptico que no solo es perceptible al ojo humano mediante cambios colorimétricos, sino que también se manifiesta con bandas de absorción en el espectro visible. Para realizar este análisis se utilizaron los extractos ECPI y ECPU, AgNO₃ y las nanopartículas de plata obtenidas suspendidos en agua destilada.

Los espectros UV-Vis de las nanopartículas de Ag sintetizadas con ECPI (Figura 28a) mostraron bandas de absorción en un rango de 458 a 566 nm, y con ECPU (Figura 28b) bandas de absorción de 460 a 543 nm. Estas absorciones corresponden a la resonancia de plasmón (LSPR) de AgNps⁸⁷⁻⁸⁹. No obstante, la amplitud de estas bandas indica que las nanopartículas se encuentran polidispersas en el medio acuoso. Además, se observaron absorciones que van desde 258 a 284 nm, las cuales se relacionan a la formación de clusters oligoméricos de Ag que pueden estar disponibles para la generación de nanopartículas de mayor tamaño⁹⁰⁻⁹². Contrariamente, la sal precursora AgNO₃ no presentó ninguna absorción.

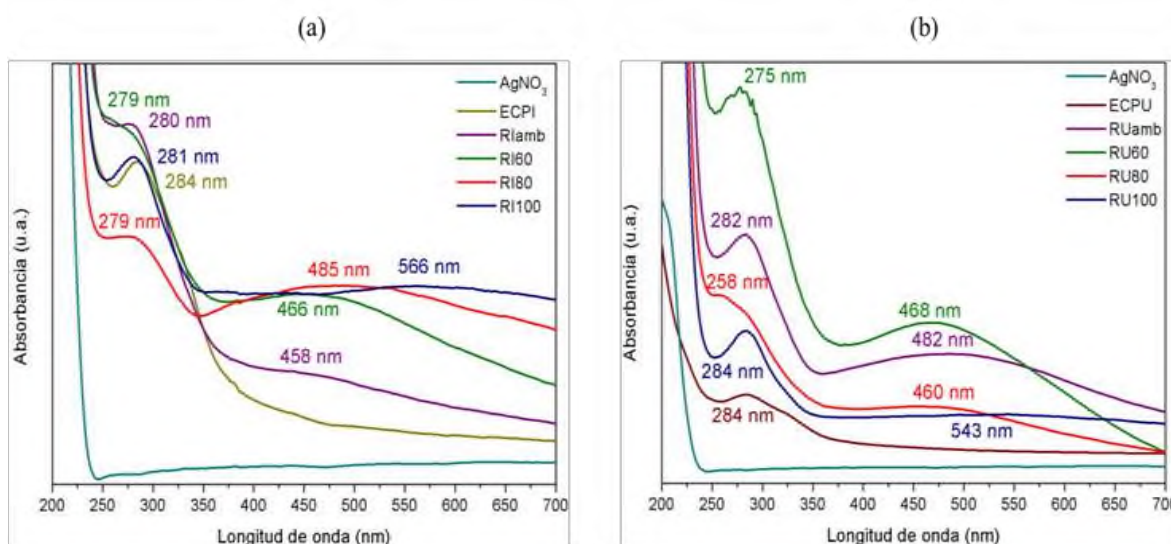


Figura 28. Espectros UV-Vis de AgNps con (a) ECPI y (b) ECPU.

9.2.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Con la finalidad de conocer los grupos funcionales involucrados en la síntesis de AgNps se realizó el análisis por FTIR. Para realizarlo se utilizaron los extractos y las AgNps previamente secados a 110 °C por 24 h y pulverizados. El AgNO₃ también se pulverizó para realizar el análisis.

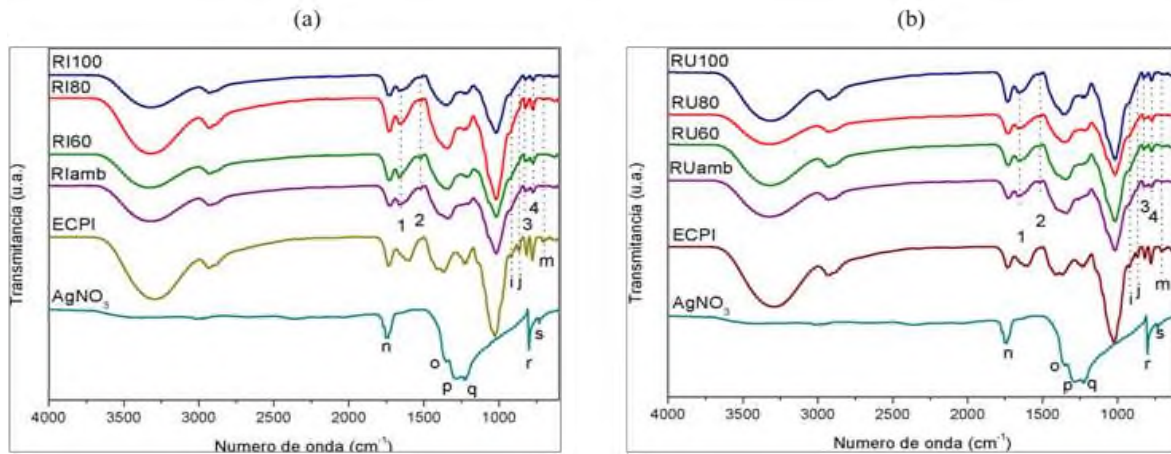


Figura 29. Espectros FTIR de AgNps con (a) ECPI y (b) ECU.

Las señales correspondientes a los espectros FTIR de los extractos (ECPI y ECU) fueron descritas anteriormente en la Tabla 7. En el espectro de AgNO_3 (Figura 29) se observa la señal denotada como (n) en aproximadamente 1744 cm^{-1} , la cual es debida a la combinación de las bandas de tensión simétrica y deformación en el plano del enlace NO ; las señales (o), (p) y q en 1350 , 1283 y 1230 cm^{-1} respectivamente son atribuidas a la tensión asimétrica del enlace NO , la señal (r) en 800 cm^{-1} corresponde a la deformación del enlace NO y la señal (s) en 731 cm^{-1} es debida a la oscilación en el plano (Tabla 9)⁹³.

Tabla 9. Bandas de absorción asignadas al espectro de AgNO_3 .

Banda	Numero de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Tipo de movimiento
n	1744	NO_3	Tensión simétrica y deformación en el plano
o-p-q	1350-1283-1230	NO_3	Tensión asimétrica
r	800	NO_3	Deformación fuera y deformación en el plano
s	731	NO_3	Oscilación en el plano

Los espectros FTIR de las nanopartículas de Ag (Figura 29a y 29b) mostraron 7 diferencias con respecto a los espectros de los extractos. Además, no hay ninguna señal presente del AgNO_3 . Las diferencias son: la formación de nuevas señales (señales 1, 2, 3 y 4) y la desaparición de tres señales en los espectros (señales i, j y m). La señal 1 está aproximadamente en 1660 cm^{-1} , la señal 2 en 1520 cm^{-1} , la señal 3 en 825 cm^{-1} y la señal 4 en 770 cm^{-1} (Figura 30). De acuerdo a la literatura, estas señales son atribuidas a la formación de nanopartículas de Ag ⁹⁴.

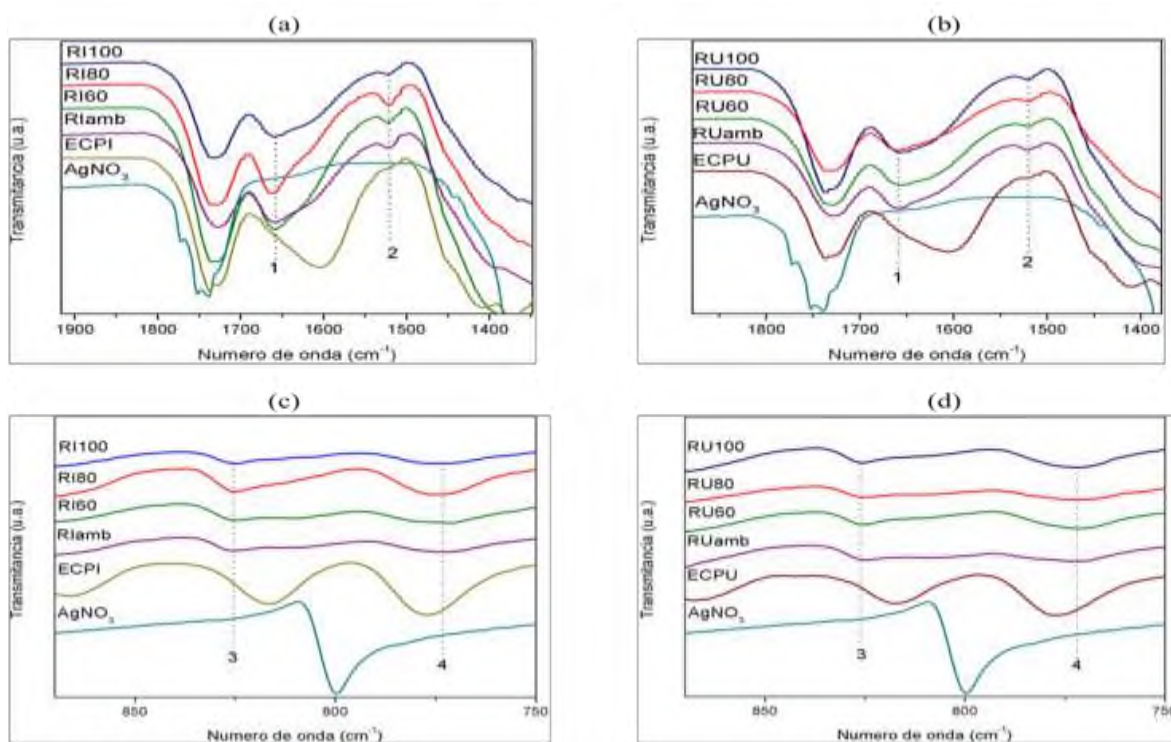


Figura 30. Magnificación de los espectros FTIR mostrando las señales indicadas como 1, 2, 3 y 4 de los productos de reacción con (a y c) ECPI y (b y d) ECPU.

Las señales (i), (j) y (m) presentes en los extractos desaparece en todos los espectros FTIR de las AgNps (Figura 31), estas señales están relacionadas con la vibración del enlace C-H fuera del plano en anillos aromáticos, por lo tanto la desaparición de estas señales nos sugiere que sus estructuras se vieron modificadas debido a su intervención en la formación y/o estabilización de las nanopartículas de Ag .

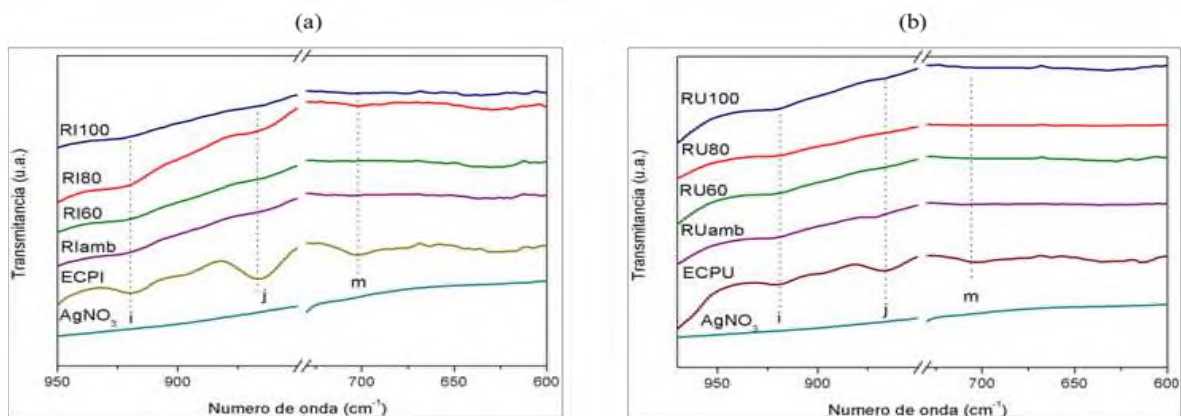


Figura 31. Magnificación de los espectros FTIR de los productos de reacción indicando la desaparición de las señales i, j y m provenientes de los extractos (a) ECPI y (b) ECPU.

9.2.4 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción para las reacciones con ECPI y ECPU a distintas temperaturas (Figura 32), mostraron un primer pico de refracción en una posición aproximada 2θ de 19. Esta señal es similar a la mostrada en los extractos. Sin embargo, la señal disminuye en intensidad debido a la presencia de AgNps. Los picos observados en los productos de reacción no pertenecen al patrón de difracción de la sal AgNO_3 . Esto se demuestra comparando los patrones de difracción de las reacciones con la carta ICDD 000491239 perteneciente a la sal precursora. Este comportamiento concuerda con los espectros FTIR mostrados anteriormente (Figura 29). Por lo tanto, se considera que todo el AgNO_3 fue reducido a Ag para la formación de nanopartículas.

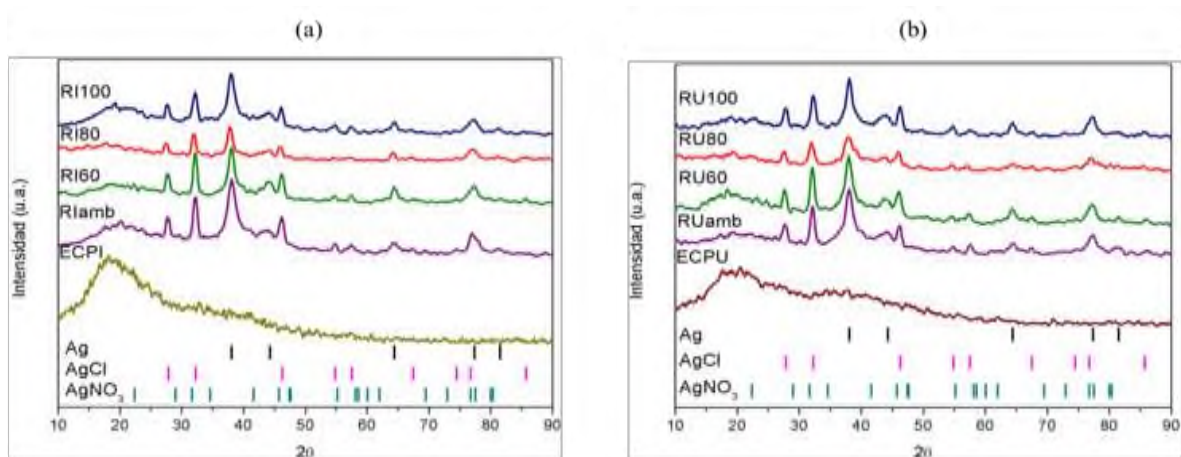


Figura 32. Difractogramas de las AgNps con (a) ECPI y (b) ECPU.

La aparición de 5 nuevas señales en los patrones de difracción de las reacciones con ECPI (Figura 32a) y con ECPU (Figura 32b) en un rango de 38 a 81 en posición 2θ indica la presencia de AgNps (Tabla 10). No obstante, se observan señales que no corresponden a los picos de Ag metálica sino a otro sistema.

Tabla 10. Comparación de ángulos de difracción experimental con estándar Ag COD 9008459.

Estándar Ag COD 9008459		Reacciones con ECPI				Reacciones con ECPU			
hkl	Ángulo de difracción estándar	Ángulo de difracción experimental							
		RI _{amb}	RI ₆₀	RI ₈₀	RI ₁₀₀	RU _{amb}	RU ₆₀	RU ₈₀	RU ₁₀₀
(111)	38.11	38.08	38.09	37.81	38.09	38.30	38.18	37.96	38.08
(200)	44.30	43.35	44.08	43.66	44.02	43.87	43.98	43.46	43.66
(202)	64.44	64.42	64.37	64.23	64.55	64.70	64.57	-	64.40
(311)	77.40	-	77.31	77.03	77.23	77.59	77.42	77.25	77.37
(222)	81.54	81.34	81.40	81.08	81.23	81.31	81.71	-	-

Los picos observados en un rango de 27 a 85 en posición 2θ para las reacciones con ECPI (Figura 32a) y ECPU (Figura 32b), que no corresponden a Ag fueron analizados mediante una comparación de fases con difractogramas estándar de compuestos con base Ag con el software Match!®, de esta manera se encontró que estas señales corresponden a AgCl (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de ángulos de difracción experimental con estándar AgCl COD 9011666.

Estándar AgCl COD 9011666		Reacciones con ECPI				Reacciones con ECPU			
hkl	Ángulo de difracción estándar	Ángulo de difracción experimental							
		RI _{amb}	RI ₆₀	RI ₈₀	RI ₁₀₀	RU _{amb}	RU ₆₀	RU ₈₀	RU ₁₀₀
(111)	27.84	27.76	27.73	27.43	27.78	27.97	27.84	27.60	27.82
(200)	32.25	32.20	32.18	31.93	32.27	32.35	32.28	31.94	32.25
(202)	46.26	46.19	46.18	45.88	46.20	46.39	46.24	46.06	46.24
(311)	54.86	54.81	54.71	54.49	54.84	54.97	54.70	54.55	54.81
(222)	57.52	57.43	57.37	57.13	57.21	57.81	57.53	57.14	57.52
(400)	67.49	-	-	67.29	-	67.63	67.61	-	-
(313)	74.51	-	-	-	-	-	-	-	-
(402)	76.80	76.96	-	77.03	-	-	-	-	-
(422)	85.75	-	85.65	85.73	-	85.75	86.03	-	85.57

Debido a que durante el proceso de síntesis se formaron dos tipos de nanopartículas, se hizo el cálculo mediante el software Match!® para conocer los porcentajes de cada una de estas especies.

Para el sistema RIamb se obtuvo un 54.3% de AgNps y 45.7% de AgClNps. En el sistema RI60 se obtuvieron 53.7% de AgClNps y 46.3% de AgNps. El sistema RI80 está constituido de un 59.6% de AgClNps y 43.1% de AgNps. En el sistema RI100 el 52.1% corresponde a AgNps y el 47.9% a AgClNps.

En el sistema RUamb el 50.4% corresponde a AgNps y el 49.6% a AgClNps. El sistema RU60 está formado por AgClNps en un 51.8% y AgNps en un 48.2%. Para el sistema RU80 hay un 54.6% de AgClNps y un 45.4% de AgNps. En el sistema RU100 se obtuvieron 56.4% de AgClNps y 43.6% de AgNps.

9.2.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

A partir de esta sección se analizó solo las AgNps sintetizadas con ECPI, ya que a pesar de que las síntesis con ambos extractos mostraron buenos resultados, la extracción por infusión presenta ventajas en la operatividad en contraste con la extracción con ultrasonido.

Se observó que los termogramas de las AgNps-AgClNps a diferentes temperaturas de reacción (Figura 33) son similares. La primera etapa de degradación ocurrió alrededor de 60 °C con una pérdida de masa del 3 %, esto se atribuye a la pérdida de agua presente en los sistemas. Una segunda pérdida de masa del 28 % para los sistemas RIamb y RI100 y del 36 % para los sistemas RI60 y RI80 se da en un rango de temperatura de 223 a 227 °C. La tercera etapa de degradación ocurre en un rango de temperatura de 277 a 300 °C con una pérdida de masa de 16 % a 21 %. Estos cambios son asociados a la degradación de los metabolitos presentes en el sistema después del secado. Finalmente, la masa residual fluctuó de 42 a 49 %, esto corresponde a las cenizas orgánicas del extracto ECPI y a la presencia de las AgNps-AgClNps obtenidas.

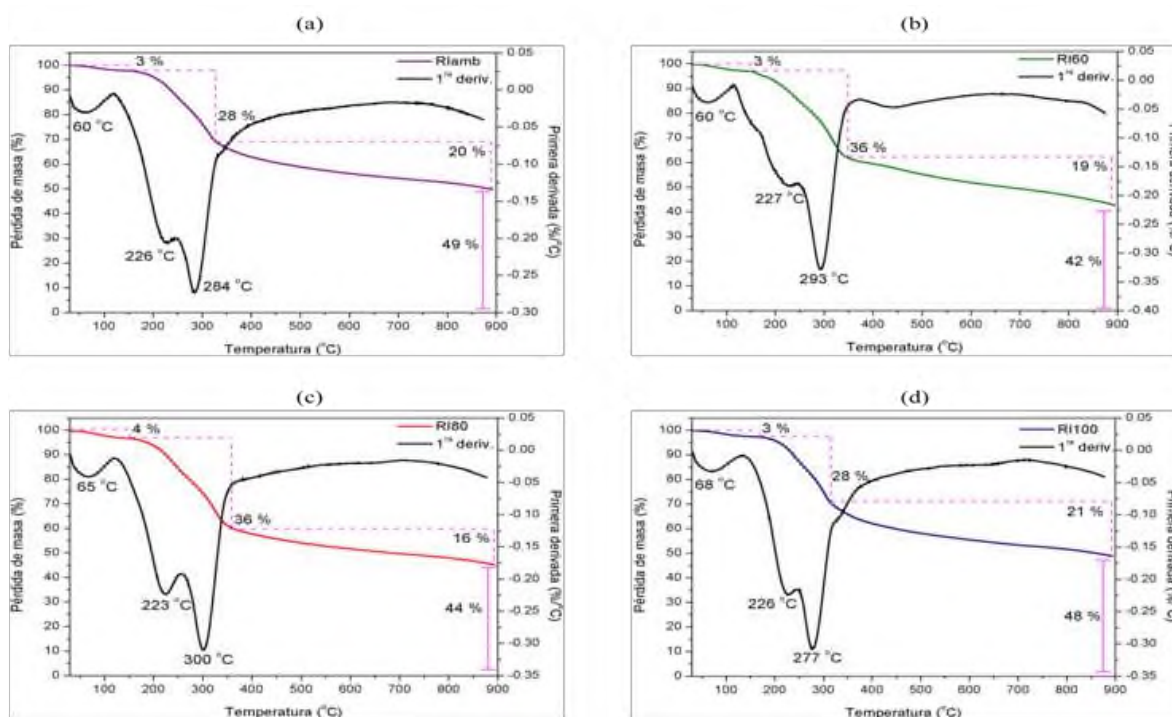


Figura 33. Termogramas de pérdida de masa de los sistemas AgNps-AgClNps (a) RIamb, (b) RI60, (c) RI80 y (d) RI100.

9.2.6 Microscopía electrónica de transmisión TEM

La micrografía del sistema RIamb (Figura 34a) se observan nanopartículas con una morfología predominante esférica con diámetro aproximado de 12.5 nm (Figura 34b). Estas nanopartículas están rodeadas por una fina capa de material orgánico (indicada con flechas rojas en la Figura 34a) lo cual es característico de las AgNps-AgClNps sintetizadas con extractos de plantas⁴¹. En la primera ampliación (Figura 34c) se puede apreciar la formación de un nanoplato triangular. En la segunda ampliación (Figura 34d) se observa que en la nanopartícula existe una zona oscura, se considera que en esta zona se encuentran átomos de plata apilados por efecto de la coalescencia.

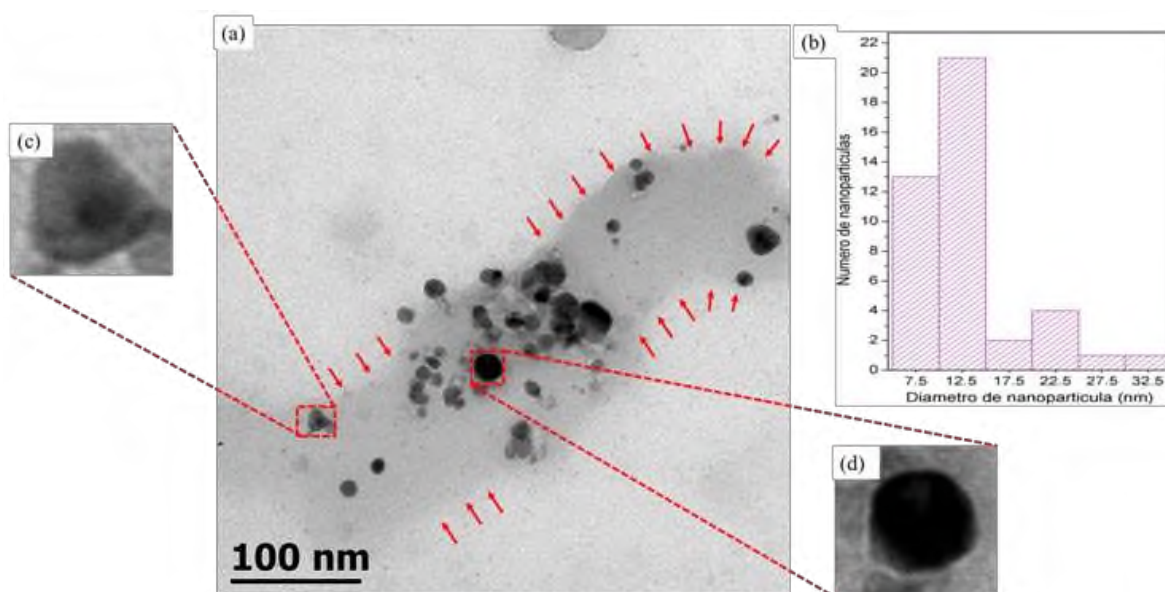


Figura 34. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RIamb, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de las nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.

En la micrografía del sistema RI60 (Figura 35a) se observan nanopartículas de tipo esférico con un tamaño aproximado de 17.5 nm de diámetro (Figura 35b). Nuevamente, se observa la capa de material orgánico en el fondo (indicada con flechas rojas en la Figura 36a), característica de este tipo de síntesis. En la primera ampliación (Figura 35c) se muestran nanoesferas que presentan zonas oscuras debido al apilamiento de los átomos de Ag. En la segunda ampliación (Figura 35d) se muestra la formación de una nanobarra de aproximadamente 25 nm de largo por 10 nm de ancho.

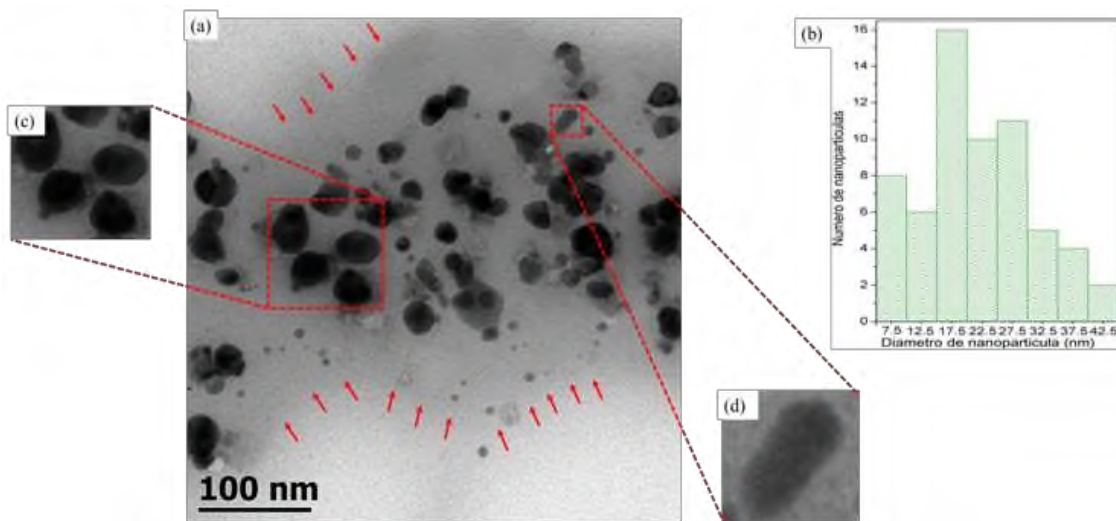


Figura 35. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RI60, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de las nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.

En la micrografía del sistema RI80 (Figura 36a) se observó nanoplatos triangulares y algunas nanoesferas con diámetro aproximado de 15 nm (Figura 36b). En la primera ampliación (Figura 36c) se observa que la nanopartícula presenta una macla múltiple en su estructura. En la segunda ampliación (Figura 36d) se observó un nanoplato triangular.

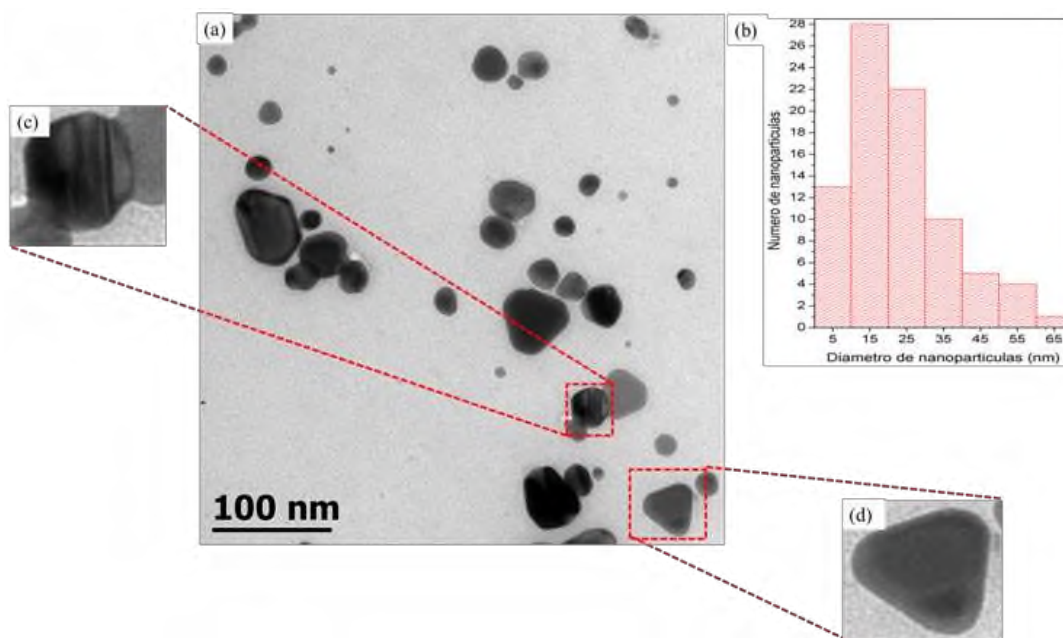


Figura 36. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RI80, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de las nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.

En la micrografía del sistema RI100 (Figura 37a) se observan nanopartículas de distintas morfologías, mayormente esféricas cuyo diámetro aproximado es de 25 nm (Figura 37b). En la primera ampliación (Figura 37c) se observa la formación de una nanobarra y en la segunda ampliación (Figura 37d) se aprecia la formación de un nanoplato triangular.

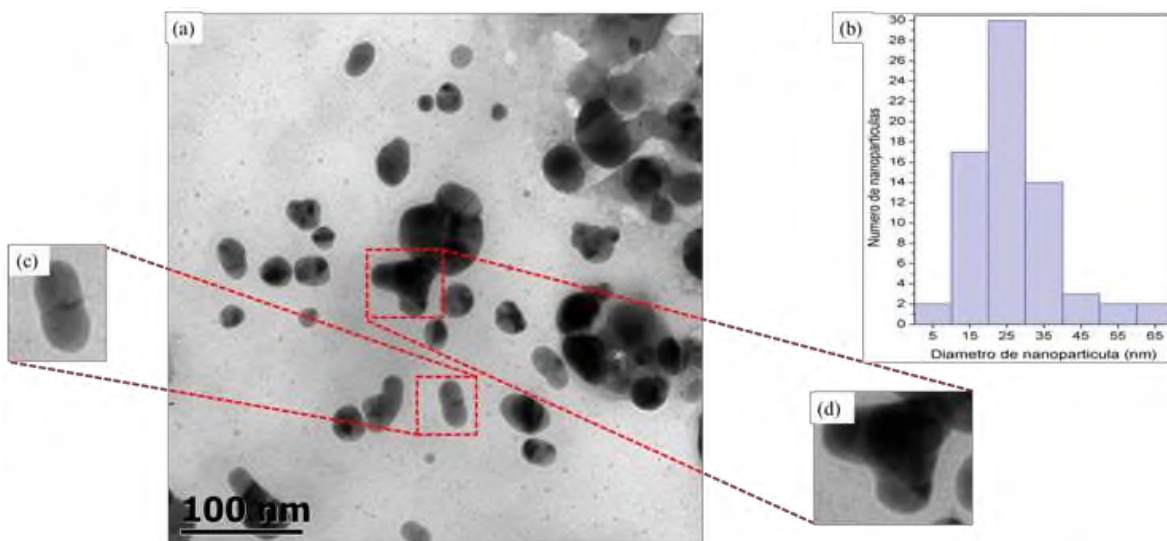


Figura 37. (a) Micrografía TEM de AgNps-AgClNps del sistema RI100, (b) histograma que muestra la distribución de diámetro de nanopartículas, (c) y (d) ampliaciones.

9.2.7 Ensayos de la citotoxicidad por el método MTT en la línea celular MCF-7 y células mononucleares

Para evaluar la actividad biológica de las AgNps-AgClNps se realizó la prueba MTT en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y en células mononucleares (monocitos).

Células MCF-7 de cáncer de mama

Los ensayos de concentración-respuesta (Figura 38) muestran que todos los sistemas de AgNps-AgClNps inducen la pérdida de la viabilidad en células MCF-7 (Figura 40). Se observó una pérdida significativa de viabilidad celular con una dosis de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los sistemas RI100 y RI60, esto podría ser ocasionado por la morfología esférica y tamaño de 12.5 a 17 nm de las nanoparticulas en el sistema (Figura 34 y 35). En el sistema RI80 se observó la pérdida de viabilidad celular a partir de una dosis de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se considera que la forma de nanoplato triangular y tamaño aproximado de 15 nm de las nanoparticulas en el sistema son causantes de esta pérdida (Figura 36). La pérdida de viabilidad celular en RI100 se observó a partir de una dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, este efecto podría ser debido a que las nanoparticulas del sistema son de mayor tamaño (25 nm aproximadamente) en comparación con los demás sistemas (Figura 37).

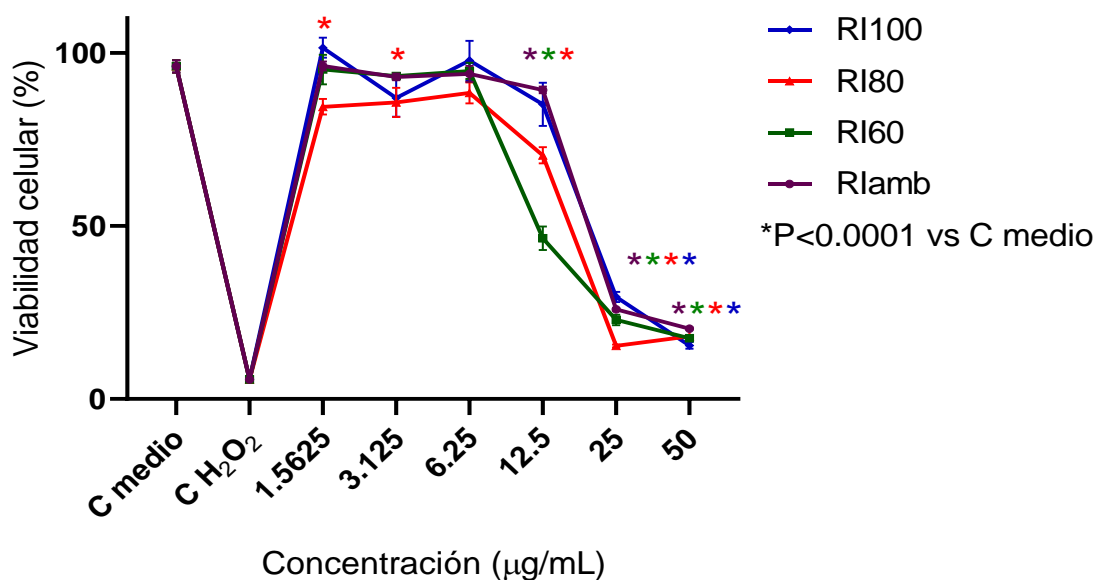


Figura 38. Gráfica de los resultados de citotoxicidad de AgNps-AgClNps de los sistemas RI100, RI60, RI80, RI100 sobre células MCF-7.

Debido a que los sistemas de nanopartículas contienen extracto de cascara de piña, se analizó el efecto de los extractos vs células MCF-7. En la gráfica (Figura 39) se muestra que los extractos ECPI a diferentes temperaturas no tienen efecto significativo en la disminución de viabilidad de las células MCF-7, por lo tanto, se entiende que el efecto de disminución en la viabilidad celular es debido a la presencia de las AgNps-AgClNps en el medio.

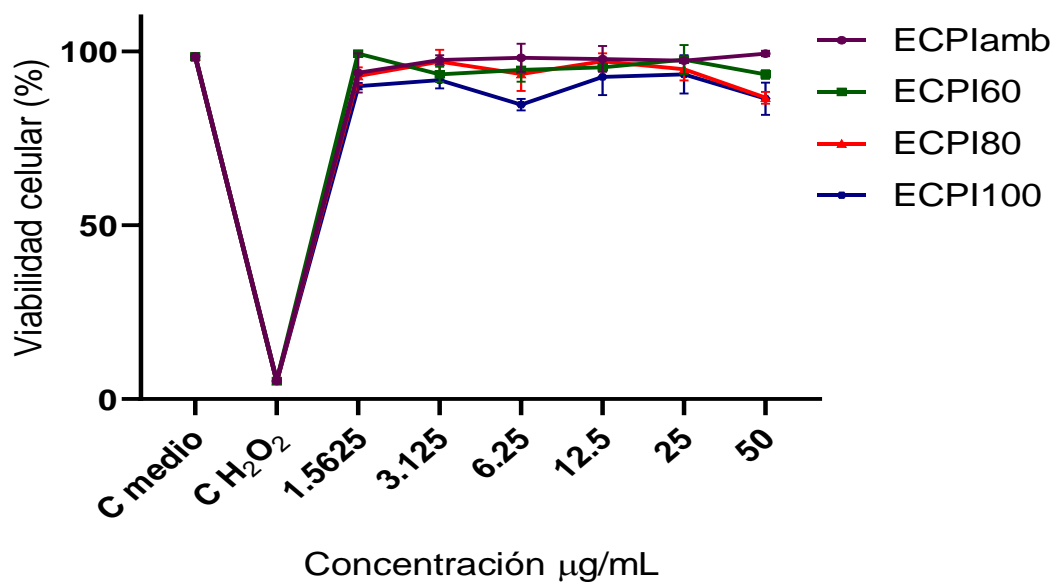


Figura 39. Gráfica de los resultados de citotoxicidad de los extractos de los sistemas ECPIamb, ECPI60, ECPI80 y ECPI100 sobre células MCF-7.

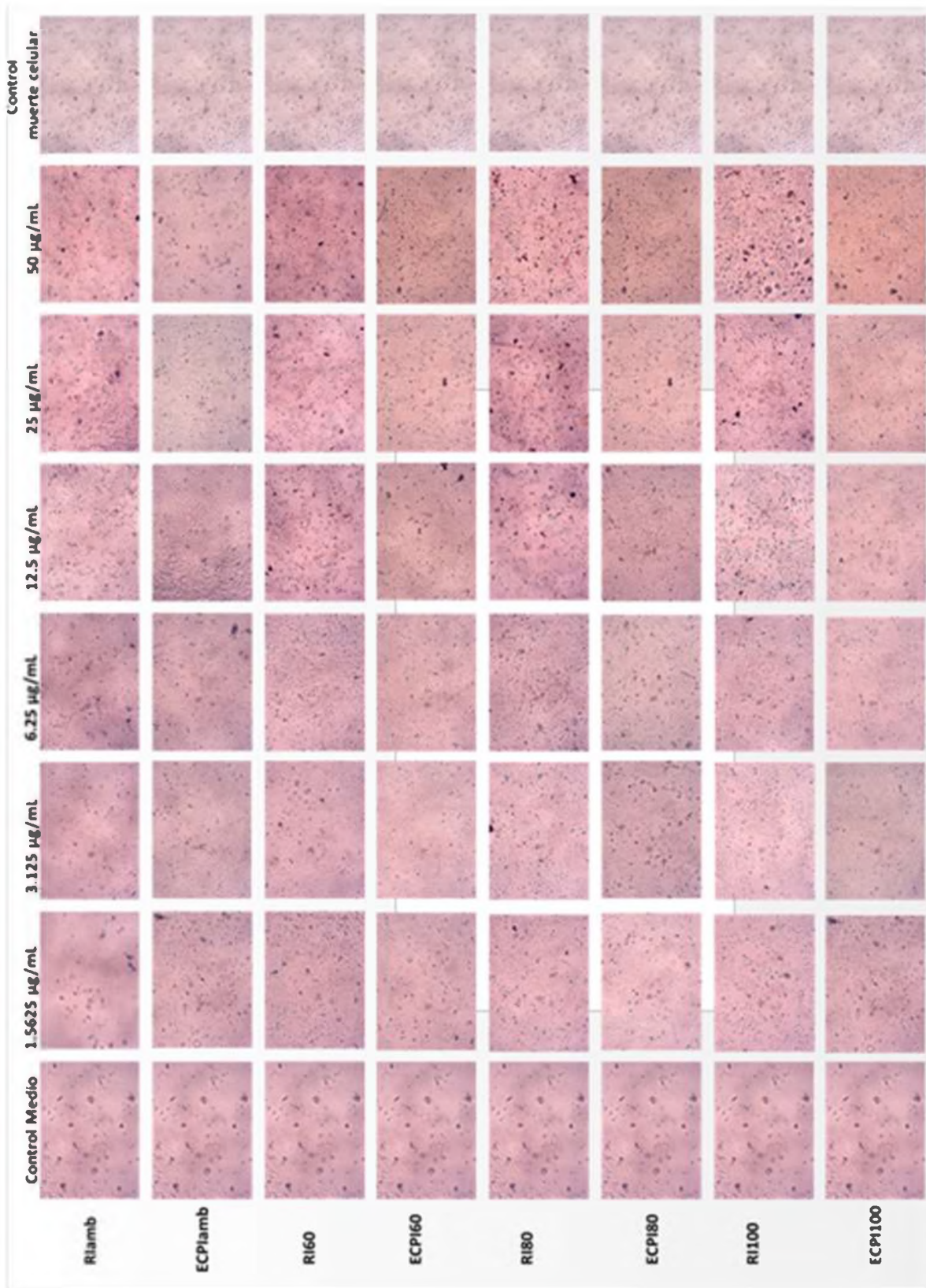


Figura 40. Micrografías de la prueba MTT frente a células MCF-7.

Células mononucleares (monocitos)

Debido a que todos los sistemas de AgNps-AgClNps inducen la pérdida de la viabilidad en células MCF-7 se seleccionaron los sistemas que presentaron mayor efecto de disminución de la viabilidad celular con una dosis menor, para esto se calculó su IC_{50} con ayuda del software GraphPad prism 7, dando como resultado IC_{50} : 20.12, 13.80, 15.72 y 20.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para RIamb, RI60, RI80 y RI100 respectivamente. Por lo tanto, se procedió a analizar los sistemas RI60 y RI80 (Figura 41a) y sus respectivos extractos (Figura 41b).

Ambos extractos mostraron efecto en la viabilidad celular de las células mononucleares. En este caso se observa que el mejor sistema es el RI80 ya que se necesita una IC_{50} de 6.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para inducir la pérdida de la viabilidad en células mononucleares en contraste con el sistema RI60 que necesita una IC_{50} de 5.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para causar este mismo efecto.

Por el contrario, para el gráfico de extractos se observó que el porcentaje de viabilidad celular incrementa. Se considera que este efecto es debido a que en ambos extractos se encuentran nutrientes provechosos para la proliferación de los monocitos.

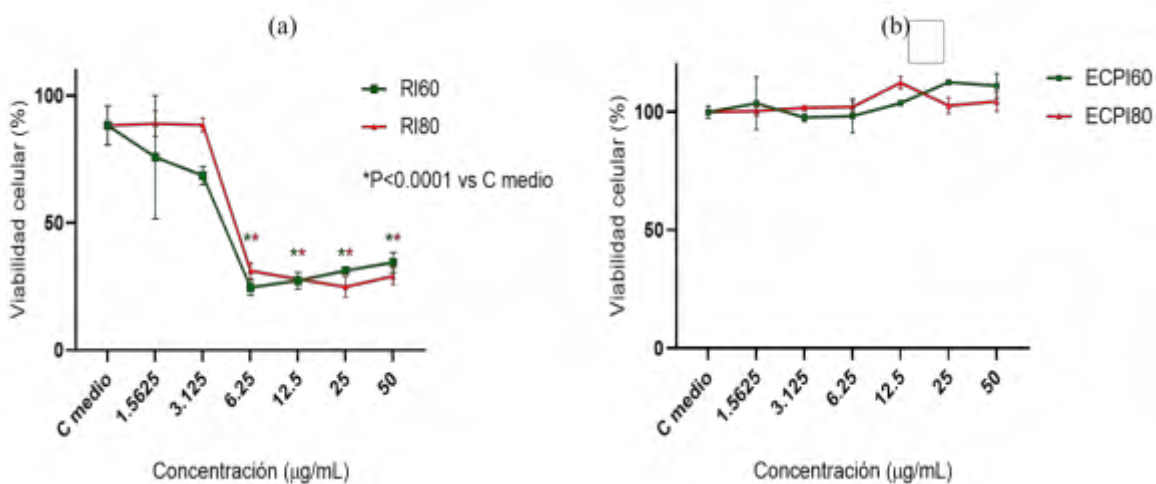


Figura 41. Gráficos de los resultados de citotoxicidad en células mononucleares de (a) AgNps-AgClNps de los sistemas RI60 y RI80, (b) Extractos de los sistemas ECPI60 y ECPI80

9.3 ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS EVA/AgNps-AgClNps

La dispersión e inmovilización de nanopartículas en diversos polímeros es una forma de obtener nanocompuestos con mejores características en comparación a las que tienen los componentes por separado. Se elaboraron películas con el copolímero etileno acetato de vinilo (EVA) y las AgNps-AgClNps (Figura 42). Las películas mostraron una tonalidad café. Curiosamente, la película RI60 (Figura 42b) mostró una tonalidad más oscura. Esta diferencia de tonalidad podría atribuirse a una mayor distribución de las nanopartículas en el polímero, debido al menor tamaño promedio de nanopartículas obtenido, tal como se observa en las micrográficas por TEM (Figura 36b).

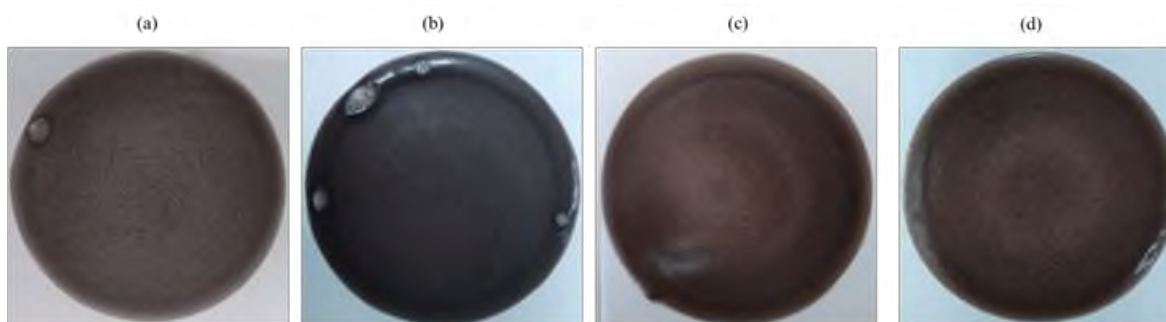


Figura 42. Películas EVA/AgNps-AgClNps (a) RIamb, (b) RI60, (c) RI80 y (d) RI100.

9.3.1 Difracción de rayos X (DRX)

En los difractogramas de las películas (Figura 43) se observa el patrón de difracción del copolímero EVA, con una señal amplia en una posición 2θ de 20, correspondiente a los dominios semicristalinos de la parte de etileno en el EVA.

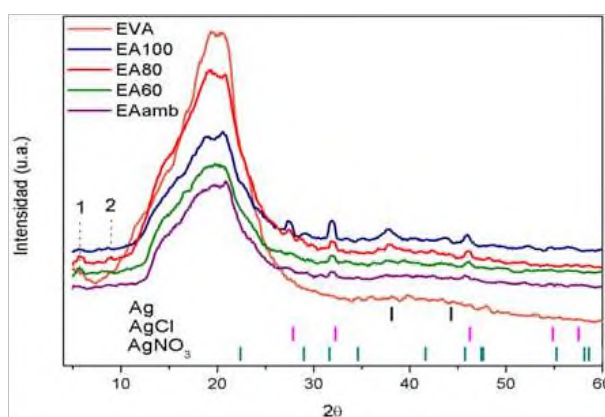


Figura 43. Difractograma de las películas EA/AgNps-AgClNps.

En los patrones de difracción de las películas (Figura 43), se observaron picos que indican la presencia de AgNps y AgClNps, confirmando así la inclusión de estas en la matriz polimérica (Tabla 12). En los difractogramas de las películas EA60 y EA80 se observó la aparición de nuevas señales, para EA60 una señal en una posición 2θ de 5.71 y para EA80 dos señales con valor $2\theta=5.83$ y 8.81 .

Tabla 12. Comparación de ángulos de difracción experimental con estándar Ag COD 9008459 y estándar AgCl COD 96901167.

Estándar Ag COD 9008459		Películas			
hkl	Ángulo de difracción estándar	Ángulo de difracción experimental			
		EA100	EA60	EA80	EA100
(111)	38.11	-	-	-	37.84
(200)	44.30	45.59	-	-	-
(202)	64.44	-	-	-	-
(311)	77.40	-	-	-	-
(222)	81.54	-	-	-	-
Estándar AgCl COD 969011667					
hkl	Ángulo de difracción estándar				
(111)	27.84	-		27.54	27.59
(200)	32.25	31.95	31.94	32.06	32.00
(202)	46.26	-	46.05	46.07	46.04
(311)	54.86	-	-	-	-
(222)	57.52	-	-	-	-
(400)	67.49	-	-	-	-
(313)	74.51	-	-	-	-
(402)	76.80	-	-	-	-
(422)	85.75	-	-	-	-

9.3.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En los espectros FTIR de las películas (Figura 44) se observó que guardan similitud con las señales del copolímero EVA, no obstante, las películas presentaron la aparición y modificación de algunas señales.

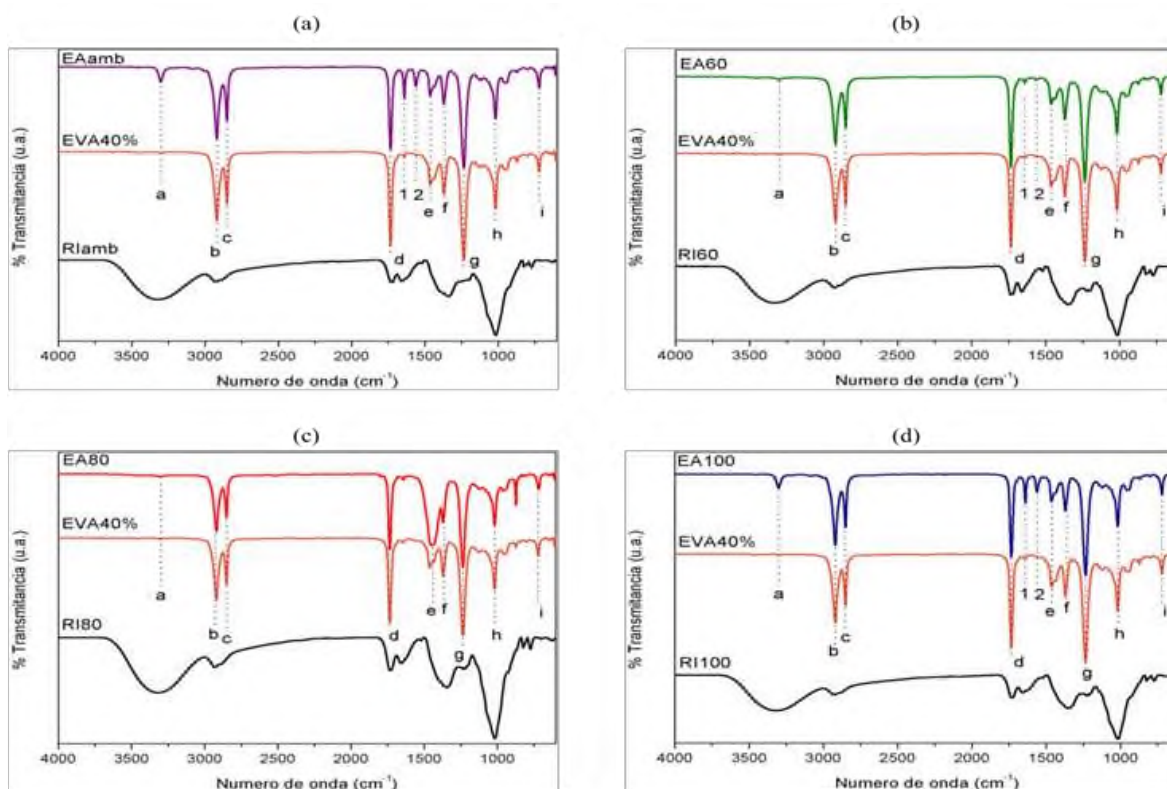


Figura 44. Espectros FTIR de las películas (a) EAamb, (b) EA60, (c) EA80 y (d) EA100.

Como podemos observar en los espectros de las películas (Figura 41) la señal a se atribuye los movimientos de estiramiento para el grupo funcional N-H esto se debe a la presencia del aditivo amino en el producto comercial ELVAX®. Las señales características del EVA se indican a continuación (Tabla 13).

Tabla 13. Bandas de absorción asignadas a los grupos funcionales del copolímero EVA.

Banda	Numero de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3302	N-H	Estiramiento
b	2919	C-H	Deformación
c	2851	R-CH ₃	Estiramiento simétrico
d	1733	C=O	Estiramiento del carbonilo en el éster
e	1463	C-H	Deformación angular
f	1371	O=C-CH ₃	Deformación
g	1235	O-C-O-C	Estiramiento
h	1019	C-O-C	Estiramiento
i	720	CH ₂	Estiramiento de cadena

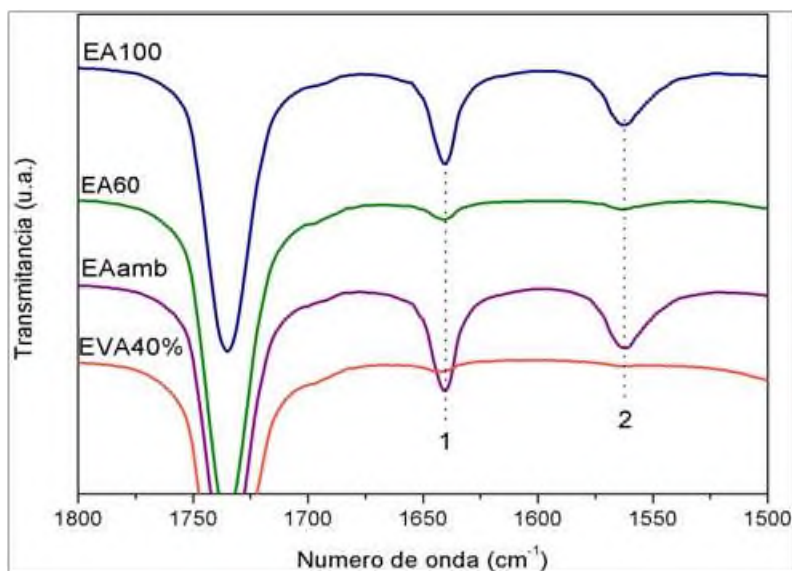


Figura 45. Señal 1 y 2 en los espectros FTIR de las películas EA/AgNps-AgClNps.

Para los espectros FTIR de las películas EAamb, EA60 y EA100 (Figura 45) se observó la formación de dos nuevas señales, la número 1 localizada en 1640 cm^{-1} y la señal 2 ubicada en 1562 cm^{-1} . En el espectro FTIR de EA80 se observó la deformación de la señal (e). Estos cambios se atribuyen a la interacción entre el copolímero y las AgNps-AgClNps.

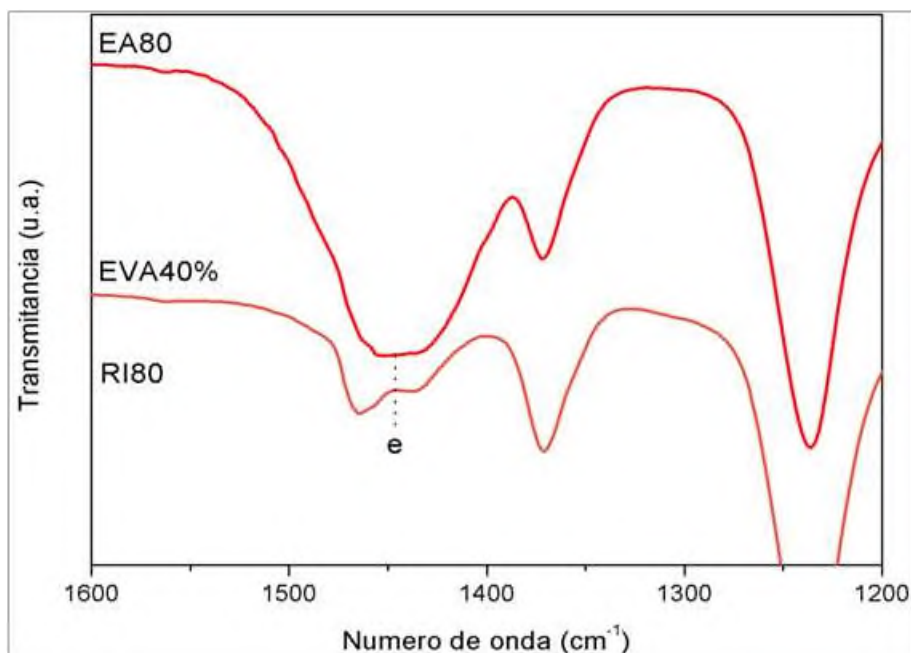


Figura 46. Deformación de la señal e en el espectro FTIR de EA80.

9.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de TGA de las películas elaboradas muestran preferentemente las temperaturas y etapas de degradación del copolímero EVA. Los termogramas presentan similitud en etapas de degradación (Figura 47). En todas las muestras se presentó una primera degradación correspondiente a la formación de ácido acético a los 337 °C, con una pérdida de masa aproximadamente del 28%. A 457 °C hubo una segunda pérdida de masa aproximadamente del 70 %, la cual corresponde a la parte etilénica del EVA. Al final queda un residuo de alrededor del 2 %, el cual corresponde a las nanopartículas que se dispersaron en cada película. Esto es debido a que el contenido de EVA es mayoritario en comparación con el contenido de AgNps que se encuentran dispersas en él.

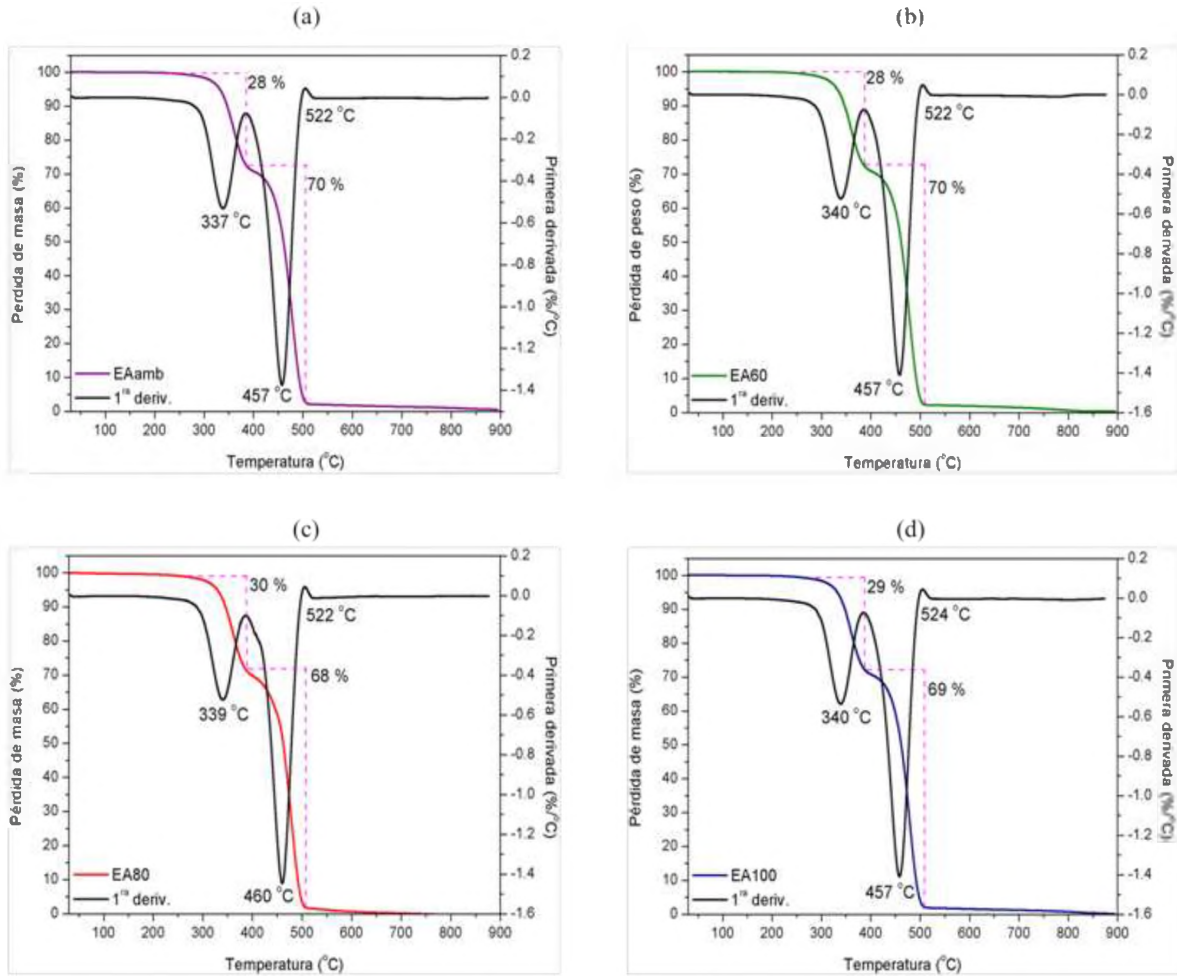


Figura 47. Termogramas de las películas (a) EAamb, (b) EA60, (c) EA80 y (d) EA100.

X. CONCLUSIONES

Se probaron los métodos extracción por infusión y por ultrasonido para extraer metabolitos de la cascara de piña y con la intención de sintetizar nanopartículas de plata. La extracción por infusión resulto ser un proceso más simple en comparación con la extracción por ultrasonido. No obstante, en ambos casos los extractos fueron térmicamente estables y resultaron aptos para la síntesis de nanopartículas de plata.

Los productos de reacción mostraron la coloración café-rojiza la cual es característica en la obtención de nanopartículas de plata. Las bandas de absorción UV-Vis entre 458 y 566 nm demostraron la presencia de AgNps y AgClNps. También, se determinó la formación de clúster de Ag por la presencia de absorciones entre 258 a 282 nm. La aparición de nuevas señales en 1660, 1520, 825 y 770 cm^{-1} en los espectros FTIR de los productos de reacción indicaron también la formación de AgNps y AgClNps. Los picos de difracción determinados mediante DRX confirmaron la coexistencia de AgNps y AgClNps.

La temperatura de reacción tuvo influencia en el tipo de AgNps-AgClNps obtenidas. Se obtuvieron distintas morfologías: mayormente nanoesferas, nanoplatos triangulares y nanobarras, cuyo diámetro promedio se encuentra en un rango de 12 a 25 nm, lo cual es consistente con las bandas de absorción en los respectivos espectros UV-Vis.

El ensayo MTT con las células de cáncer de mama MCF-7 mostró que los sistemas RI60 y RI80 presentaron mejor actividad anticancerígena en comparación con los otros. A partir de esto se realizó el ensayo con células mononucleares (monocitos) demostrando que el sistema RI80 presenta ventaja sobre RI60. Las morfologías, tamaño y tipo de nanopartícula influyeron en la capacidad biológica mostrada.

Las películas formadas a partir del polímero EVA con las nanopartículas obtenidas presentaron textura similar. Los patrones de difracción de las películas EVA/AgNps presentaron nuevos picos en comparación con las materias primas, se considera que esto es efecto del acomodo estructural del copolímero EVA por causa de la presencia de las AgNps y AgCl-Nps.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Yetisen, A. K., Hang, Q., Manchabi, A., Haider, B. & Dokmeci, M. R. Nanotechnology in Textiles. *ACS Nano* (2016).
2. Cheng, H. N., Klasson, K. T., Asakura, T. & Wu, Q. Nanotechnology in Agriculture. *ACS Nano* (2016).
3. Walter, P. *et al.* Early Use of PbS Nanotechnology for an Ancient Hair Dyeing Formula. *Nano Lett.* (2006).
4. Bo, P., Yunsheng, Z. & Guojian, L. Interface properties of nano-silica modified waterborne epoxy-cement repairing system. *ACS Appl. Mater. & Interfaces* (2018).
5. Farrera, C., Ando, F. T. & Feliu, N. Carbon Nanotubes as Optical Sensors in biomedicine. *ACS Nano* (2017).
6. Philip, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* (2010).
7. Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E. & Naghibi, F. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* (2012).
8. Sundrarajan, M. & Gowri, S. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles by *nyctanthes arbor-tristis* leaves extract. *Chalcogenide Lett.* (2011).
9. Kokila, T., Ramesh, P. S. & Geetha, D. Biosynthesis of AgNPs using *Carica Papaya* peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2016).
10. You, C. *et al.* The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical

application and cytotoxicity. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 9193–9201 (2012).

11. Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V. & Brown, G. E. Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 6900–6914 (2012).
12. Stoehr, L. C. *et al.* Shape matters: Effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **8**, 1–15 (2011).
13. Chen, D., Zhu, G., Zhu, X., Qiao, X. & Chen, J. Controlled synthesis of monodisperse silver nanocubes via a solvothermal method. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **22**, 1788–1795 (2011).
14. Priyadarshi, R. & Negi, Y. S. Poly(vinyl pyrrolidone)-mediated synthesis of silver nanowires decorated with silver nanospheres and their antimicrobial activity. *Bull. Mater. Sci.* **42**, (2019).
15. Cruz, D. A. *et al.* Metallic Nanoparticles and Surface Plasmon : a Deep Relationship. *Av. en Cienc. e Ing.* **3**, 67–78 (2012).
16. Chang, S., Chen, K., Hua, Q., Ma, Y. & Huang, W. Evidence for the growth mechanisms of silver nanocubes and nanowires. *J. Phys. Chem. C* **115**, 7979–7986 (2011).
17. Ortega, F., Giannuzzi, L., Arce, V. B. & García, M. A. Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. *Food Hydrocoll.* **70**, 152–162 (2017).
18. Kailasa, S. K., Park, T., Rohit, J. V & Koduru, J. R. *Chapter 14. Antimicrobial activity of silver nanoparticles. Nanoparticles in Pharmacotherapy* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816504-1.00009-0
19. Chahar, V., Sharma, B., Shukla, G., Srivastava, A. & Bhatnagar, A. Study of Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized using Green and Chemical Approach. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (2018).

20. Onitsuka, S., Hamada, T. & Okamura, H. Preparation of antimicrobial gold and silver nanoparticles from tea leaf extracts. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **173**, 242–248 (2019).
21. He, Y. *et al.* Biosynthesis, Antibacterial Activity and Anticancer Effects Against Prostate Cancer (PC-3) Cells of Silver Nanoparticles Using Dimocarpus Longan Lour. Peel Extract. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, (2016).
22. Li, Y. *et al.* Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch. Toxicol.* **91**, 509–519 (2017).
23. AshaRani, P. V., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* **10**, 65 (2009).
24. Bressan, E. *et al.* Silver Nanoparticles and Mitochondrial Interaction. *Int. J. Dent.* **2013**, 1–8 (2013).
25. Vijayan, R., Joseph, S. & Mathew, B. Anticancer , antimicrobial , antioxidant , and catalytic activities of green-synthesized silver and gold nanoparticles using Bauhinia purpurea leaf extract. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **42**, 305–319 (2019).
26. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. & Parikh, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 257–262 (2010).
27. Sharma, V. K., Yngard, R. A. & Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**, 83–96 (2009).
28. Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., Jeon, H. J. & Ahn, C. W. Synthesis of silver nanoparticles in an eco-friendly way using Phyllanthus amarus leaf extract: Antimicrobial and catalytic activity. *Adv. Powder Technol.* **29**, 86–93 (2018).
29. Saha, J., Begum, A., Mukherjee, A. & Kumar, S. A novel green synthesis of silver nanoparticles and their catalytic action in reduction of Methylene Blue dye. *Sustain. Environ. Res.* **27**, 245–250 (2017).

30. Sasidharan, S., Poojari, R., Bahadur, D. & Srivastava, R. Embelin Mediated Green Synthesis of Quasi-spherical and Star-shaped Plasmonic Nanostructures for Antibacterial Activity, Photothermal Therapy and Computed Tomographic Imaging Embelin Mediated Green Synthesis of Quasi-spherical and Star-shaped Plasmonic. (2018).
doi:10.1021/acssuschemeng.8b01894
31. Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V. & Zolfaghari, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. (2014).
32. Keat, C. L., Aziz, A., Eid, A. M. & Elmarzugi, N. A. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresour. Bioprocess.* **2**, 47 (2015).
33. Veisi, H., Azizi, S. & Mohammadi, P. Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by *Thymbra spicata* extract and its application as a heterogeneous and recyclable nanocatalyst for catalytic reduction of a variety of dyes in water. *J. Clean. Prod.* **170**, 1536–1543 (2018).
34. Song, J. Y. & Kim, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**, 79–84 (2009).
35. Ghosh, P. R., Fawcett, D., Sharma, S. B. & Poinern, G. E. J. Production of high-value nanoparticles via biogenic processes using aquacultural and horticultural food waste. *Materials (Basel)*. **10**, (2017).
36. Saratale, G. D. *et al.* Anti-diabetic Potential of Silver Nanoparticles Synthesized with *Argyrea nervosa* Leaf Extract High Synergistic Antibacterial Activity with Standard Antibiotics Against Foodborne Bacteria. *J. Clust. Sci.* **28**, 1709–1727 (2017).
37. Bankar, A., Joshi, B., Ravi, A. & Zinjarde, S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **368**, 58–63 (2010).
38. Konwarh, R., Gogoi, B., Philip, R., Laskar, M. A. & Karak, N. Biomimetic preparation of

polymer-supported free radical scavenging, cytocompatible and antimicrobial 'green' silver nanoparticles using aqueous extract of Citrus sinensis peel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **84**, 338–345 (2011).

39. Goudarzi, M., Mir, N., Mousavi-Kamazani, M., Bagheri, S. & Salavati-Niasari, M. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
40. Patra, J. K. & Baek, K.-H. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. *IET nanobiotechnology* **10**, 326–333 (2016).
41. Yilmaz, M. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of Stevia rebaudiana. *Mater. Chem. Phys.* **130**, 1195–1202 (2011).
42. Flores, C. A. Síntesis de nanopartículas de Ag a partir de extractos de Stevia rebaudiana y su incorporación en almidón termoplástico (Tesis de licenciatura). (Universidad del Papaloapan, 2018).
43. Fatema, U. K., Rahman, M. M., Islam, M. R., Mollah, M. Y. A. & Susan, M. A. B. H. Silver/poly(vinyl alcohol) nanocomposite film prepared using water in oil microemulsion for antibacterial applications. *J. Colloid Interface Sci.* **514**, 648–655 (2018).
44. Portillo Alejo, D. Potencial de nanopartículas de plata inmovilizadas mediante la técnica de ultrasonido recubiertas en corcho granular como agente microbiano (Tesis maestría). (Universitat politècnica de Catalunya, 2015).
45. Garay Ramirez, B. M. L., San Martin Martinez, E. & Cruz Orea, A. Efecto de nanopartículas de plata en materiales de cambio de fase (Tesis maestría). (Instituto politécnico nacional, 2013).
46. Cruz Caldito, J. F. de la. Materiales nanocompuestos de EVA/TiO₂. Efecto de las

nanopartículas de TiO₂ en el coeficiente de expansión térmica (Tesis de licenciatura).
(Universidad Carlos III de Madrid).

47. Schneider, C., Langer, R., Loveday, D. & Hair, D. Applications of ethylene vinyl acetate copolymers (EVA) in drug delivery systems. *J. Control. Release* **262**, 284–295 (2017).
48. Shirdel Ghadikolaei, S., Omrani, A. & Ehsani, M. Impact of Bacterial Cellulose Nanofibers on the Nonisothermal Crystallization Kinetics of Ethylene-Vinyl Acetate Copolymer. *Ind. Eng. Chem. Res.* **55**, 8248–8257 (2016).
49. Çopuroğlu, M. & Şen, M. A comparative study of thermal ageing characteristics of poly(ethylene-co-vinyl acetate) and poly(ethylene-co-vinyl acetate)/carbon black mixture. *Polym. Adv. Technol.* **15**, 393–399 (2004).
50. Wood, N. J., Maddocks, S. E., Grady, H. J., Collins, A. M. & Barbour, M. E. Functionalization of ethylene vinyl acetate with antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4145 (2014).
51. Li, X. *et al.* Postharvest application of wax controls pineapple fruit ripening and improves fruit quality. *Postharvest Biol. Technol.* **136**, 99–110 (2018).
52. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, P. y A. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Available at: www.gob.mx/siap.
53. Feroso, F. G. *et al.* Valuable Compound Extraction, Anaerobic Digestion, and Composting: A Leading Biorefinery Approach for Agricultural Wastes. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 8451–8468 (2018).
54. Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. & Donkor, O. N. Effect of pineapple waste powder on probiotic growth, antioxidant and antimutagenic activities of yogurt. *J. Food Sci. Technol.* **53**, 1698–1708 (2016).
55. Delgado, Z. & Beatriz, J. Cáscaras de piña y mango deshidratadas como fuente de fibra

dietética en producción de galletas (Tesis licenciatura). (2014).

56. Li, T. *et al.* Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. *Int. J. Food Prop.* **17**, 1805–1817 (2014).
57. Erukainure, O. L. *et al.* Alcoholic lung injury: pineapple peel extract modulates antioxidant enzymes and attenuates lipid peroxidation in rat models. *Clin. Phytoscience* **2**, 14 (2017).
58. Steingass, C. B., Glock, M. P., Schweiggert, R. M. & Carle, R. Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MSn and GC-MS analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6463–6479 (2015).
59. García-Rosales, G. *et al.* Fe-TiOx nanoparticles on pineapple peel: Synthesis, characterization and As(V) sorption. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* **9**, 112–121 (2018).
60. Palem, R. R. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles and biopolymer nanocomposites : a comparative study on physico-chemical , antimicrobial and anticancer activity. *Bull. Mater. Sci.* **41**, 1–11 (2018).
61. Aminu, B. *et al.* Anticancer , antibacterial and pollutant degradation potential of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 889–894 (2017).
62. Emeka, E. E. *et al.* Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (*Ananas comosus*). *Micron* **57**, 1–5 (2014).
63. Ahmad, N. & Sharma, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of *Ananas comosus*. *Green Sustain. Chem.* **2**, 141–147 (2012).
64. Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S. K. & Watal, G. Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**, 2–14 (2014).

65. Vinodhini, S. & Rajeswari, V. D. Phytochemical profiling and evaluation of pharmacological activities of *Tribulus terrestris* (LINN) seed. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **7**, 185–198 (2016).
66. Mureşan-Pop, M. *et al.* Solid dispersions of Myricetin with enhanced solubility: Formulation, characterization and crystal structure of stability-impeding Myricetin monohydrate crystals. *J. Mol. Struct.* **1141**, 607–614 (2017).
67. Mathew, S. & Abraham, T. E. Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocoll.* **22**, 826–835 (2008).
68. Keyla, M. T. Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc a partir de extractos de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleifera* (Tesis de maestría). (Universidad del Papaloapan, 2019).
69. Sadh, P. K., Duhan, S. & Duhan, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* **5**, 1–15 (2018).
70. De Cristo Soares Alves, A., Mainardes, R. M. & Khalil, N. M. Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. *Mater. Sci. Eng. C* **60**, 126–134 (2016).
71. Du, L. *et al.* Comparisons and correlations of phenolic profiles and anti-oxidant activities of seventeen varieties of pineapple. *Food Sci. Biotechnol.* **25**, 445–451 (2016).
72. Olugbenga, E., Charles, D., Oseghale, O., Hassan, A. & Bamgbose, J. T. Green synthesis and growth kinetics of nanosilver under bio-diversified plant extracts influence. 85–94 (2015). doi:10.1007/s40097-014-0139-5
73. Zhang, X., Liu, J., Qian, C., Kan, J. & Jin, C. Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food Hydrocoll.* **89**, 1–10 (2019).
74. Bulut, E. & Özacar, M. Rapid, facile synthesis of silver nanostructure using hydrolyzable tannin. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**, 5686–5690 (2009).

75. Sahu, N. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. *Int. Nano Lett.* **6**, 173–181 (2016).
76. Elemike, E. E., Onwudiwe, D. C., Ekennia, A. C., Ehiri, R. C. & Nnaji, N. J. Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extracts of *Lippia citriodora*: Antimicrobial, larvicidal and photocatalytic evaluations. *Mater. Sci. Eng. C* **75**, 980–989 (2017).
77. Joshi, D. D. GC: Herbal Drugs and Fingerprints. *Herb. Drugs Fingerprints* 83–97 (2012). doi:10.1007/978-81-322-0804-4_5
78. Dai, H., Ou, S., Huang, Y. & Huang, H. Utilization of pineapple peel for production of nanocellulose and film application. *Cellulose* **25**, 1743–1756 (2018).
79. Vilas, V., Philip, D. & Mathew, J. Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **132**, 743–750 (2014).
80. Nagar, N., Jain, S., Kachhawah, P. & Devra, V. Synthesis and characterization of silver nanoparticles via green route. *Korean J. Chem. Eng.* **33**, 2990–2997 (2016).
81. Chahar, V., Sharma, B., Shukla, G., Srivastava, A. & Bhatnagar, A. Study of antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using green and chemical approach. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **554**, 149–155 (2018).
82. Ahmad, M. *et al.* Nano-encapsulation of catechin in starch nanoparticles: Characterization, release behavior and bioactivity retention during simulated in-vitro digestion. *Food Chem.* **270**, 95–104 (2019).
83. Bonatto, C. C. & Silva, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. *Ind. Crops Prod.* **58**, 46–54 (2014).
84. Asghar, M. A. *et al.* Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and

black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **90**, 98–107 (2018).

85. Mehmood, A. & Murtaza, G. Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles Synthesized by a Green Method Using Bark Extract of *Melia azedarach* L. 238–245 (2014).
doi:10.1007/s12247-014-9190-5
86. Dare, E. O. *et al.* Zinc-Salt-Mediated Synthesis, Growth Kinetic, and Shaped Evolution of Silver Nanoparticles. *ISRN Nanomater.* **2012**, 1–8 (2012).
87. Gannimani, R. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of silver and gold nanoparticles produced using aqueous seed extract of *protorhus longifolia* as a reducing agent. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **9**, 1669–1679 (2014).
88. Huang, J. *et al.* Biogenic Silver Nanoparticles by *Cacumen Platycladi* Extract: Synthesis, Formation Mechanism, and Antibacterial Activity. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**, 9095–9106 (2011).
89. Zheng, Y., Wang, Z., Peng, F. & Fu, L. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Plectranthus amboinicus* leaf extract and their catalytic activity towards methylene blue degradation. *Rev. Mex. Ing. Química* **12**, 505–511 (2013).
90. Mulvaney, P. & Henglein, A. Formation of unstabilized oligomeric silver clusters during the reduction of Ag⁺ ions in aqueous solution. *Chem. Phys. Lett.* **168**, 391–394 (1990).
91. Gachard, E., Belloni, J. & Subramanian, M. A. Optical and EPR spectroscopic studies of silver clusters in Ag,Na-Y zeolite by γ -irradiation. *J. Mater. Chem.* **6**, 867–870 (1996).
92. Henglein A. Non-metallic silver clusters in aqueous solution:stabilization and chemical reactions. *Chem. Phys. Lett.* **154**, 473–476 (1989).
93. Moeller, T. *Química Orgánica*. (1981).

94. Kumar, D. A., Palanichamy, V. & Roopan, S. M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **127**, 168–171 (2014).