



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

TESIS

Síntesis de nanopartículas de Ag a partir de extractos de *Stevia rebaudiana* y su incorporación en almidón termoplástico

PRESENTA

Celia Aguilar Flores

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Ciencias Químicas

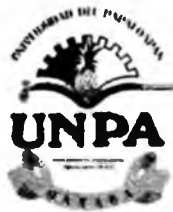
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Mario Valera Zaragoza

CODIRECTOR DE TESIS

Dra. Selene Sepúlveda Guzmán

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2018



UNIVERSIDAD DEL PAPAHOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. a 14 de junio 2018

Asunto: Autorización de impresión de tesis

M. E. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPAHOAPAN
P R E S E N T E

Sirva la presente para infórmale que los abajo firmantes, miembros de la comisión revisora de la tesis presentada por **Celia Aguilar Flores** (pasante de la Licenciatura en Ciencias Químicas, número de matrícula 12060054), manifestamos que después de examinar su trabajo de tesis autorizamos la impresión del manuscrito que lleva por título **“Síntesis de nanopartículas de Ag a partir de extractos de *Stevia rebaudiana* y su incorporación en almidón termoplástico”** para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante. El trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Mario Valera Zaragoza.

Sin otro asunto en particular le agradecemos la atención a la presente.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta

Bœu Lo-tama, chí jí jú

Dr. Andrés Aguirre Cruz
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan

Dr. Erick A. Juárez Arellano
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Profesora-Investigadora
Universidad del Papaloapan

Dr. Mario Valera Zaragoza
Profesor Investigador
Director de Tesis

C.c.p. M. en C. Héctor López Arjona, Vice-Rector Académico de la UNPA, para su conocimiento.
C.c.p. Dra. Roxana Martínez Pascual, Jefa de Carrera de la Licenciatura en Ciencias Químicas

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Calle Circuito Central, No.200, col. Parque Industrial
C.P. 68301, Tuxtepec, Oax. Tel: 01 (287) 87 5 92 40

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril s/n, Cd. Universitaria
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel: 01 (281) 87 2 22 39

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Química de la Universidad del Papaloapan *Campus* Tuxtepec y en el Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT), de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (proyecto de ciencia básica No. 239354).

AGRADECIMIENTOS

En un pedacito de mi tesis voy a ofrecer mis agradecimientos a las personas que me apoyaron en la realización de mi tesis y en mi periodo como estudiante.

Primero, le agradezco a Dios por mandar a mi camino las enseñanzas, las amistades, los retos y las oportunidades.

A mi madre, Eulogia Flores, gracias por haber confiado en mí y dejar que saliera de casa para que pudiera cumplir el deseo de estudiar Química. Gracias por enseñarme a trabajar duro para conseguir las cosas. Agradezco también a mis hermanas, Agustina y Nancy y a mis sobrinos que me consideran la tía favorita.

Agradezco el apoyo de la Dra. Selene Sepúlveda Guzmán que siempre estuvo en la mejor disposición para ayudarme en muchos aspectos profesionales y personales. Dios la siga dotando de muchas virtudes y bendiga su camino.

A mis amigas y amigos a quienes enuncio en el orden en que los conocí: Érika, Luis Tomás, Javier, José Carlos, Ricardo, José Luis, Maritza, Surami, Mónica, Cecilia, Rocío, y en especial a mis amigas de la Universidad, Fanita, Gaviota, Nubis y Maky You, gracias por acompañarme en mis loqueras, por echarme porras, por apoyarme en momentos difíciles. Nos vemos en el próximo episodio, abraza a un egresado de la UNPA.

Agradezco el apoyo, la paciencia, la espera y la confianza de mi Director de Tesis, el Dr. Mario Valera Zaragoza, gracias por aceptarme en su equipo de trabajo. Agradezco también el apoyo del Dr. Aurelio Ramírez Hernández que de no haberse ido de sabático hubiese estado en mi defensa de tesis haciéndome las preguntas más difíciles del mundo.

Agradezco a la Dra. Roxana por haber confiado en mí desde el propedéutico y apoyarme. Agradezco a los profesores que me dieron clases y fueron accesibles cuando tuve problemas de salud y problemas personales.

Agradezco a mis sinodales, la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, el Dr. Érick A. Juárez Arellano y al Dr. Andrés Aguirre Cruz por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo de tesis.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, a mi familia, a mis amigos, al amor y a la vida.

RESUMEN

La plata (Ag) es un metal que ha tenido diversos usos, entre los que destaca su empleo en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo el uso excesivo de este metal puede generar acumulación en la dermis produciendo argirosis, padecimiento que se caracteriza por la producción de una tonalidad azul. Actualmente con el desarrollo de nuevos materiales se ha logrado la obtención de nanopartículas de Ag (AgNps), este tipo de nanoestructura posee un área superficial muy elevada lo que le permite potencializar sus propiedades con menor cantidad de material.

Actualmente, diversos trabajos se han enfocado en la obtención de AgNps por un método amigable con el medio ambiente, entre ellos se encuentran los que hacen uso de agentes reductores y estabilizantes provenientes de extractos de plantas. Sin embargo, hasta el momento el proceso de obtención de las AgNps se ha enfocado en evaluar distintos tipos de plantas y no en mejorar los parámetros de síntesis, tales como; agitación, temperatura y velocidad de incorporación de la sal, entre otros.

En este trabajo se discuten los resultados de los parámetros de síntesis de AgNps utilizando el extracto acuoso de la planta *Stevia rebaudiana* y la incorporación de las nanopartículas obtenidas a 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 obtención de 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. Por otro lado, en el estudio por difracción de rayos-X de las biopelículas almidón/AgNps se observó una importante modificación de los picos de difracción del almidón debido al acomodo de las AgNps entre las cadenas de amilopectina.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
RESUMEN.....	6
CONTENIDO.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni (<i>S. rebaudiana</i>).....	15
2.2 Nanopartículas de Ag (AgNps).....	17
2.2.1 Propiedades ópticas.....	17
2.2.2 Propiedades antimicrobianas.....	19
2.3 Almidón.....	21
III. ANTECEDENTES.....	25
3.1 Métodos verdes para la obtención de AgNps.....	25
3.2 Síntesis de AgNps mediante el uso de extractos de plantas.....	26
Síntesis de AgNps a partir de extractos de <i>Carica papaya</i>	26
Síntesis de AgNps a partir de extractos de <i>Curcubita maxima</i>	26
Síntesis de AgNps a partir de extractos de <i>S. rebaudiana</i>	27
3.3 Nanocompuestos de almidón.....	27
IV. JUSTIFICACIÓN.....	29
V. HIPÓTESIS.....	30
VI. OBJETIVOS.....	31
6.1 Objetivo General.....	31
6.2 Objetivos Específicos.....	31
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	32

6.1. Materiales	32
6.2. Desarrollo experimental	32
6.2.1. Obtención de extractos	32
6.2.2. Determinación de fenoles totales.....	33
6.2.3. Determinación de flavonoides	33
6.2.4. Síntesis de AgNps.....	33
6.2.5. Aislamiento del almidón de plátano macho	34
6.2.6. Elaboración de biopelículas.....	34
6.2.7 Caracterización de las AgNps y películas Almidón/AgNps.....	35
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1 Caracterización de <i>Stevia rebaudiana</i>	37
7.2 Caracterización de los extractos de <i>Stevia rebaudiana</i>	39
7.2.1 Determinación de fenoles totales.....	41
7.2.2. Determinación de flavonoides	42
7.3 Análisis de los productos de reacción en la síntesis de AgNps	43
7.3.1 Avance de reacción.....	44
7.3.2 Caracterización por FTIR	55
7.3.3 Caracterización por espectrofotometría UV-Vis	56
7.4. Estudio morfológico y cristalino de las AgNps.....	61
7.5 Biopelículas de almidón/AgNps.....	75
VIII. CONCLUSIONES.....	84
IX. REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>S. rebaudiana</i> [6].....	15
Figura 2. Estructura base de los glucósidos de esteviol [7].....	15
Figura 3. Representación de LSPR de nanoesfera metálica.	18
Figura 4. Espectros UV-Vis, (a) nanoesferas de Ag [11], (b) nanoplatos triangulares de Ag [12], (c) nanoalambres de Ag [13].....	18
Figura 5. Actividad bactericida de AgNps [14].....	19
Figura 6. Incremento del área superficial en un material.	19
Figura 7. Proceso de crecimiento de AgNps [16].....	20
Figura 8. Mecanismo de Ostwald Ripening.....	21
Figura 9. Estructura química de la amilosa [22].	22
Figura 10. Estructura química de la amilopectina [22].	23
Figura 11. Patrones de difracción de rayos X de almidones tipo A, B y C [24].	23
Figura 12. SEM de AgNps obtenidas con extractos de <i>C. papaya</i> [29].....	26
Figura 13. SEM de AgNps obtenidas a partir de extractos de <i>C. máxima</i> [30].....	26
Figura 14. TEM de AgNps obtenidas a partir de extractos de <i>S. rebaudiana</i> [31].	27
Figura 15. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.....	32
Figura 16. Termograma de pérdida de peso de <i>S. rebaudiana</i>	37
Figura 17. Espectro FTIR del polvo de <i>S. rebaudiana</i>	38
Figura 18. Espectros FTIR de los extractos de <i>S. rebaudiana</i> : extracto 1 (a-c), extracto 2 (d-f).....	40
Figura 19. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.....	41
Figura 20. Curva de calibración para la determinación de flavonoides.	42
Figura 21. Primera derivada de los espectros FTIR de la sal de plata y del extracto 2. 43	
Figura 22. Espectros UV-Vis del AgNO ₃ y extracto 2.....	44
Figura 23. Formación de AgNps en el sistema 1S3.	45
Figura 24. Formación de AgNps en el sistema 1S4.	46
Figura 25. Formación de AgNps en el sistema 1S5.	46
Figura 26. Formación de AgNps del sistema 1S6.	47
Figura 27. Formación de AgNps del sistema 1S8.	48
Figura 28. Formación de AgNps en el sistema 3S2.	48
Figura 29. Formación de AgNps en el sistema 3S3.	49
Figura 30. Formación de AgNps en el sistema 3S4.	50

Figura 31. Formación de AgNps en el sistema 3S5.	51
Figura 32. Formación de AgNps en el sistema 3S6.	52
Figura 33. Formación de AgNps en el sistema 3S7.	53
Figura 34. Formación de AgNps en el sistema 3S8.	54
Figura 35. (a) Espectros FTIR y (b) primera derivada de los espectros de los sistemas 1S.	55
Figura 36. (a) Espectros FTIR y (b) primera derivada de los espectros de los sistemas 3S.	56
Figura 37. Color de los productos de reacción, 1S1, 1S5, 1S8, 3S1, 3S5 y 3S8.....	57
Figura 38. Espectros UV-Vis de los productos de reacción, 1S1, 1S5, 1S8, 3S1, 3S5 y 3S8.....	57
Figura 39. Color de los productos de reacción, 1S2, 1S3, 1S4, 1S6, 1S7, 3S2, 3S3, 3S4, 3S6, y 3S7.....	59
Figura 40. Espectros UV-Vis de los productos de reacción, 1S2, 1S3, 1S4, 1S6, 1S7, 3S2, 3S3, 3S4, 3S6, y 3S7.....	60
Figura 41. Productos de reacción después de ser centrifugados.	61
Figura 42. Espectros UV-Vis de los productos de reacción después de ser centrifugados.	63
Figura 43. (a, b y d) micrografías por TEM de AgNps del sistema 1S4 a diferentes magnificaciones, (c) SAED.	65
Figura 44. (a, c y d) micrografías por TEM de AgNps del sistema 1S5 a diferentes magnificaciones, (b) SAED.....	66
Figura 45. (a) Morfología a alta magnificación de una nanopartícula del sistema 1S5, (b) Análisis FFT de la zona inferior del límite de macla.	67
Figura 46. (a, c y e) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 1S8 a diferentes magnificaciones, (b) análisis por SAED y (d) análisis por FFT.....	68
Figura 47. (a,b y c) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S1 a diferentes magnificaciones y (d) análisis por SAED.....	70
Figura 48. (a, b, c y d) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S2 a diferentes magnificaciones y (e) análisis por SAED.....	71
Figura 49. (a, b, c y e) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S5 a diferentes magnificaciones y (d) análisis por SAED.....	72
Figura 50. (a,b, c, d y e) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S6 a diferentes magnificaciones y (f) análisis por SAED.	73

Figura 51. (a, b, c y d) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S7 a diferentes magnificaciones y (e) análisis por SAED.....	74
Figura 52. Biopelículas de almidón/AgNps.	75
Figura 53. (a) Espectros FTIR de las biopelículas de referencia y (b) resultados de la primera derivada.	76
Figura 54. (a) Espectros FTIR de las películas en los sistemas 1S indicados, (b) primera derivada de los espectros de los sistemas 1S, (c) Espectros FTIR de las películas en los sistemas 3S indicados y (d) primera derivada de los espectros de los sistemas 3S.....	77
Figura 55. Patrones de difracción de las películas de referencia.....	78
Figura 56. Difractogramas de las biopelículas almidón/AgNps con 1mM.	79
Figura 57. Difractogramas de las biopelículas almidón/AgNps con 3mM.	81
Figura 58. Biopelículas de referencia: (a) análisis termogravimétrico y (b) derivadas de las curvas de pérdida de peso.	82
Figura 59. Biopelículas almidón/AgNps a 1mM: (a) análisis termogravimétrico y (b) derivadas de las curvas de pérdida de peso.	82
Figura 60. Biopelículas almidón/Nps a 3 mM: (a) análisis termogravimétrico y (b) derivadas de las curvas de pérdida de peso.	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombre y composición de los glucósidos de esteviol más abundantes en las hojas de <i>S. rebaudiana</i> [7].....	16
Tabla 2. Códigos de reacción y códigos asignados a las síntesis de AgNps.	34
Tabla 3. Códigos asignados a las biopelículas.	35
Tabla 4. Área de zonas de las señales mostradas en los espectros de los extractos.	41
Tabla 5. Cuantificación de fenoles totales en los extractos	41
Tabla 6. Cuantificación de flavonoides en los extractos	42
Tabla 7. Principales grupos funcionales de la primera derivada del espectro FTIR en el extracto 2.	44
Tabla 8. Carta de difracción de la plata.	64

I. INTRODUCCIÓN

La plata (Ag) es un elemento metálico multifacético que está presente de forma natural en el planeta. Una de las zonas más productivas de Ag en el mundo es la denominada “Faja de plata” en México, siendo Zacatecas el estado más destacado en la extracción de plata [1].

A lo largo de la historia, la plata ha tenido una gran variedad de usos. Por ejemplo, se ha utilizado en la fabricación de armas de guerra, utensilios de cocina, joyería y también en la medicina tradicional. Existe evidencia de su uso en la medicina tradicional como antimicrobiano desde años antes de Cristo. Hipócrates, médico de la antigua Grecia molía finamente placas de Ag para obtener polvos y utilizarlos para curar úlceras y heridas. Antiguamente, por cuestiones de higiene diversos utensilios de cocina eran de Ag. Cuando se acuñaron las monedas de plata era común depositarlas sobre recipientes almacenadores de agua para purificarla, de esta forma se creaban áreas de asepsia y se evitaban enfermedades, principalmente gastrointestinales [2].

Con el descubrimiento de los antibióticos para el tratamiento de infecciones, el uso de la Ag como antimicrobiano dejó de utilizarse y estudiarse. Sin embargo, diversos microorganismos principalmente bacterias, han llegado a presentar resistencia a los antibióticos; es ahora donde nuevamente surge el uso de la Ag para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos, ya que su función es de amplio espectro y la resistencia de las bacterias hacia ella es casi nula.

La plata es considerada un metal noble, porque no forma óxidos por interacción con el medio ambiente [1]. La Ag en estado basal no posee propiedades antimicrobianas, pero en estado oxidado sí (Ag^{+1}), diversos estudios han propuesto mecanismos por los cuales actúa la plata en bacterias, entre estas propuestas se encuentra que la Ag provoca cambios en la estructura del ADN bacteriano [3].

Actualmente se tiene interés en potencializar la propiedad antimicrobiana de la plata, generando partículas en estado nanométrico: nanopartículas de plata (AgNps), de esta manera existe mayor área superficial disponible para actuar como antimicrobiano, además al no estar en forma de sal evita favorecer su acumulación en la dermis. Es importante mencionar que apenas se comienza a trabajar por regular las dosis en el consumo de la plata para sus distintas presentaciones: sales, coloides y AgNps. Es sabido

que el consumo excesivo de sales de Ag puede generar acumulación en la piel produciendo Argirosis, padecimiento caracterizado por la presencia de un color gris azulado en la dermis. La Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) en 1991 estableció una dosis oral de 0.005 mg/Kg/día, con base a la máxima cantidad que puede producir Argiria. Mientras tanto la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) aún no reconoce que el consumo de Ag sea seguro y eficaz (1991). La presencia de AgNps en el mercado es reciente y faltan investigaciones más profundas acerca de su comportamiento dentro del organismo.

Existen diversas maneras por las que se puede sintetizar AgNps, la síntesis química ha sido una de las pioneras, en ella se hace uso de distintos compuestos químicos que después se retiran con disolventes orgánicos, generando muchos desechos. La síntesis verde es otra manera de sintetizar las AgNps de una manera más amigable con el medio ambiente al hacer uso de compuestos de origen natural.

En este trabajo se realizó la síntesis de AgNps por un método verde, utilizando metabolitos de los extractos de *S. rebaudiana*, considerando que en su mayoría estos metabolitos son agentes reductores, sustancias muy importantes en la síntesis de nanopartículas de Ag. Las AgNps obtenidas se incorporaron a almidón, un polímero de origen natural.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni (*S. rebaudiana*)

El género *Stevia* comprende alrededor de 230 especies pertenecientes a la familia de las asteraceae, familia caracterizada por la presencia de inflorescencias. La especie *S. rebaudiana* es nativa del sur de América, principalmente del noreste de Paraguay; las plantas pueden medir hasta un metro de altura con hojas entre 3-4 cm con forma elíptica [4,5] (**Figura 1**).



Figura 1. Planta de *S. rebaudiana* [6].

S. rebaudiana es utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas, tales como; actividad antiinflamatoria, antihipertensiva, antihiper glucémica, antitumoral, antidiarreica, antioxidante y en el ramo alimenticio se utiliza por su alto poder edulcorante y no contiene calorías [5].

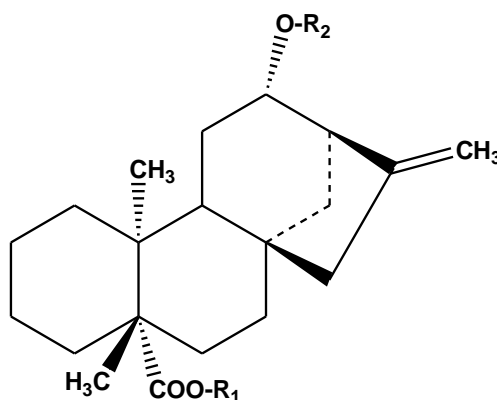


Figura 2. Estructura base de los glucósidos de esteviol [7].

Tabla 1. Nombre y composición de los glucósidos de esteviol más abundantes en las hojas de *S. rebaudiana* [7].

Nombre del compuesto	R ₁	R ₂
1.- esteviol	H	H
2.- esteviolbíosido	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
3.- esteviósido	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
4.- rebaudiósido A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
5.- rebaudiósido B	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
6.- rebaudiósido C (dulcósido B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
7.- rebaudiósido D	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
8.- rebaudiósido E	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
9.- rebaudiósido F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
10.- dulcósido A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)

*R₁, R₂= Sustituyentes de la estructura base de los glucósidos de esteviol; Glc=Glucosa; Xyl=Xilosa; Rha= Ramanosa

Las especies *phobophylla* y *rebaudiana* son las únicas que producen glucósidos de esteviol responsables del sabor dulce, siendo en *S. rebaudiana* donde se producen en mayor cantidad [8]. En esta especie hay distintos tipos de glucósidos de esteviol; el más abundante encontrado en las hojas es el esteviósido (4-3 % w/w), seguido del rebaudiósido A (2-4 % w/w), rebaudiósido C (1-2 % w/w) y dulcósido A (0.4-0.7 % w/w) [9]. (**Figura 2, Tabla 1**). Entre otros componentes fitoquímicos de las hojas se encuentran los flavonoides, alcaloides, ácido hidroxicinámico, vitaminas, fitoesteroles, aceites esenciales, ácido fólico, aminoácidos y otros compuestos minoritarios [8,9].

En nuestro país la siembra y comercialización de *S. rebaudiana* es reciente; la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) informa que los primeros sembradíos en México se registraron en el 2011 en los estados de Quintana Roo y Yucatán; actualmente estados

como Chiapas, Oaxaca y Guerrero han comenzado a producirla ya que las condiciones climáticas que se tienen en algunas regiones son favorables para el crecimiento de este arbusto.

2.2 Nanopartículas de Ag (AgNps).

Cuando los elementos o compuestos son reducidos a tamaños por debajo de los 100 nm en alguna de sus dimensiones, se considera la formación de nanopartículas, con este tamaño existen cambios en sus propiedades. Las AgNps tienen aplicaciones atractivas ya que sus propiedades eléctricas, magnéticas, ópticas, catalíticas y antimicrobianas se encuentran potencializadas.

2.2.1 Propiedades ópticas

Las nanopartículas de metales nobles presentan una propiedad óptica cuando interactúan con luz polarizada, mediante un fenómeno superficial denominado resonancia de plasmón localizado (LSPR por sus siglas en inglés). Un plasmón es la oscilación colectiva de los electrones libres de la superficie de los metales [10]; cuando esta superficie se confina a una partícula con un tamaño similar al de la radiación incidente se genera un aumento en el campo eléctrico. Este campo eléctrico induce dipolos en la superficie de la nanopartícula, en ese momento una fuerza restauradora brinda un equilibrio generando oscilaciones colectivas (**Figura 3**). De acuerdo a la morfología que interactúe con la radiación es la frecuencia de resonancia del plasmón.

Las nanoesferas de Ag presentan un pico de absorción alrededor de los 430 nm, debido a que la frecuencia de absorción del plasmón es la misma en cualquier dirección donde se propague la radiación (**Figura 4a**). Los nanoplatos triangulares de Ag presentan un pico de absorción amplio que se extiende desde los 500nm hasta los 900nm (**Figura 4b**), el rango es amplio debido al área de absorción que esta morfología provee, ya que contiene un gran número de electrones que se encuentran oscilando longitudinalmente. En el caso de los nanoalambres de Ag estos presentan dos picos de absorción, el menos intenso corresponde a la absorción transversal (350 nm) y el más intenso a la absorción longitudinal (390 nm) (**Figura 4c**). El comportamiento de las

AgNps con la luz visible es una gran herramienta para identificar el tipo de morfología obtenida al término de una reacción.

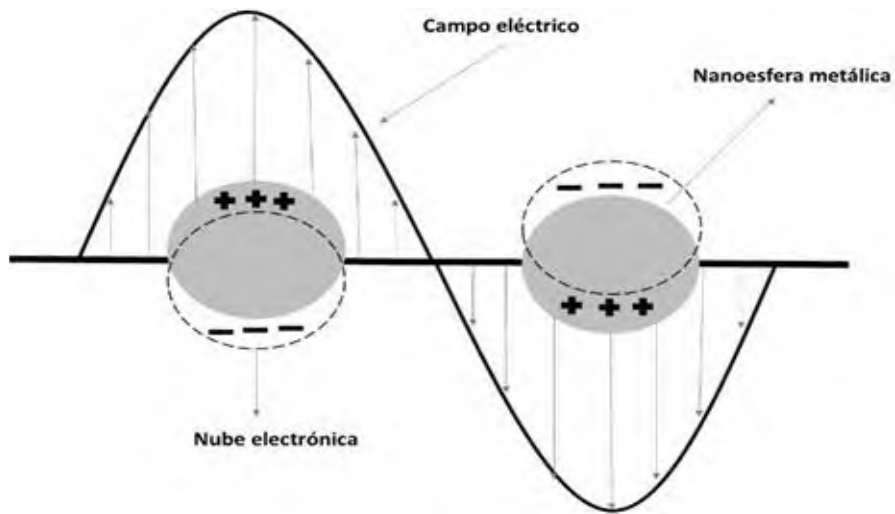


Figura 3. Representación de LSPR de nanoesfera metálica.

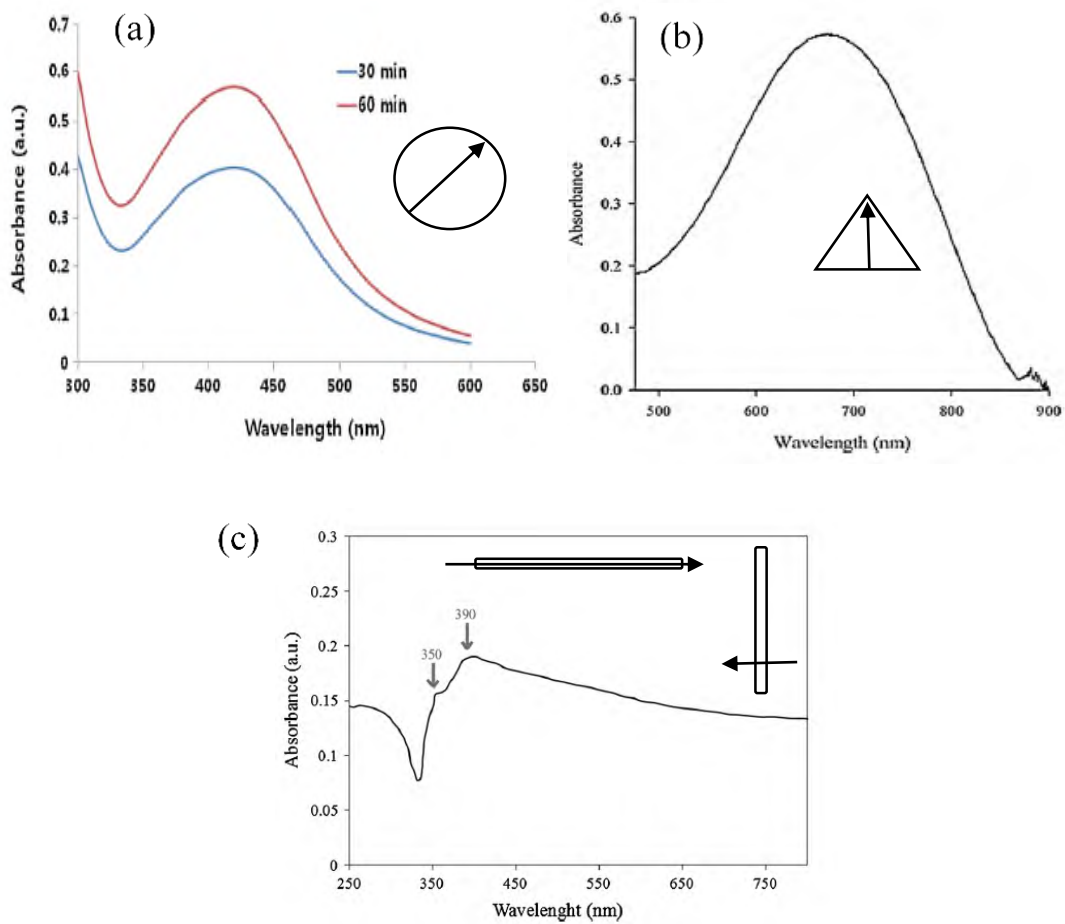


Figura 4. Espectros UV-Vis, (a) nanoesferas de Ag [11], (b) nanoplatos triangulares de Ag [12], (c) nanoalambres de Ag [13].

2.2.2 Propiedades antimicrobianas

Un agente antimicrobiano es aquel que afecta el crecimiento y actividad de los microorganismos. La Ag se diferencia de los antimicrobianos comunes porque es de naturaleza inorgánica. La especie Ag^{+1} , es la forma antimicrobiana de la Ag. Las AgNps provocan la apoptosis celular en dos pasos: El primero consiste en el ingreso de las AgNps a la bacteria través de la membrana; el segundo paso muestra la llegada de las AgNps al citoplasma bacteriano, ahí se generan cambios en la estructura del ADN y como consecuencia la muerte bacteriana (**Figura 5**).

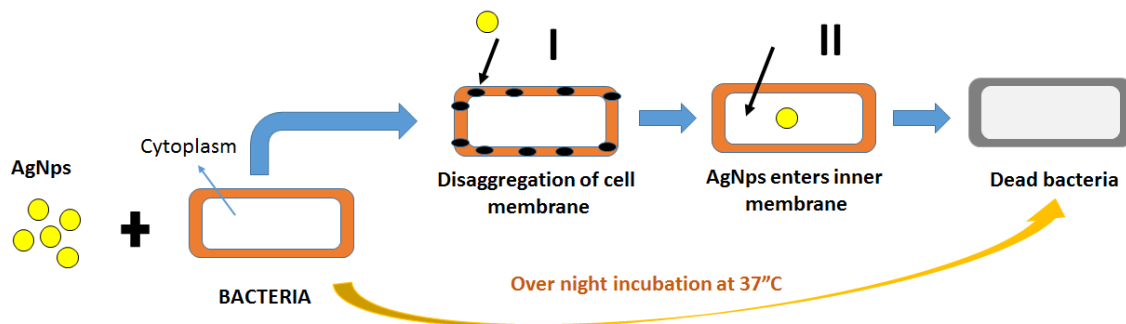


Figura 5. Actividad bactericida de AgNps [14].

El área que interacciona con la superficie de un sólido se denomina área superficial, mientras más pequeña sea una partícula mayor es el área superficial ya que la zona de contacto entre el material y el exterior es mayor (**Figura 6**).

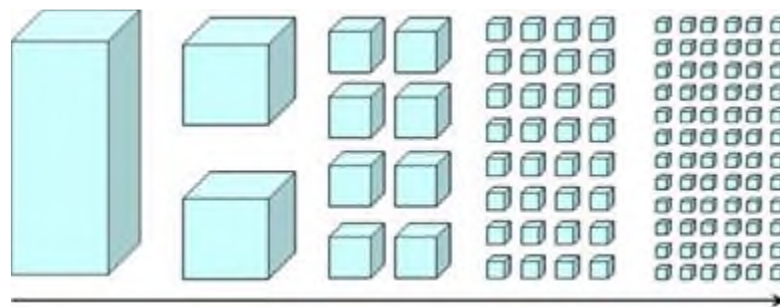
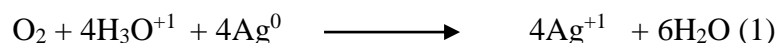


Figura 6. Incremento del área superficial en un material.

Las AgNps tienen grandes áreas superficiales con respecto al material en masa; de esta manera mayor número de átomos de Ag^0 se oxidan con el medio para formar Ag^{+1} .

La reacción de óxido-reducción que explica la formación de iones de Ag^{+1} se representa en la ecuación (1) [15].



El mecanismo de formación de AgNps no está totalmente esclarecido, sin embargo existen propuestas ampliamente utilizadas para explicar el proceso de formación. Se considera que en un inicio los iones Ag^{+1} son reducidos por agentes reductores que se adicionan a la mezcla de reacción, esto permite la obtención de átomos en estado basal. Una vez que los átomos están en su estado basal comienza la nucleación, esto a partir de colisiones entre los átomos que permite el agrupamiento de los mismos. Estos núcleos son precursores de partículas más grandes. En general, las distintas morfologías de AgNps que se han logrado sintetizar se agrupan en dos categorías, las granulares con múltiples facetas y las planas. Se considera que los núcleos precursores de partículas granulares y planas se forman mediante el crecimiento en dirección del plano (111). Para que ocurra la morfología granular los núcleos deben ser policristalinos, con planos espejos entre los límites de grano para permitir el crecimiento de las facetas, a diferencia de los precursores de nanopartículas planas donde los núcleos son monocristalinos (**Figura 7**).

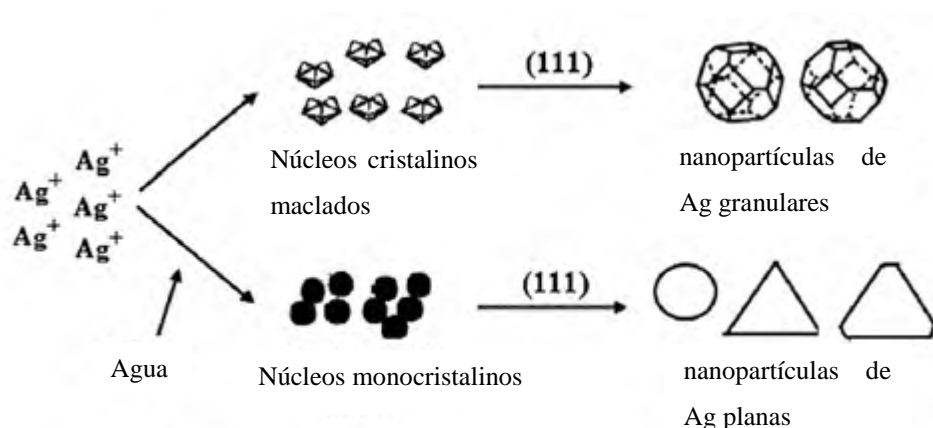


Figura 7. Proceso de crecimiento de AgNps [16].

El proceso de agrupación de núcleos se genera por coalescencia entre los núcleos y ha sido explicado por el mecanismo de Ostwald Ripening (**Figura 8**). La energía superficial que poseen las partículas ocasiona que busquen un estado de menor energía, las partículas más grandes crecen a expensas de las pequeñas [17].

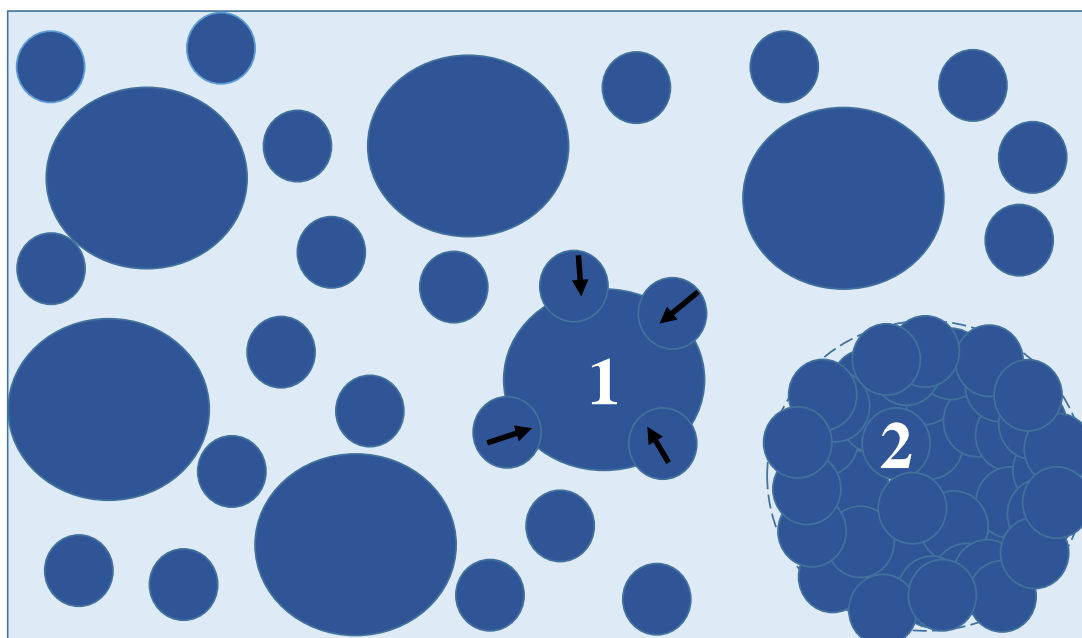


Figura 8. Mecanismo de Ostwald Ripening, las partículas más grandes (esfera 1) crecen a expensas de las más pequeñas obteniéndose partículas de mayor tamaño (esfera 2).

Es importante aclarar que las partículas más pequeñas al poseer un ordenamiento cristalino pueden unirse de dos maneras, con ordenamiento orientado o sin seguir alguna orientación, todo depende de cómo ocurra la colisión [18].

2.3 Almidón

El plátano es un fruto que posee una gran diversidad de variedades que se agrupan en dos especies; una de ellas es la especie *Musa sapientum* que incluye las variedades guineo, dominico, manzano, roatán, entre otros y *Musa paradisiaca* en el que se encuentra el plátano macho, quien destaca de los demás por poseer menor cantidad de azúcares. La mata de plátano macho mide en promedio 4m de altura, sus frutos son ricos en almidón y miden entre 20-40 cm de largo y 4-7 cm de diámetro [19].

La composición del plátano se encuentra de la siguiente manera, 70-74 % de humedad, 1% de proteína, 0.3-0.5 % de grasa, 20-30 % de carbohidratos totales, 0.5 % de fibra total, 3-5 % de fibra dietética y 1% de cenizas [20]. Es considerada una fuente importante de obtención de almidón porque no representa un peligro de desabasto para el consumo alimenticio, en comparación con las otras fuentes de obtención, maíz, trigo o papa ya que se puede aislar de frutos de desecho (en condiciones no favorables para consumo por defectos de forma).

En México, el plátano macho es producido principalmente en Tabasco, Chiapas, Veracruz y Oaxaca. Siendo la cuenca del Papaloapan la principal región productora del estado de Oaxaca.

El almidón, es la principal fuente de reserva de carbohidratos en plantas. Está constituido por dos polímeros: amilosa y amilopectina. En el plátano macho, la amilosa representa el 30 % y la amilopectina el 70 % de su composición. La amilosa (**Figura 9**) es un polímero lineal que se encuentra conformada por unidades repetitivas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1 – 4) y escasas ramificaciones α (1 – 6). La amilosa confiere el carácter amorfo al almidón y forma hélices dando vueltas cada 6-8 unidades de glucosa. Por otro lado, la amilopectina (**Figura 10**) se encuentra formada por cadenas de residuos α -D-glucopiranososa unidos por enlaces α (1-4) y un 5-6 % de los enlaces totales, por enlaces α (1-6) en los puntos de ramificación [21].

Existe una interacción entre las ramificaciones de la amilopectina que permite la formación de estructuras cristalinas constituidas por dobles hélices. La estabilización de las dobles hélices se genera por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. A su vez, las ramificaciones α (1 – 6) de la amilosa también generan dobles hélices por interacción con otras cadenas, lo que le permite estar entremezclada con la amilopectina.

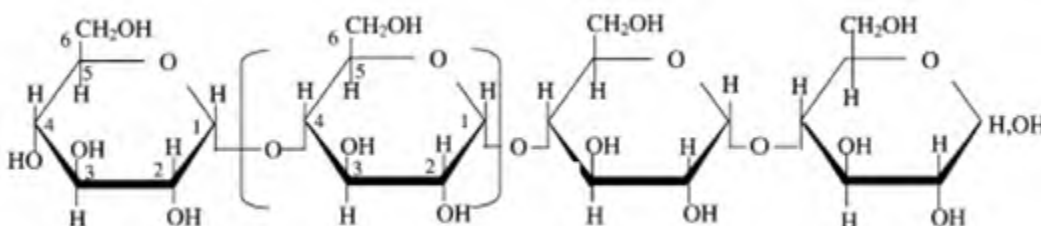


Figura 9. Estructura química de la amilosa [22].

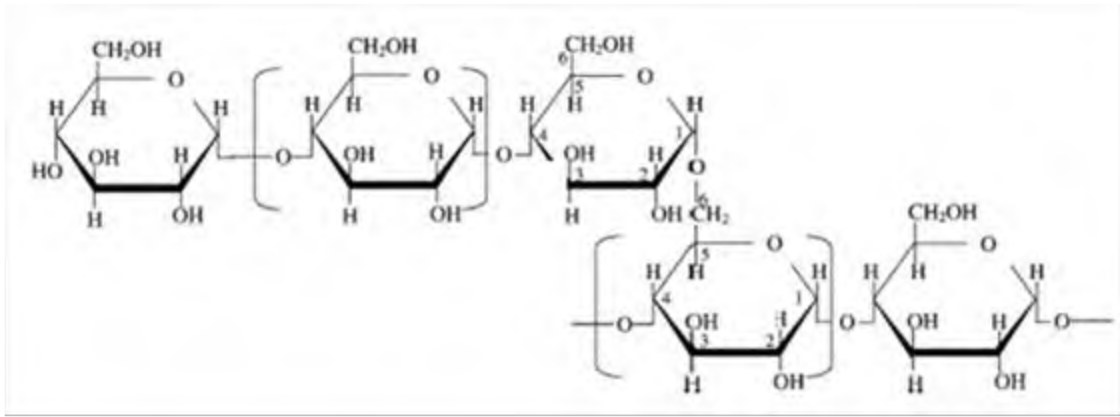


Figura 10. Estructura química de la amilopectina [22].

Las dobles hélices que se forman por las cadenas de amilopectina se pueden ordenar de tres formas y cada una posee un patrón de difracción de rayos X diferente (**Figura 11**).

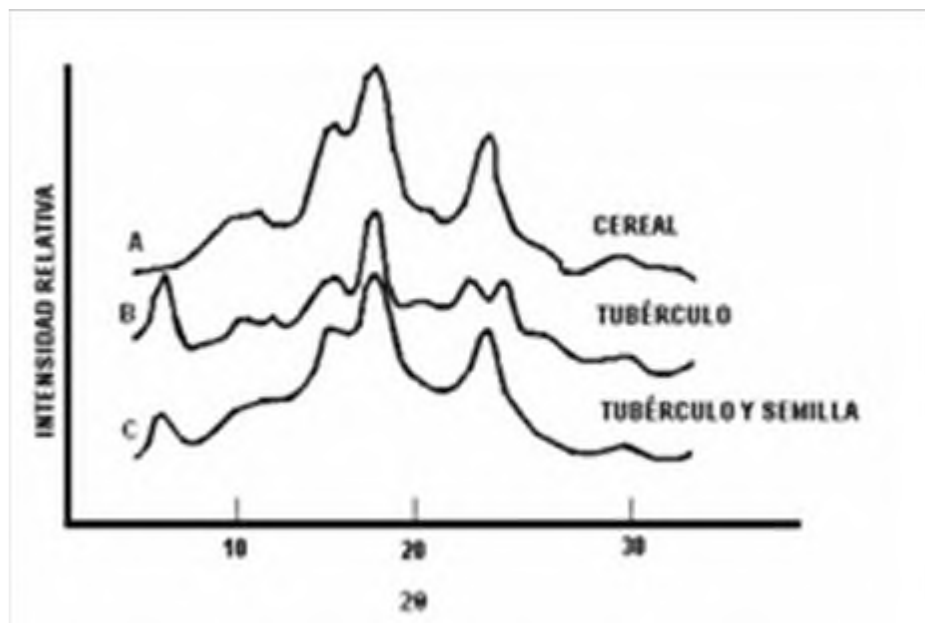


Figura 11. Patrones de difracción de rayos X de almidones tipo A, B y C [24].

De acuerdo al patrón de difracción de rayos X que se presente, el almidón se puede clasificar en tipo A, B o C. El almidón tipo A generalmente se encuentra en cereales y raíces como yuca y camote; en este arreglo las dobles hélices de la amilopectina se encuentran empaquetadas en forma monoclinica y contienen entre 4-8 moléculas de agua; los picos más intensos del patrón de difracción de rayos X para este arreglo se encuentran en $2\theta = 15^\circ$ y 23° . El almidón tipo B se encuentra generalmente en tubérculos y raíces, las dobles hélices se encuentran empaquetadas en forma hexagonal y contienen 36

moléculas de agua; los picos más intensos del patrón de difracción de rayos X para este arreglo se encuentran en $2\theta = 5.6^\circ, 15^\circ$ y 24° . El almidón tipo C posee características del almidón tipo A y B, además de ser característico de leguminosas [22-24]. Las amilosa y amilopectina se orientan en forma radial para formar gránulos. En agua fría los gránulos de almidón no se solubilizan, pero cuando la temperatura se incrementa ocurren procesos muy interesantes. Entre ellos, se encuentra el desordenamiento de las cadenas generando un acceso para que las moléculas de agua penetren entre las cadenas provocando la hinchazón de los gránulos; a este proceso se le conoce como gelatinización. En el proceso de gelatinización, los gránulos colapsan provocando que la parte cristalina del almidón se disuelva en el agua y genere un aumento de la viscosidad [25]. Al desaparecer la estructura ordenada dentro del gránulo permite la solubilidad de las cadenas en el medio acuoso.

El proceso que ocurre después de la gelatinización se llama retrogradación. La retrogradación es un proceso en el que existe insolubilización y precipitación de moléculas de amilosa. Las cadenas de amilosa forman cristales que están compuestos por dobles hélices debido a interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. La formación de las dobles hélices en la amilosa se presenta inmediatamente después de la gelatinización. La retrogradación de la amilopectina es más lenta debido a su estructura altamente ramificada, pero en general, la velocidad de retrogradación depende de varios factores como, la longitud de las cadenas de la amilopectina, concentración de lípidos, y derivados monoéster y fosfatos [26].

III. ANTECEDENTES

3.1 Métodos verdes para la obtención de AgNps

La síntesis verde es el conjunto de procedimientos utilizados para obtener un producto de una manera más amigable con el medio ambiente haciendo uso eficiente de la energía. La síntesis verde para obtener AgNps, es un tema nuevo para la ciencia. Actualmente, existen algunas formas por las cuales se obtienen AgNps por un método verde. A continuación se mencionan las más utilizadas [27].

Usando polisacáridos. Este método es uno de los más sencillos, se hace uso de grupos funcionales reductores principalmente oxidrilos de glucosa para reducir átomos de Ag. Los polisacáridos además de contener moléculas con grupos funcionales reductores también funcionan como agentes estabilizantes para generar la morfología de nanopartícula. Las AgNps obtenidas por este método son estables y su tamaño varía con el tamaño del polisacárido utilizado y la cantidad de grupos funcionales que posea.

Método de Tollens. Utiliza el principio del ensayo de Tollens en el cual se produce reducción en complejos de plata amoniacal mediante la oxidación de aldehídos. Para controlar el tamaño y la forma de las AgNps se utilizan monosacáridos o disacáridos de origen natural.

Con irradiación. Se utiliza una fuente de láser para la generación de AgNps, no se hace uso de agentes reductores como en los métodos anteriores pero si de agentes estabilizantes. Este método permite la obtención de AgNps más rápidamente y con menor cantidad de sustancias.

Procesos biológicos. En este método se utilizan sustancias producidas por el metabolismo de microorganismos, principalmente de bacterias. Las sustancias responsables de la reducción y estabilización de las AgNps son proteínas, polisacáridos, aminoácidos entre otros [28].

Usando extractos de plantas. Últimamente, se han utilizado extractos de algunas plantas para reducir a partir de la sal de plata a Ag metálica y obtener nanopartículas.

3.2 Síntesis de AgNps mediante el uso de extractos de plantas

Síntesis de AgNps a partir de extractos de *Carica papaya*.

Banala *et al.* [29] utilizaron extractos de las hojas de *C. papaya* para la obtención de AgNps. Los resultados mostraron nanopartículas con un tamaño alrededor de los 200 nm (**Figura 12**).

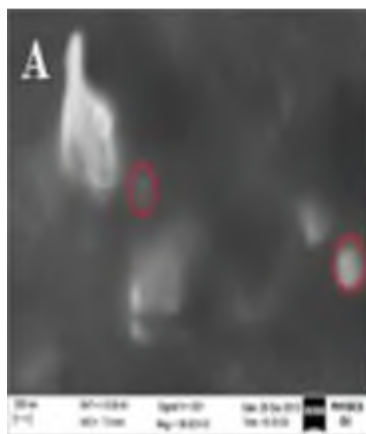


Figura 12. SEM de AgNps obtenidas con extractos de *C. papaya* [29].

Síntesis de AgNps a partir de extractos de *Curcubita maxima*.

Nayak *et al.* [30] utilizaron extractos de pétalos de *C. máxima* (una planta originaria de la India con aplicaciones médicas y alimenticias) para sintetizar AgNps (**Figura 13**). Los extractos fueron obtenidos con 5 g de pétalos en 50 mL de agua desionizada, calentada a 50 °C por un tiempo de 60 min.

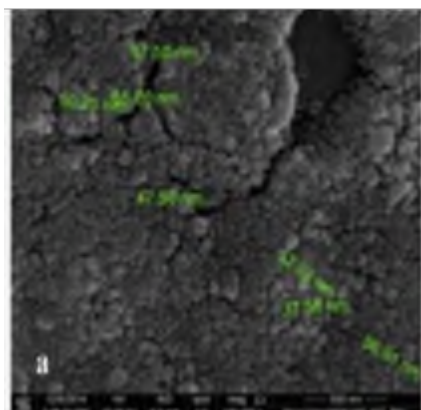


Figura 13. SEM de AgNps obtenidas a partir de extractos de *C. máxima* [30].

Síntesis de AgNps a partir de extractos de *S. rebaudiana*

Solo se ha reportado un trabajo sobre la síntesis de AgNps a partir de extractos de *S. rebaudiana*, Yilmaz *et al.* [31] realizaron la síntesis de AgNps con extractos de las hojas de esta planta obteniendo nanopartículas en el rango de 2 a 50 nm (**Figura 14**).

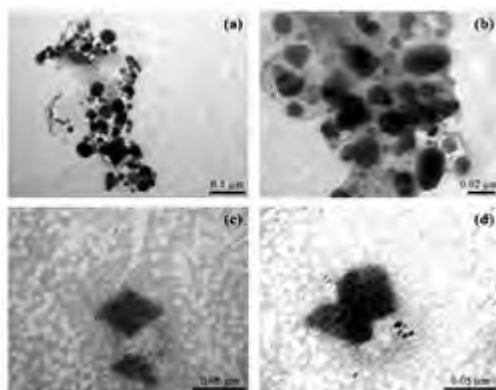


Figura 14. TEM de AgNps obtenidas a partir de extractos de *S. rebaudiana* [31].

3.3 Nanocompuestos de almidón

El almidón ha sido ampliamente utilizado para generar biopelículas ya que al provenir de una fuente de origen natural posee periodos de degradación bajos, en comparación con los materiales convencionales. Sin embargo, estas biopelículas poseen propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua deficientes, por lo que actualmente los trabajos se han enfocado en mejorar o añadir nuevas propiedades a las biopelículas, de entre los que destaca la generación de nanocompuestos de almidón. Un nanocompuesto es una mezcla en la que alguno de los componentes posee un tamaño en escala nanométrica.

Uno de los nanocompuestos de almidón reportados, es el nanocompuesto de almidón con nanofibras de celulosa desarrollado por Pelissari *et al.* [32]. Los nanocompuestos fueron preparados por el método de casting y reportaron una dispersión homogénea de las nanofibras en la matriz polimérica. Los nanocompuestos presentaron un incremento de la temperatura de transición vítrea, el módulo de Young, resistencia a la absorción de agua, opacidad, cristalinidad, estabilidad térmica y fuerza de tensión.

Por otro lado, las diversas propiedades que posee el almidón le ha permitido ser utilizado para otros fines, por ejemplo, los nanocompuestos con actividad antimicrobiana

que reporta Usman *et al.* [33] en el que utilizó la propiedad reductora del almidón para reducir óxido de grafeno (GO) y para reducir sales de plata para la producción de AgNps. Con respecto a la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos, reportaron menor actividad antimicrobiana cuando se evaluaron los nanocompuestos de GO y AgNps por separado, en comparación con el nanocompuesto que contenía ambos, ellos adjudican este aumento a un efecto sinérgico entre las AgNps y el GO.

Así mismo, se han reportado trabajos en donde se generan nanocompuestos de almidón con mejora en las propiedades de barrera al agua, como es el caso del reportado por Cheviron *et al.* [34]. En este trabajo reportan la preparación de los nanocompuestos de plata/montmorillonite/almidón por procedimientos verdes, preparados principalmente por dos métodos, el *ex situ* y el *in situ*. El método *ex situ* consistió en la formación de AgNps y posteriormente su dispersión en la matriz polimérica; en el método *in situ*, el precursor de las AgNps fue disuelto en la solución polimérica, en este método se logró la formación de las AgNps por el polímero. El método *ex situ* presentó desventajas ya que se originaron cluster de AgNps, no existió buena repartición de las AgNps en la matriz polimérica y además las AgNps obtenidas fueron más grandes y amorfas. Mediante los resultados de difracción de rayos X y TEM observaron una gran asociación de las AgNps y montmorillonite. El nanocompuesto plata/montmorillonite/almidón presentó menor captación de agua.

En trabajos dentro de la Universidad del Papaloapan ya se han obtenido biopelículas con almidón de plátano macho. Por ejemplo, Agüero Valdez [35] obtuvo películas biodegradables a base de almidón de plátano macho, probando la modificación química con ácido cítrico en el almidón para mejorar las propiedades mecánicas de las películas y películas de almidón de plátano macho incorporando nanoarcillas y nanopartículas.

IV. JUSTIFICACIÓN

Con base en lo anterior, la síntesis de AgNps utilizando extractos de plantas se considera una atractiva opción por ser amigable con el medio ambiente, aunque aún no se conoce con certeza los metabolitos que permiten la obtención de AgNps.

S. rebaudiana es una planta que contiene una gran cantidad de metabolitos reductores (fenoles, rebaudiósidos y esteviósidos), lo cual la hacen una buena candidata para obtener AgNps. Por otro lado, el inmovilizar las AgNps en biopelículas a base de almidón permitirá aprovechar la propiedad antimicrobiana que poseen y el potencial biodegradable que aporta el almidón. Este tipo de materiales podrían ser prometedores materiales de empaque o dispositivos médicos, ya que no permitirían la propagación de microorganismos y a su vez podrían degradarse en menor tiempo.

V. HIPÓTESIS

Algunos metabolitos o familias de metabolitos del extracto acuoso de *S. rebaudiana* son capaces de reducir sales de AgNO_3 y estabilizar AgNps. La temperatura, agitación, concentración y velocidad de incorporación de sales de AgNO_3 tiene efecto en la forma y tamaño de las AgNps.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Sintetizar AgNps a partir de extractos de *S. rebaudiana* e inmovilizarlas en almidón de plátano macho

6.2 Objetivos Específicos

- Obtener extractos de las hojas de *S. rebaudiana*
- Sintetizar AgNps utilizando extractos de *S. rebaudiana*
- Realizar su caracterización por espectrofotometría UV-Vis, FTIR y TEM
- Aislar el almidón de plátano macho
- Elaborar biopelículas con el almidón de plátano macho adicionando las AgNps
- Realizar la caracterización de las películas por difracción de rayos X, TGA y FTIR

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiales

En este trabajo se utilizaron hojas secas de *S. rebaudiana* y la sal AgNO_3 grado reactivo adquirida de la empresa Sigma-Aldrich. Para la elaboración de las películas se aisló el almidón de plátano macho de la variedad *Musa paradisiaca L.* en estado inmaduro proveniente de un huerto local de la zona del Papaloapan en Oaxaca. Como agente plastificante se utilizó glicerol grado reactivo adquirido de Sigma-Aldrich (densidad = 1.262 g/cm^3).

6.2. Desarrollo experimental

El trabajo se dividió en cuatro partes. Primero, se obtuvieron los extractos de las hojas secas de *S. rebaudiana*. Segundo, se realizó la síntesis de AgNps. Tercero, se aisló el almidón del plátano macho. Cuarto, se elaboraron las películas con AgNps. (**Figura 15**).

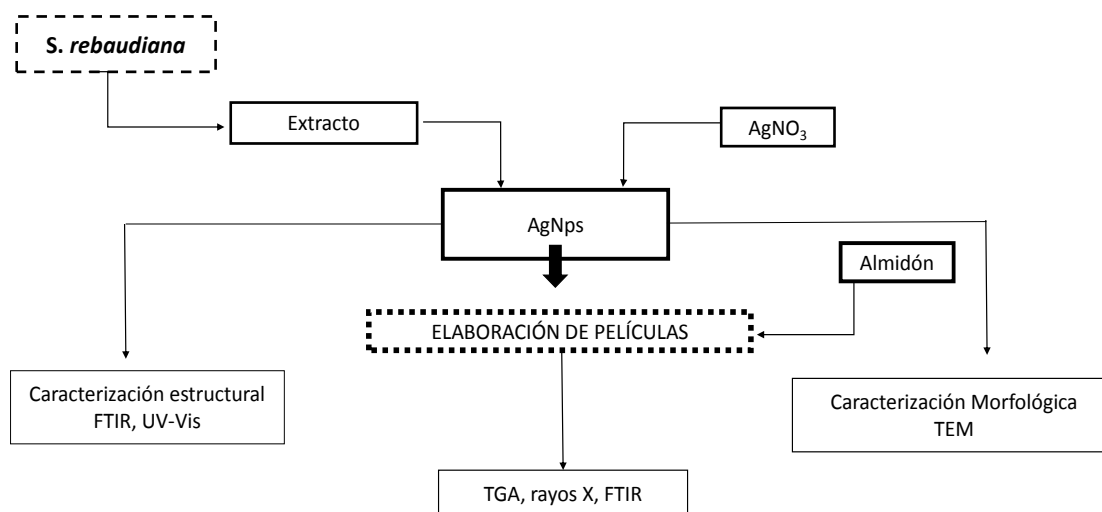


Figura 15. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.

6.2.1. Obtención de extractos

Los extractos de *S. rebaudiana* fueron obtenidos de la siguiente manera:

Extracto 1: 50 g de biomasa se adicionaron a 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Se mantuvo en agitación constante por un periodo de dos horas.

Extracto 2: 50 mL de agua destilada se calentaron a 90 °C, alcanzada la temperatura se adicionaron 50 g de biomasa, se dejó reposar hasta llegar a temperatura ambiente.

Ambos extractos fueron filtrados utilizando papel filtro, posteriormente fueron almacenados a -4 °C para su posterior uso.

6.2.2. Determinación de fenoles totales

Los extractos se resuspendieron en EtOH: H₂O (80:20 v/v). La mezcla de reacción consistió en 100 uL de extracto, 100 uL de H₂O, 1 mL de Folin-Ciocolteu (10%) (F9 252-sigma Aldrich) y 800 uL de Na₂CO₃. Se incubó por 60 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue leída a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se realizó una curva de calibración utilizando catequina como estándar (1251-sigma Aldrich). La concentración de fenoles totales fue expresada en mg de catequina/mg de extracto seco [36].

6.2.3. Determinación de flavonoides

Los extractos se resuspendieron en EtOH: H₂O (80:20 v/v). La mezcla de reacción consistió en 125 µL de extracto, 375 uL de EtOH, 25 uL de AlCl₃ (10%) (237078-sigma Aldrich), 25 uL de acetato de potasio (CH₃CO₂K) (1M) (P3542-sigma Aldrich) y 700 uL H₂O. Se incubó por 30 min a oscuridad y la absorbancia fue leída a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se realizó una curva de calibración utilizando rutina (78095-sigma Aldrich). La concentración de flavonoides totales fue expresada en mg de rutina/miligramo de extracto [37].

6.2.4. Síntesis de AgNps

Las AgNps fueron sintetizadas bajo la siguiente relación: 4.5mL de AgNO₃ y 0.5 mL extracto (**Tabla 2**).

Tabla 2. Códigos de reacción y códigos asignados a las síntesis de AgNps.

Código	[AgNO ₃] (mM)	Parámetros		
		Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Velocidad de incorporación del AgNO ₃ (gotas/min)
1S1	1	T _{amb}	-	-
1S2	1	80	-	-
1S3	1	80	-	1
1S4	1	80	500	-
1S5	1	T _{amb}	500	1
1S6	1	80	500	1
1S7	1	80	500	2
1S8	1	T _{amb}	-	1
3S1	3	T _{amb}	-	-
3S2	3	80	-	-
3S3	3	80	-	1
3S4	3	80	500	-
3S5	3	T _{amb}	500	1
3S6	3	80	500	1
3S7	3	80	500	2
3S8	3	T _{amb}	-	1

T_{amb} = temperatura ambiente

6.2.5. Aislamiento del almidón de plátano macho

Los plátanos en estado inmaduro se lavaron con abundante agua, se pelaron y se cortaron en rodajas, se sumergieron en una solución de ácido cítrico (3g/L). Posteriormente, las rodajas se molieron en una licuadora industrial, el producto obtenido se tamizó en mallas No. 50, No. 100. Se dejó sedimentar por 12 horas y se desechó el sobrenadante (por triplicado). Los sólidos se secaron en un horno marca Scorpion Scientific modelo A62060 a una temperatura de 40 °C por 48 horas. El polvo se tamizó en una malla No. 100 y se almacenó herméticamente a temperatura ambiente [38].

6.2.6. Elaboración de biopelículas

La elaboración de las biopelículas se realizó por el método de casting de acuerdo a la metodología propuesta por Agüero Valdez (2012) con algunas modificaciones [35]. La mezcla de los componentes se realizó de la siguiente manera: Agua, AgNps y glicerol (25 % p/p con respecto al almidón) en agitación a 400 rpm durante 30 minutos utilizando

una mezcladora mecánica IKA RW20 Digital, modelo RW 20 D S1, con una propela de altos esfuerzos cortantes (4 dientes alternados hacia arriba y hacia abajo). Posteriormente, se adicionó almidón a la mezcla por otros 30 minutos. Pasando los 30 minutos se incrementó la temperatura a 85 °C y la agitación a 800 rpm y se mantuvo la mezcla de reacción durante otros 30 minutos. El producto obtenido fue vaciado en recipientes antiadherentes y secado a T = 50 °C durante 6 h. Una vez que las películas se secaron fueron colocadas en un desecador con una humedad relativa del 57 % utilizando para ello una solución de una solución de NaCl, las películas se etiquetaron de la siguiente manera (Tabla 3).

Tabla 3. Códigos asignados a las biopelículas.

Código	Componentes	Código	Componentes
Nativa	Almidón	P/1mM	Almidón /AgNO ₃ (1mM)
P/Extracto	Almidón/Extracto	P/3mM	Almidón /AgNO ₃ (3mM)
P/1S1	Almidón /1S1	P/3S1	Almidón /3S1
P/1S2	Almidón /1S2	P/3S2	Almidón /3S2
P/1S3	Almidón /1S3	P/3S3	Almidón /3S3
P/1S4	Almidón /1S4	P/3S4	Almidón /3S4
P/1S5	Almidón /1S5	P/3S5	Almidón /3S5
P/1S6	Almidón /1S6	P/3S6	Almidón /3S6
P/1S7	Almidón /1S7	P/3S7	Almidón /3S7
P/1S8	Almidón /1S8	P/3S8	Almidón /3S8
P/C	Almidón /AgNps comerciales		

6.2.7 Caracterización de las AgNps y películas Almidón/AgNps

La caracterización estructural y morfológica de las AgNps y de las películas almidón/AgNps fue realizada por las siguientes técnicas.

6.2.7.1 Espectroscopía ultra violeta-visible (UV-Vis)

Las propiedades ópticas de las AgNps fueron estudiadas con esta técnica. Los espectros fueron obtenidos en un Espectrofotómetro UV Vis GENESYS™ 10S, Thermo Fisher y en el espectrofotómetro Cary 5000 UV-Vis-NIR en el rango de 800nm-200nm.

6.2.7.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica se utilizó para la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos y en las películas almidón/AgNps. Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro DYNASCAN modelo Spectrum 100, Perkin Elmer. Los espectros fueron obtenidos en un rango de 4000 cm^{-1} - 500 cm^{-1} .

6.2.7.3 Difracción de rayos-X (DRX)

Las propiedades cristalinas de las películas almidón/AgNps fueron obtenidas en un difractor de rayos X marca Bruker Axs, modelo D8 Advance. Utilizando 30 mA y 40 kV.

6.2.7.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El comportamiento térmico de las películas almidón/AgNps fue analizado en el equipo de análisis termogravimétrico modelo TGA-50, Shimadzu; en un rango de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

6.2.7.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización morfológica y cristalina de las AgNps fue analizada en el Microscopio electrónico de Transmisión FEI-Titán G2 80-300 con resolución de 0.7 \AA .

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de *Stevia rebaudiana*

Las hojas secas y molidas hasta polvo de *S. rebaudiana* fueron caracterizadas por TGA y FTIR. Este estudio nos permite conocer las etapas de degradación y las características estructurales de los metabolitos del polvo de *S. rebaudiana*.

La **Figura 16** muestra el análisis termogravimétrico de *S. rebaudiana*.

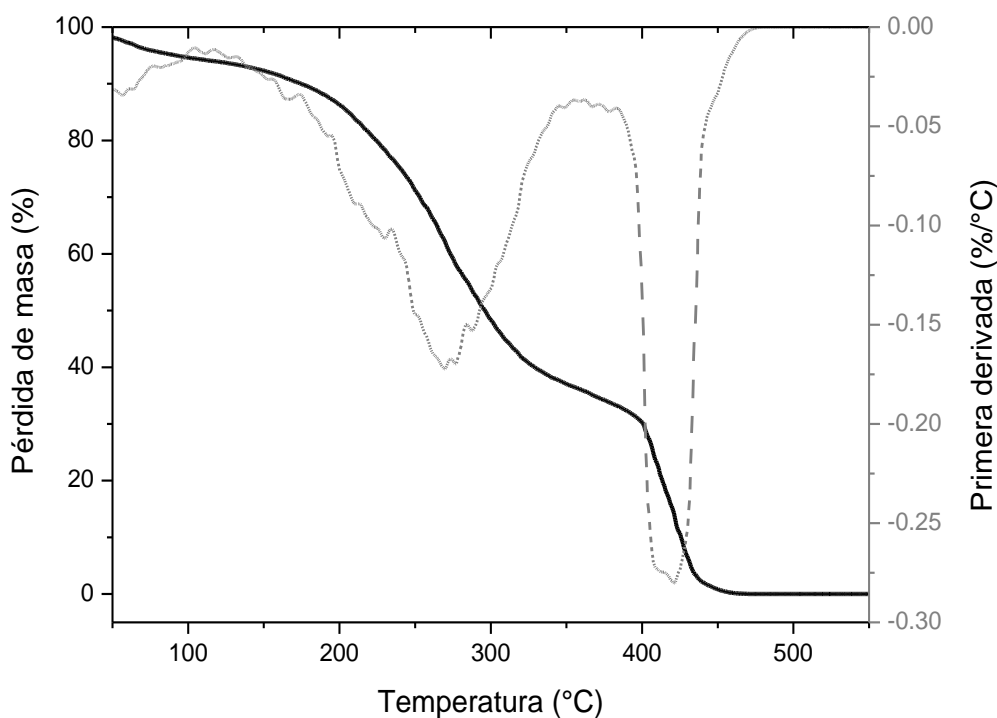


Figura 16. Termograma de pérdida de peso de *S. rebaudiana*.

El termograma de la **Figura 16** muestra 3 etapas de degradación. La primera etapa se encuentra antes de los 100 °C que corresponde a la pérdida de agua y de algunos metabolitos con bajo punto de ebullición. Posteriormente, se observa la segunda etapa de degradación entre 116 °C y 344 °C que representa aproximadamente el 45 % de la masa del polvo de *S. rebaudiana*. La última etapa de degradación entre 382 °C y 467 °C representa alrededor del 26 %. Estas dos últimas etapas se asocian a la descomposición térmica de glucósidos de esteviol de diferente punto de ebullición. De acuerdo a la

primera derivada del termograma, se observa que la temperatura de degradación máxima de la primera etapa se encuentra en 57 °C, de la segunda etapa en 269 °C y de la tercera etapa en 421 °C.

La temperatura es un factor importante para la extracción de metabolitos. Su concentración puede ser menor en una extracción realizada sin temperatura por dos razones principalmente. Una de ellas se debe a que no se logran romper las membranas celulares que los contienen y otra es porque algunos compuestos son solo solubles en caliente. Sin embargo el uso de la temperatura se encuentra limitado porque puede provocar la descomposición térmica de algunos compuestos. De acuerdo al termograma (**Figura 16**), la mayoría de los metabolitos presentes en la planta no sufrieron una descomposición térmica durante la extracción acuosa a temperatura de 90 °C y durante la síntesis de AgNps realizada a 80 °C, ya que las temperaturas de degradación de los metabolitos se encuentran por encima de estas temperaturas (etapas de degradación 2 y 3 del termograma).

La **Figura 17** muestra el espectro FTIR del polvo de *S. rebaudiana*.

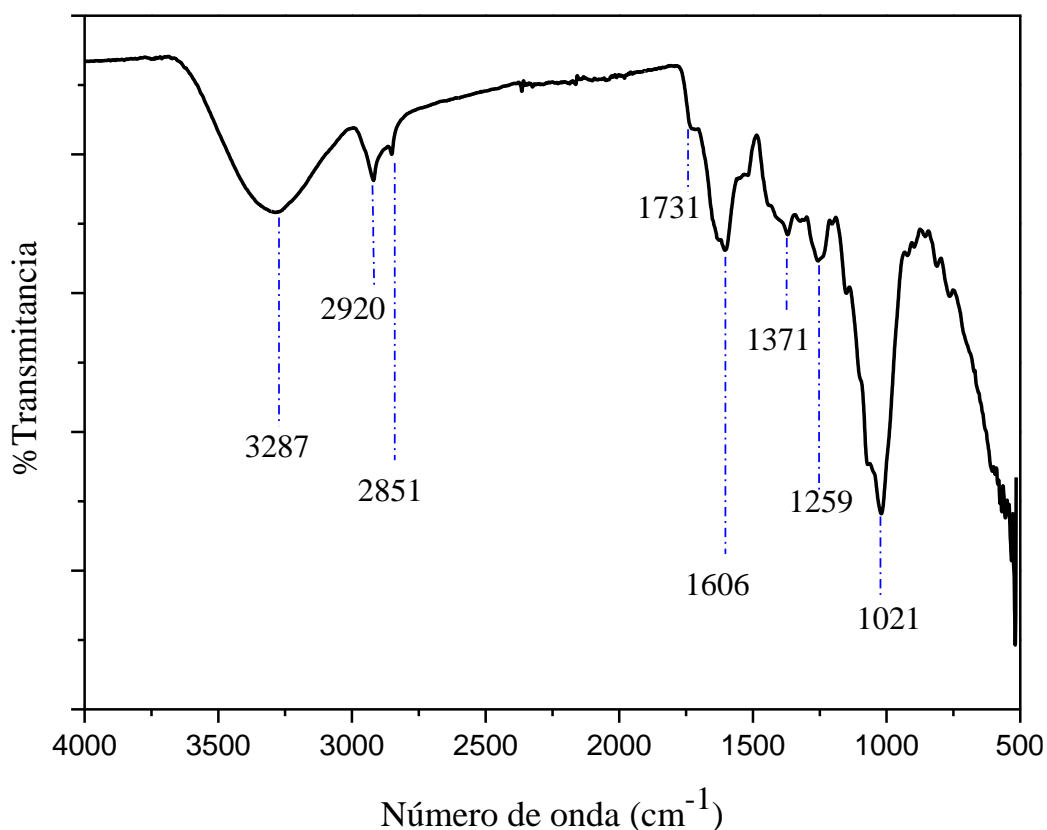


Figura 17. Espectro FTIR del polvo de *S. rebaudiana*.

El espectro muestra señales de vibración de alargamiento O-H (3287 cm^{-1}), vibración sp^3 C-H (2920 cm^{-1} , 2851 cm^{-1}), C=O (1731 cm^{-1}), anillo aromático (1606 cm^{-1}), vibración de flexión -CH₃ (1371 cm^{-1}), C-O (1259 cm^{-1}), -CH₂ (1021 cm^{-1}). La síntesis de AgNps a partir de extractos de plantas requiere de la presencia de grupos funcionales reductores y estabilizantes. Dado que las hojas de *S. rebaudiana* poseen metabolitos como polifenoles y glucósidos diterpénicos con una alta polaridad, solubles en agua, estos grupos funcionales oxigenados se deben a la presencia de hidroxilos, aldehídos y cetonas con alto poder reductor, estas señales se encontraron presentes en el espectro.

En el siguiente apartado se analizan los extractos a temperatura ambiente y a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Los metabolitos secundarios de las plantas poseen propiedades termodinámicas diferentes; esto permite que por efecto de la temperatura algunos sean más activos que otros, o incluso ser susceptibles a ebullición con facilidad. La razón por la cual se decidió trabajar a $80\text{ }^\circ\text{C}$ (extracto 2) fue para mantener a los metabolitos en todo el proceso de la reacción sin posibilidades de ebullición.

7.2 Caracterización de los extractos de *Stevia rebaudiana*

La caracterización por FTIR de los dos extractos de *S. rebaudiana* se muestra en la **Figura 18**. En el rango de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} las señales corresponden a las vibraciones de estiramiento sp^3 C-H de metilenos (2926 cm^{-1} vibración asimétrica, 2853 cm^{-1} vibración simétrica) para ambos extractos. Sin embargo en el espectro del extracto 1 se presenta una pequeña inflexión en 2850 cm^{-1} que pertenece a la vibración de estiramiento C-H de aldehído (**Figura 18a**). Esta inflexión no se logra percibir con facilidad en el extracto 2 porque se encuentra solapada, ya que su área de pico es casi el doble del área de pico del extracto 1. Las vibraciones C-H de metinos (2890 cm^{-1}) y de metilos (2962 cm^{-1} , 2872 cm^{-1}) se encuentran solapadas en ambos casos. En el rango que va de 1760 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} se observa muy clara la señal del grupo carbonilo (1720 cm^{-1}) en el espectro del extracto 1 (**Figura 18b**). La señal indicada con el número 1 para ambos perfiles aparece en 1606 cm^{-1} y corresponde a la vibración de los anillos aromáticos. Las señales indicadas con los números 2 y 3 corresponden a un traslape de las vibraciones de flexión C-O-H que abarcan el rango 1440 cm^{-1} - 1220 cm^{-1} y de las vibraciones de flexión C-H de metilos y metilenos que abarcan la región entre 1500

cm^{-1} - 1200 cm^{-1} . Para el caso de la región de 1200 cm^{-1} a 750 cm^{-1} aparecen dos picos solapados que se encuentran en 1070 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} . Ambas señales incrementaron su área de pico a casi el doble por efecto de la temperatura. La tendencia de estos picos fue distinta; en el extracto 2 la señal en 1030 cm^{-1} fue más intensa, mientras que en el extracto 1 la más intensa fue la señal que se encuentra en 1070 cm^{-1} (**Figura 18f**). Esto quiere decir que la temperatura favorece la extracción de los grupos funcionales que absorben en 1030 cm^{-1} , entre ellos está el grupo funcional alcohol ya que según el grado de sustitución las señales pueden aparecer en esta región. Mientras menos sustitución exista en los grupos funcionales alcohol, la señal va a decrecer desde los 1220 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} . Por otro lado en esta zona también aparecen las vibraciones de deformación de los metilenos.

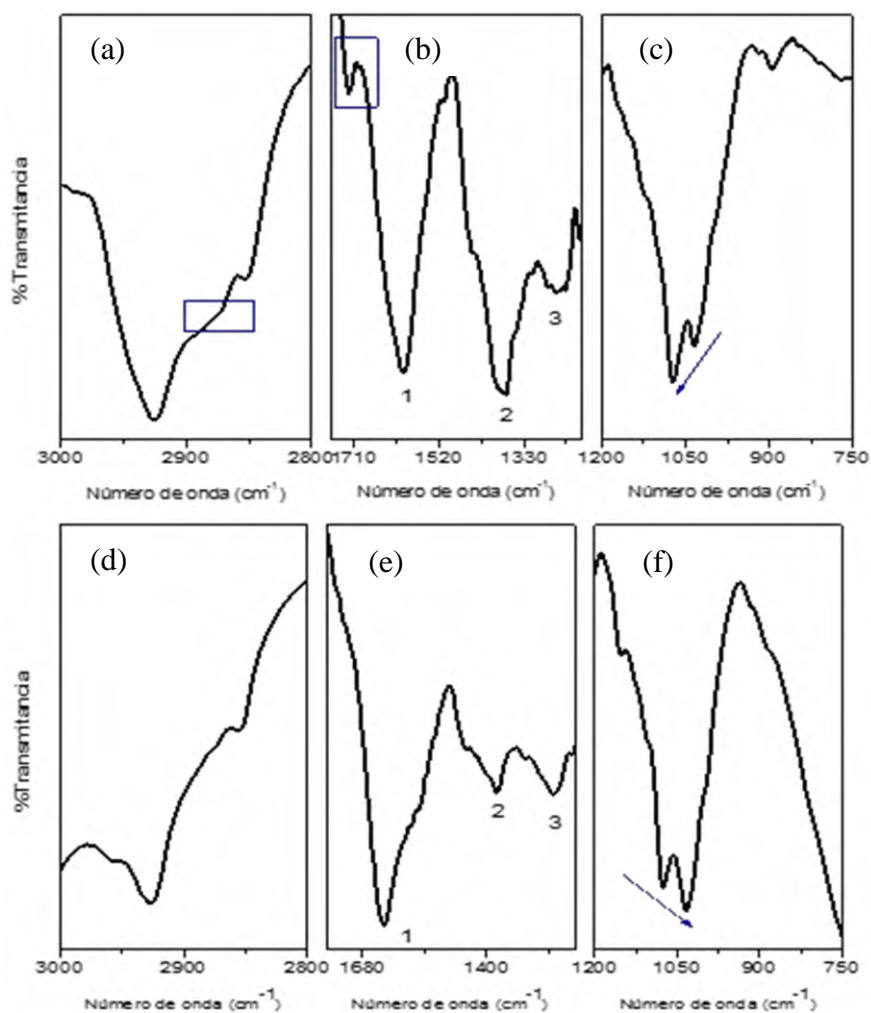


Figura 18. Espectros FTIR de los extractos de *S. rebaudiana*: extracto 1 (a-c), extracto 2 (d-f).

La **Tabla 4** muestra las áreas de algunas zonas mostradas en el espectro de la **Figura 18**.

Tabla 4. Área de zonas de las señales mostradas en los espectros de los extractos.

Rango (cm ⁻¹)	Área de pico	
	Extracto 1	Extracto 2
3000-2800	1110	2522
1760-1200	5301	13670
1200-750	6011	15520

Con lo anterior, se puede considerar que al mostrar señales menos solapadas y con áreas de pico mucho menor en el extracto 1 en comparación con las del extracto 2, existe mayor cantidad de metabolitos en el extracto 2 que en el 1.

7.2.1 Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se realizó una curva de calibración en el rango de 0-40 µg catequina (**Figura 19**).

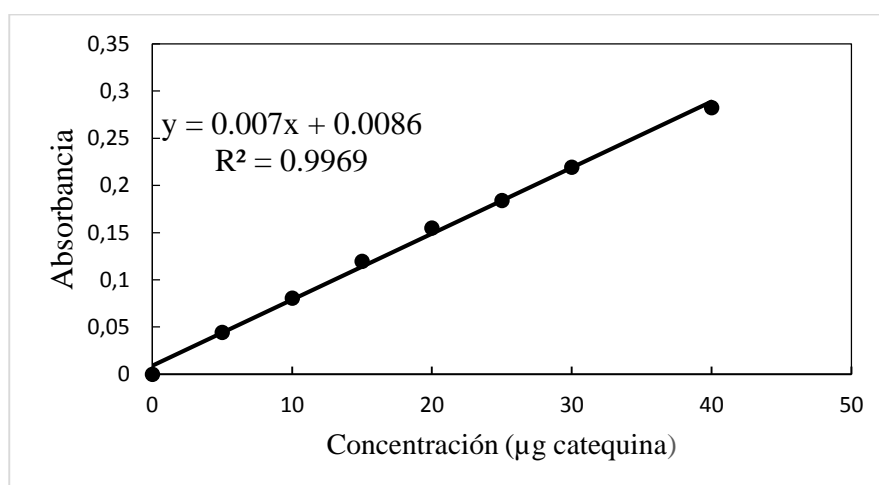


Figura 19. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.

La **Tabla 5** muestra los resultados de la cuantificación de fenoles totales.

Tabla 5. Cuantificación de fenoles totales en los extractos

Extracto	Absorbancia	Concentración de catequina (µg)	Concentración de fenoles (mg catequina/g extracto seco)
1	0.1050	13.77	299.37
2	0.1740	23.62	450.92

De acuerdo a los resultados, el extracto 2 fue el que presentó mayor contenido de fenoles totales con 450.92 mg catequina/g extracto seco.

7.2.2. Determinación de flavonoides

Mediante la curva de calibración realizada con el estándar rutina en un rango de 0-5 μg rutina se cuantificó el contenido de flavonoides (**Figura 20**). El extracto 2 nuevamente fue el que tuvo mayor concentración con un total de 0.94 mg rutina/g extracto seco (**Tabla 6**).

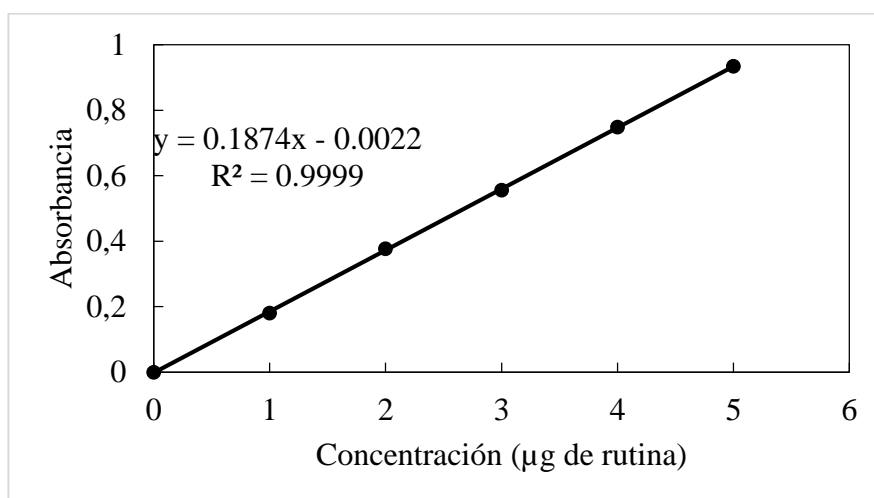


Figura 20. Curva de calibración para la determinación de flavonoides.

Tabla 6. Cuantificación de flavonoides en los extractos

Extracto	Absorbancia	Concentración de rutina (μg)	Concentración de flavonoides (mg rutina/g extracto seco)
1	0.6250	3.34	0.72
2	0.9220	4.93	0.94

De acuerdo a los resultados anteriores, el extracto 2 presentó mayor contenido de flavonoides, fenoles totales y bandas más intensas en su espectro FTIR de los grupos funcionales oxigenados, lo cual implica que el método de extracción 2 es más eficiente que el método 1. Dado que se considera a los polifenoles como prometedores agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de AgNps, el extracto 2 se eligió para ser

utilizado como agente reductor de las sales de AgNO_3 en la formación de AgNps, lo cual se muestra en el siguiente apartado.

7.3 Análisis de los productos de reacción en la síntesis de AgNps

Antes de realizar la síntesis de AgNps se caracterizó el extracto 2 y la sal precursora de AgNO_3 por FTIR y espectrofotometría UV-Vis. Los resultados de FTIR de la sal y del extracto 2 también pueden analizarse a partir de su primera derivada (**Figura 21**), ya que de esta manera pueden observarse pequeños cambios en el perfil de las señales y discutir mejor la participación de los grupos funcionales en la síntesis.

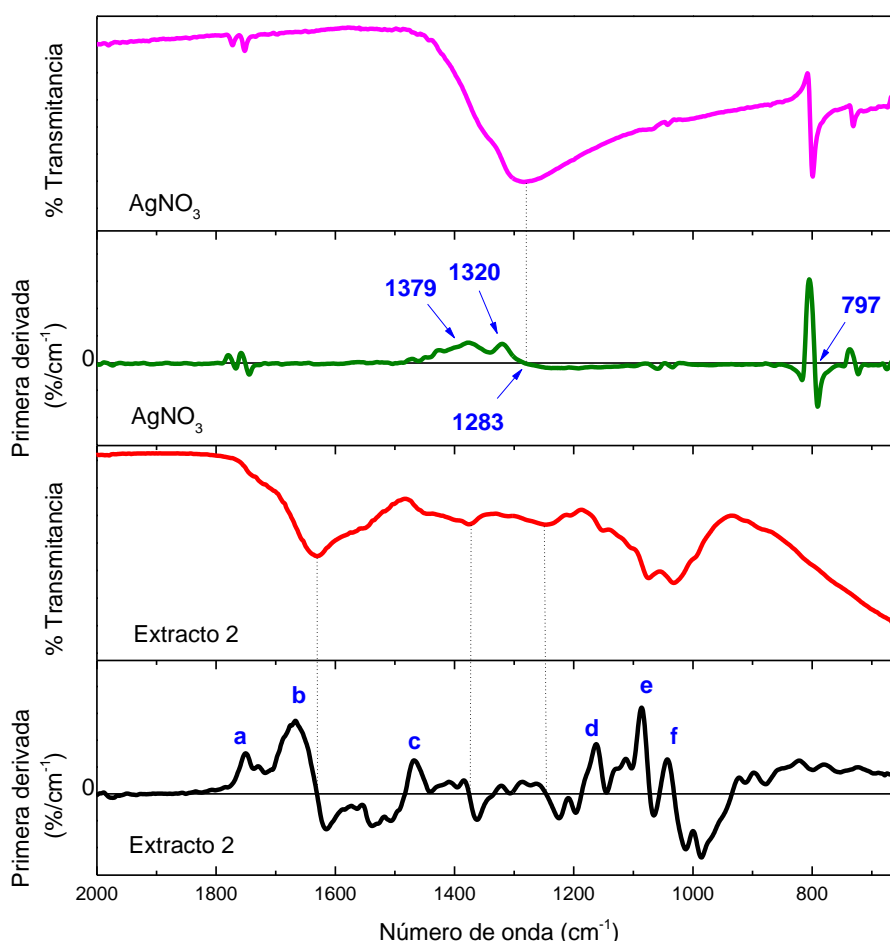


Figura 21. Primera derivada de los espectros FTIR de la sal de plata y del extracto 2.

En el caso del AgNO_3 , la primera derivada presenta cambios de pendiente en 1379 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} y 804 cm^{-1} la cuales corresponden a las regiones donde vibran los enlaces del ión nitrato. Para el extracto 2 son seis cambios de pendiente que se señalan, y pertenecen a los principales grupos funcionales indicados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Principales grupos funcionales de la primera derivada del espectro FTIR en el extracto 2.

	Señal	Grupo funcional
a	1751 cm^{-1}	Carbonilo
b	1668 cm^{-1}	Fenil
c	1467 cm^{-1}	Metileno, metilo
d	1161 cm^{-1}	C-O
e	1084 cm^{-1}	C-OH
f	1042 cm^{-1}	C-OH

La **Figura 22** muestra los resultados de espectrometría UV-Vis de la sal de plata y del extracto 2. El espectro del AgNO_3 presentó una banda estrecha en 300 nm que corresponde a la plata iónica. El espectro del extracto presentó absorciones en 674 nm y múltiples absorciones en el rango de 300 a 450 nm.

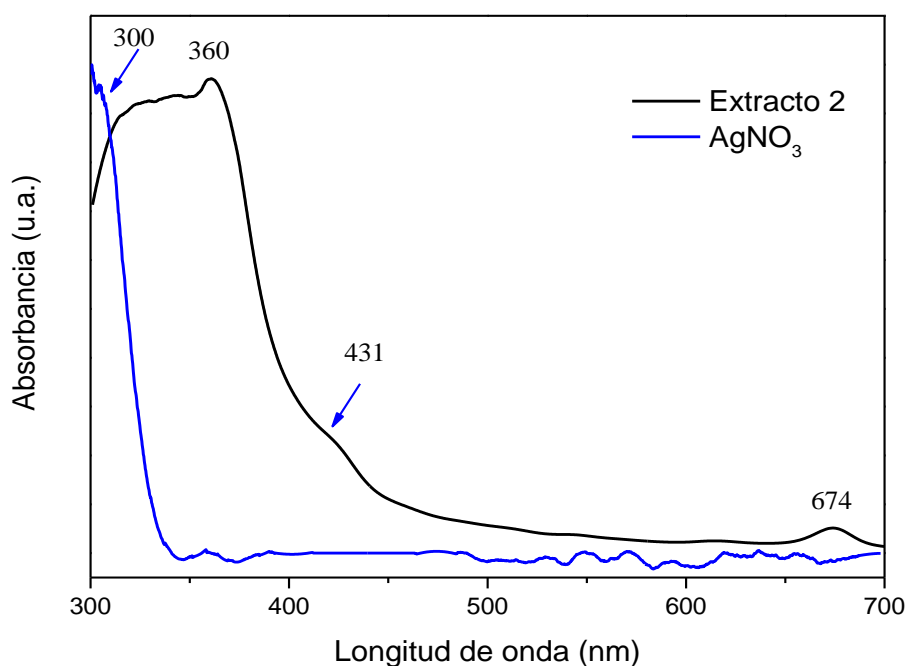


Figura 22. Espectros UV-Vis del AgNO_3 y extracto 2.

7.3.1 Avance de reacción

Cuando las nanopartículas de Ag interactúan con la luz visible presentan un comportamiento óptico muy interesante llamado resonancia de plasmón. La resonancia de plasmón es la oscilación colectiva de los electrones superficiales que da como resultado un comportamiento colorimétrico que es perceptible al ojo humano y que varía

de acuerdo a la morfología. Se ha reportado en diferentes trabajos el empleo de este comportamiento para conocer el progreso de la reacción y con ello la formación de nanopartículas de Ag [14, 29, 39]. A continuación se muestra el avance de reacción de los sistemas con 1 mM y 3 mM de la sal precursora y con los parámetros de síntesis (T: temperatura, VA: velocidad de agitación y VI: velocidad de incorporación de AgNO_3) indicados en la **Tabla 2**.

La **Figura 23** muestra las fotos de la reacción del sistema 1S3 (T = 80 °C, VA = 0 rpm y VI = 1 gota/min). La reacción comenzó cuando el extracto alcanzó los 80°C y se inició la incorporación lenta del AgNO_3 por goteo. Se puede apreciar que existe un cambio en la coloración a café oscuro a partir de los 35 minutos de reacción y este fue aumentando de intensidad hasta los 90 min.

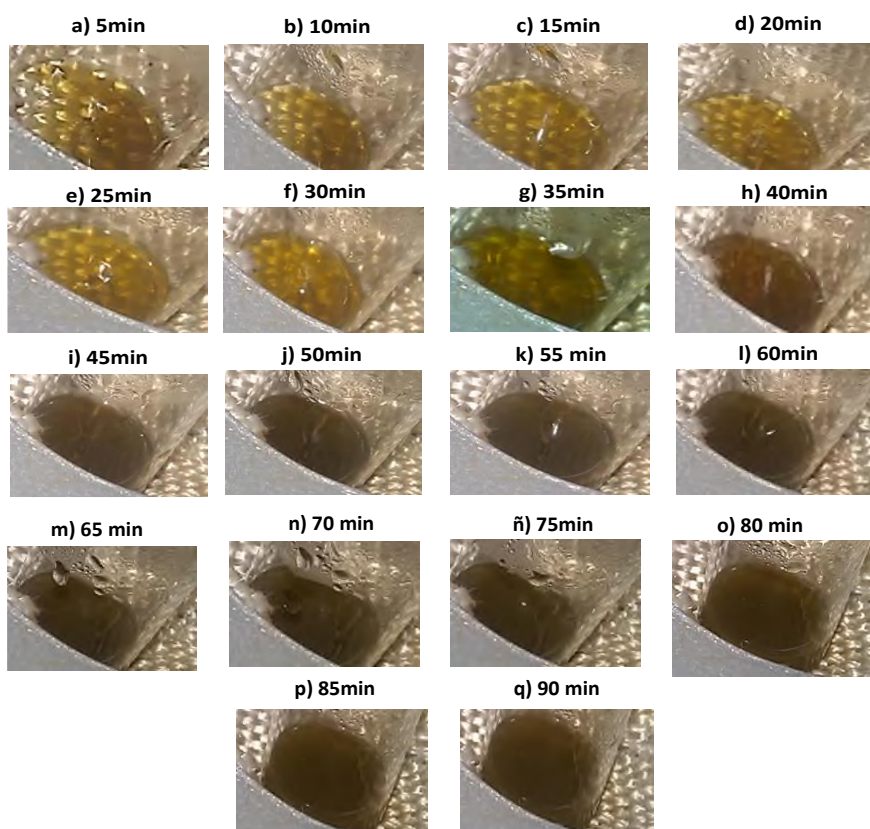


Figura 23. Formación de AgNPs en el sistema 1S3.

La **Figura 24** muestra las fotos de la reacción del sistema 1S4 (T = 80 °C, VA = 500 rpm y VI = inmediata). Dado que en este sistema el precursor metálico no se agrega lentamente (goteo), la reacción comenzó con la incorporación rápida del AgNO_3 una vez que el extracto alcanzó los 80 °C. Como se puede apreciar en la figura, a partir de los 25

min existe un cambio en el color, pasando de un color café claro a un color amarillo brillante.

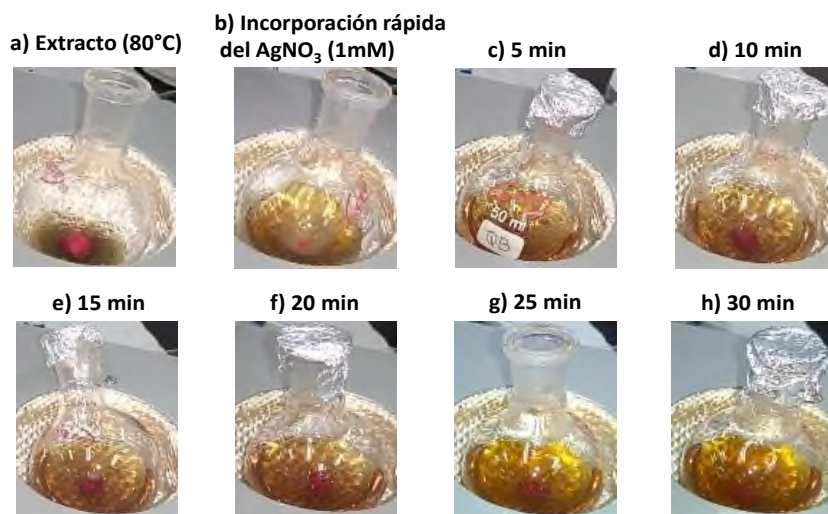


Figura 24. Formación de AgNps en el sistema 1S4.

El sistema 1S5 (T = amb, VA = 500 rpm y VI = 1 gota/min) mostrado en la **Figura 25** no muestra cambios en el color o tonalidad del color a medida que avanza el goteo.

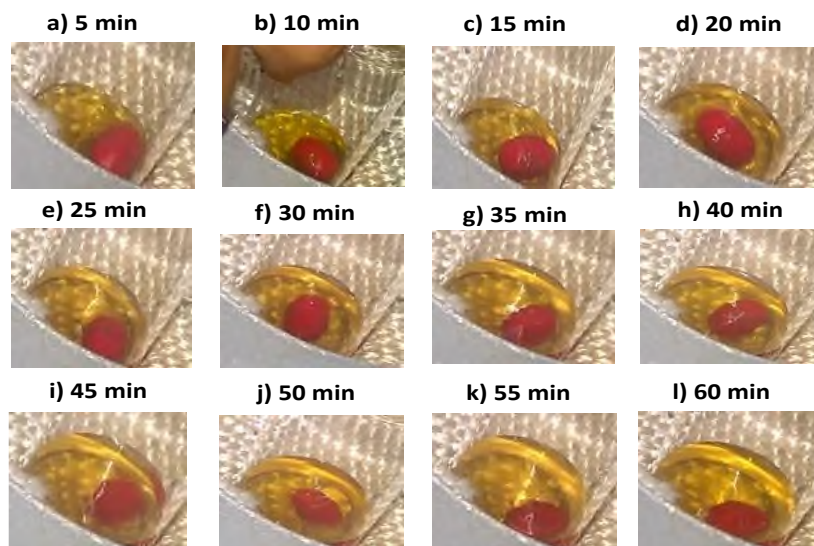


Figura 25. Formación de AgNps en el sistema 1S5.

La **Figura 26** muestra las fotos del sistema 1S6 (T = 80 °C, VA = 500 rpm y VI = 1 gota/min). La reacción comenzó cuando el extracto alcanzó los 80 °C y se inició la incorporación lenta del AgNO₃ por goteo. Se puede apreciar que existe un cambio en la

coloración a café oscuro a partir de los 30 minutos de reacción y este fue aumentando de intensidad hasta los 90 min.

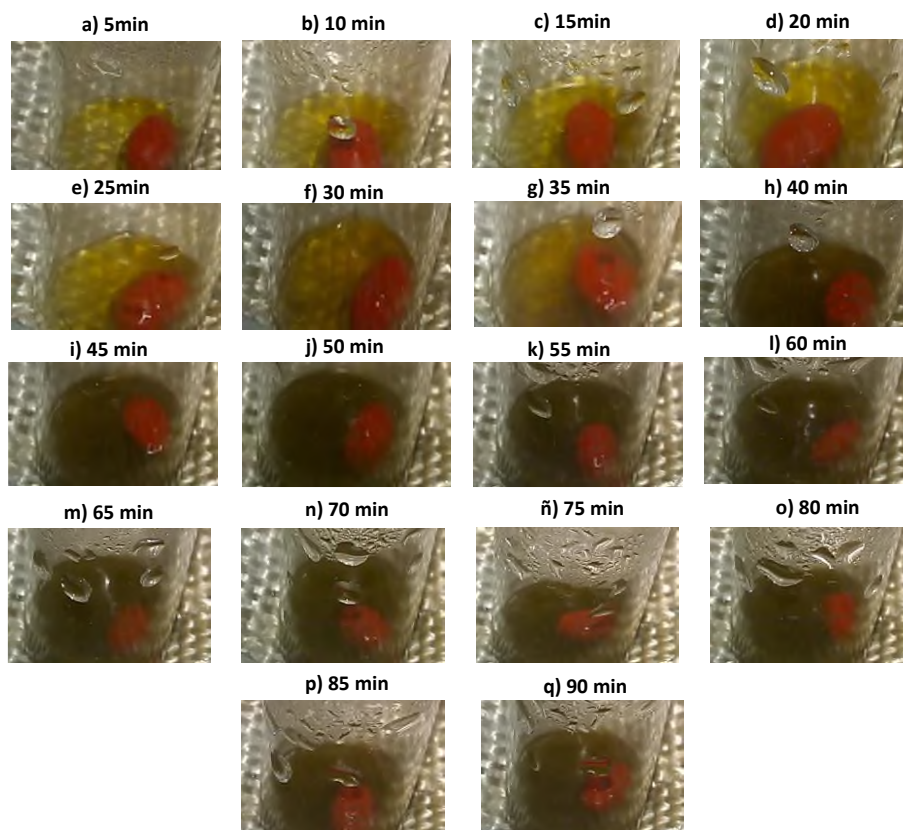


Figura 26. Formación de AgNps del sistema 1S6.

El sistema 1S8 ($T = \text{amb}$, $VA = 0$ y $VI = 1$ gota/min) mostrado en la **Figura 27** no muestra un cambio drástico en el color. No obstante, se aprecia un cambio en la tonalidad hacia un amarillo más claro y brillante a medida que se incrementa el goteo del precursor metálico.

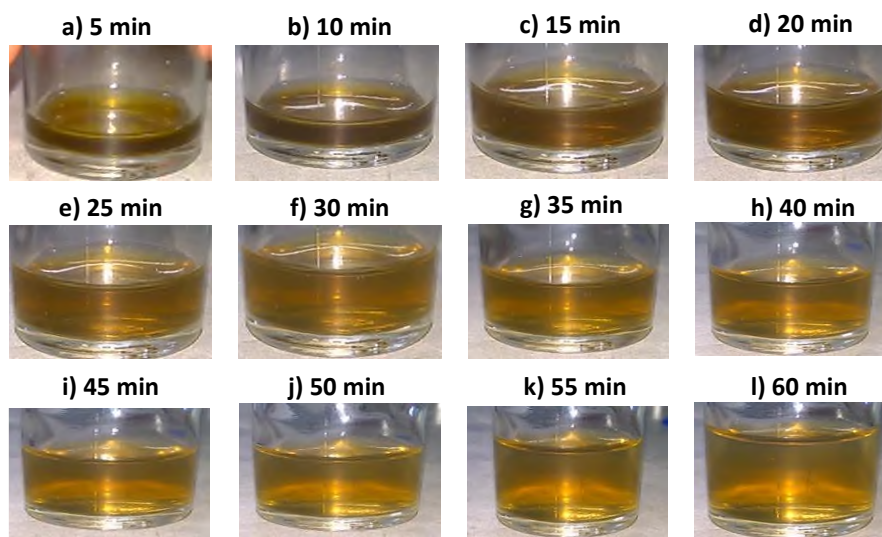


Figura 27. Formación de AgNps del sistema 1S8.

Contrariamente con los sistemas anteriores, el sistema 3S2 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 0$ y $VI = \text{inmediata}$) mostrado en la **Figura 28** presenta un cambio evidente de color a partir de los 10 min de reacción, después de la incorporación rápida de la sal de plata y va aumentando de intensidad conforme avanza el tiempo de reacción, hasta tonalidades oscuras. Los cambios de color de claro a oscuro pueden estar relacionados con la morfología y tamaño de las nanopartículas formadas.

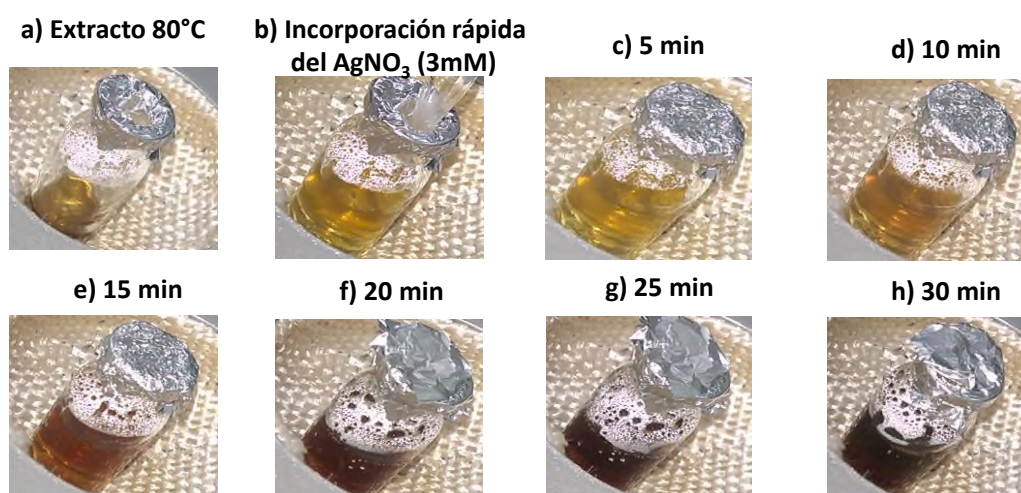


Figura 28. Formación de AgNps en el sistema 3S2.

La **Figura 29** muestra las fotos del avance de reacción del sistema 3S3 ($T = 80$ °C, $VA = 0$ rpm y $VI = 1$ gota/min). La reacción comenzó cuando el extracto alcanzó los 80 °C y se inició la incorporación lenta del $AgNO_3$ por goteo. Se puede apreciar que existe un cambio en la coloración más oscura a partir de los 25 minutos de reacción y este fue aumentando de intensidad hasta los 90 min.

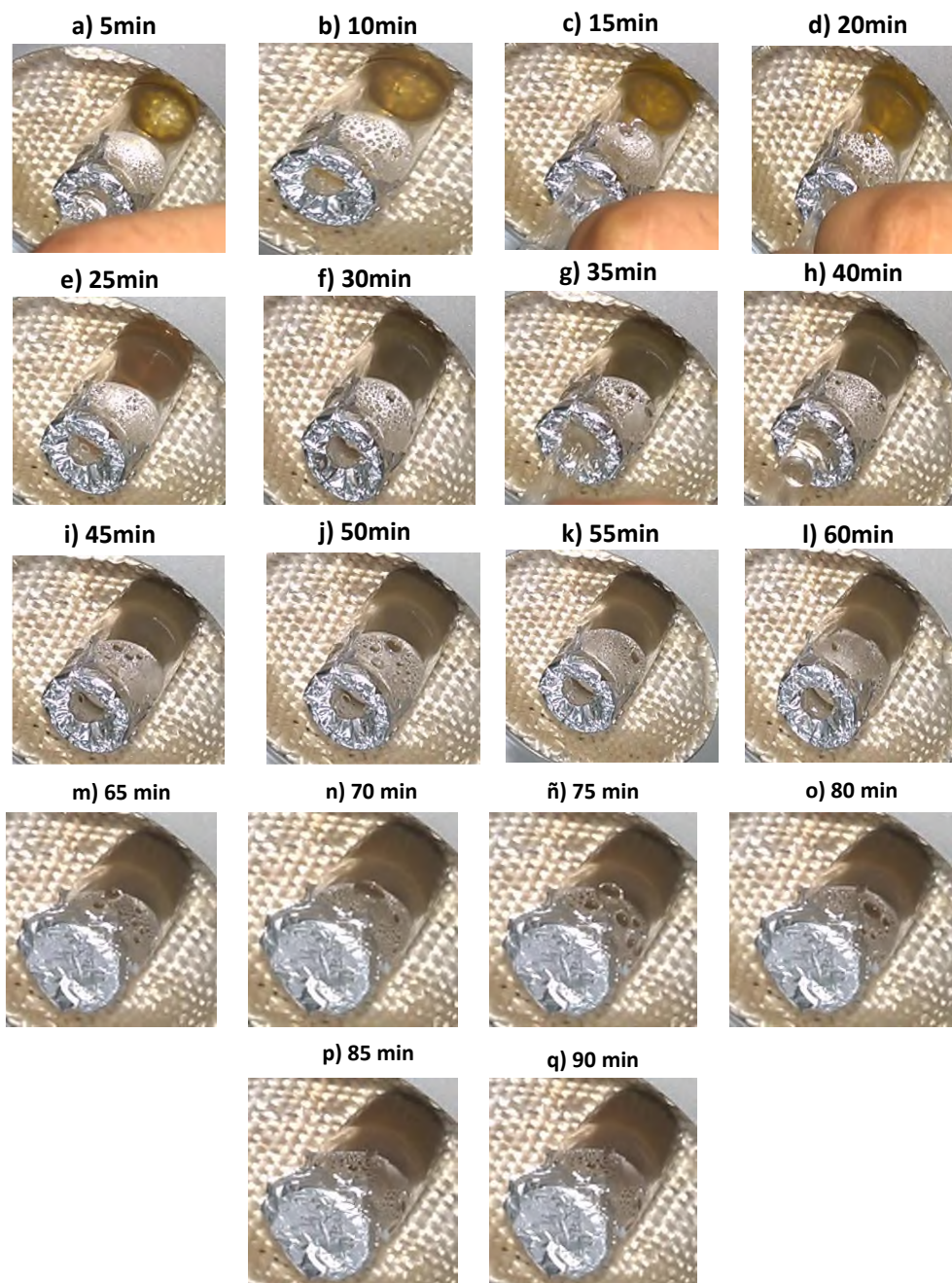


Figura 29. Formación de AgNps en el sistema 3S3.

La **Figura 30** muestra las fotos del avance de reacción del sistema 3S4 ($T = 80$ °C, $VA = 500$ rpm y $VI =$ inmediata). La reacción comenzó cuando el extracto alcanzó los 80 °C y se inició la incorporación rápida del $AgNO_3$. Se puede apreciar que a los 5 min hay un cambio en la coloración de café a un color amarillo brillante; además, a partir de los 15 min el color es ahora rojizo y va aumentando de intensidad conforme avanza la reacción.

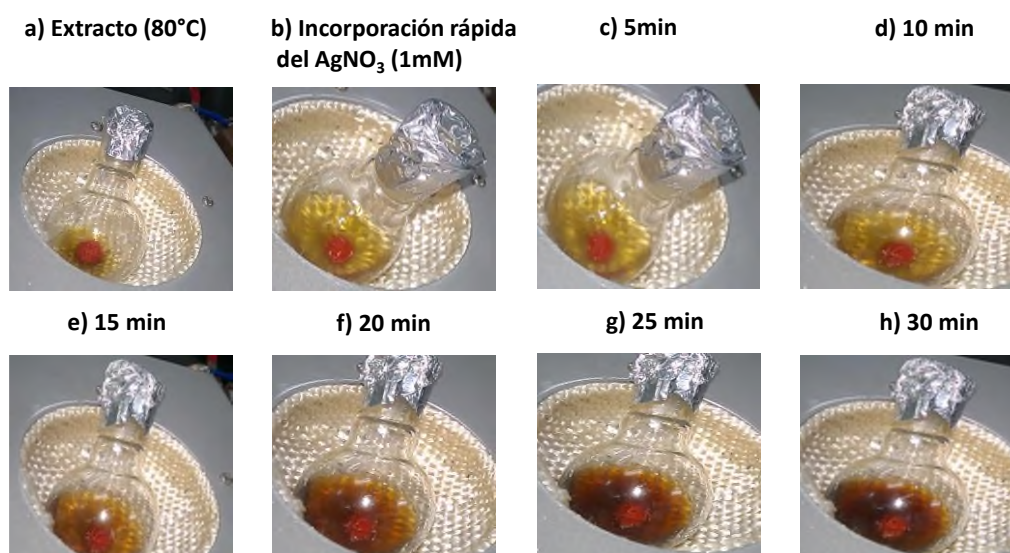


Figura 30. Formación de AgNps en el sistema 3S4.

En el sistema 3S5 ($T = amb$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min) mostrado en la **Figura 31** durante todo el proceso de goteo no hay cambios de color, los cambios de tonalidad comienzan a partir de los 70 min de reacción. En este periodo de tiempo, el agregado de la sal de plata (goteo) ya había finalizado. El color del sistema al término de la reacción es rojizo.

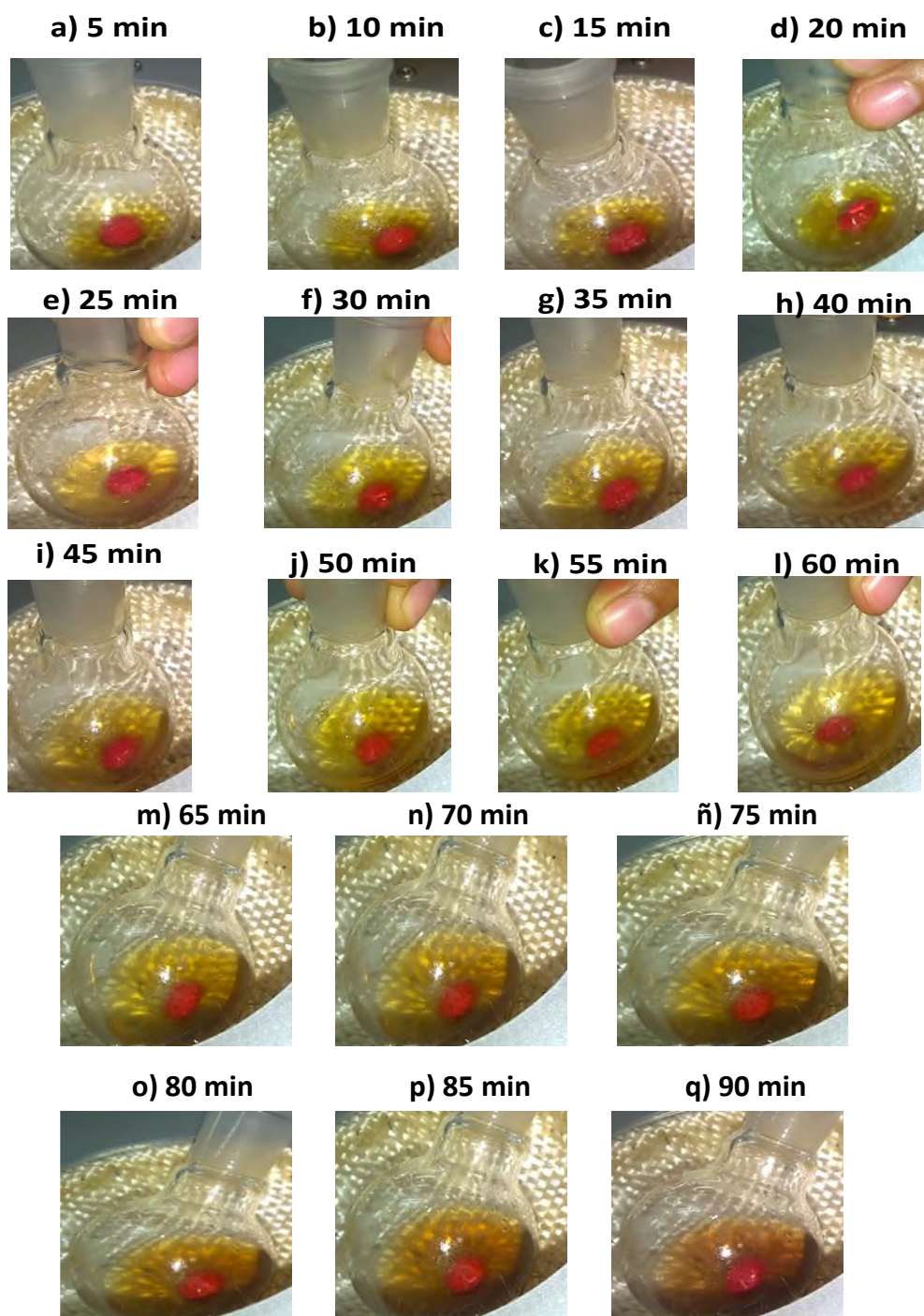


Figura 31. Formación de AgNps en el sistema 3S5.

En el caso de 3S6 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min) mostrado en la **Figura 32**, a partir de las 20 min se observa el cambio de color y se vuelve cada vez más oscuro a medida que avanza la reacción. Evidencia de formación de nanopartículas de plata.

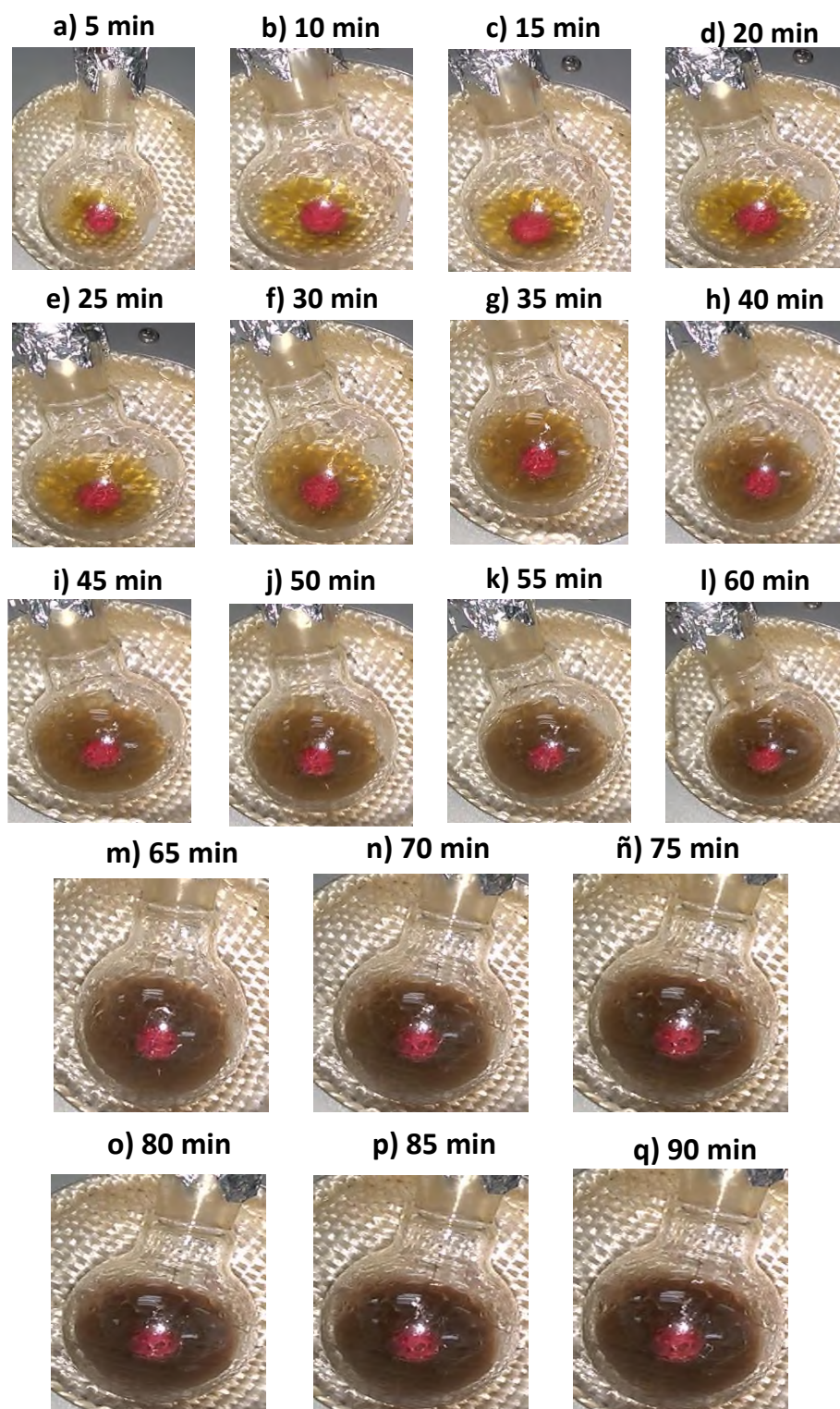


Figura 32. Formación de AgNps en el sistema 3S6.

En el sistema 3S7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 2$ gota/min) mostrado en la **Figura 33**, hasta los 20 min comienza a presentarse un cambio de tonalidad y después a partir de los 35 min de reacción el color se vuelve oscuro.

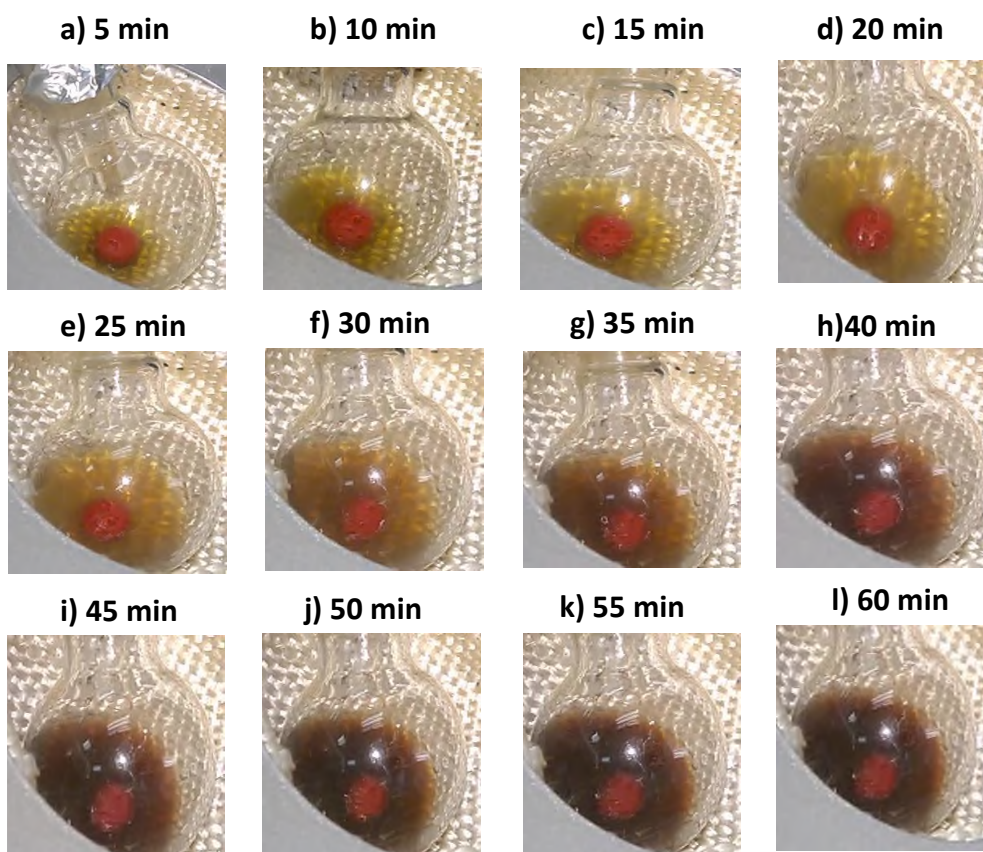


Figura 33. Formación de AgNps en el sistema 3S7.

La **Figura 34** muestra las fotos del avance de reacción del sistema 3S8 ($T = \text{amb}$, $VA = 0 \text{ rpm}$ y $VI = 1 \text{ gota/min}$) donde se puede apreciar que no existe un cambio drástico en el color. No obstante, se aprecia un cambio en la tonalidad hacia un amarillo más claro y brillante a medida que se incrementa el goteo del precursor metálico.

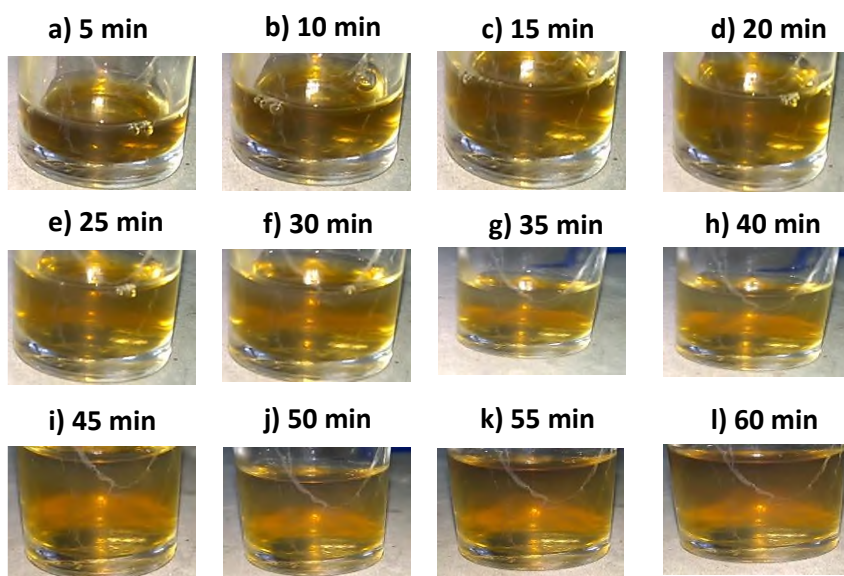


Figura 34. Formación de AgNPs en el sistema 3S8.

De acuerdo a los resultados anteriores, los parámetros que más influyen en el progreso de la reacción, suponiendo la formación de nanopartículas son la temperatura y la velocidad de incorporación de la sal metálica, el cambio de amarillo claro a oscuro son muy evidentes en las reacciones con temperatura y con goteo. Comparando los sistemas 3S6 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min) y 3S7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 2$ gota/min), cuya diferencia es la velocidad de goteo, los resultados mostrados en las **Figuras 32** y **33** evidencian que a menor velocidad de goteo mayor probabilidad de reacción (monitoreado con el cambio de color). Se considera que al adicionarse lentamente la sal de plata se genera un medio más homogéneo y con ello se favorece la reducción de los iones de plata, esto permite que la reducción sea controlada y no entren en competencia los agentes reductores (metabolitos de los extractos). Además, comparando los sistemas 1S3 (**Figura 23**) y 3S3 (**Figura 29**); 1S4 (**Figura 24**) y 3S4 (**Figura 30**); 1S5 (**Figura 25**) y 3S5 (**Figura 31**); 1S6 (**Figura 26**) y 3S6 (**Figura 32**), se observa que el cambio en la coloración de la reacción se presenta en tiempos menores para los sistemas de mayor concentración. Aun cuando la velocidad de agitación no es el factor que determine la formación de nanopartículas (ver 3S2, **Figura 28**) puede ayudar, considerando que la incorporación lenta de la sal precursora acompañada de la agitación permiten que se genere colisiones y desorden en el medio favoreciendo la formación de las nanopartículas.

7.3.2 Caracterización por FTIR

La **Figura 35** y **Figura 36** muestran los espectros FTIR y los resultados de la primera derivada obtenida a partir de los datos de los espectros de los sistemas con contenido de nitrato de plata de 1 y 3 mM, denotados a lo largo del texto como 1S y 3S.

La señal indicada como “a” que se sitúa en 1751 cm^{-1} desaparece en casi todos los sistemas. En 3S7 se logra apreciar a una baja intensidad. La señal “b” permanece en todos los sistemas pero es menos intenso en 1S2 y 3S7. Entre las señales “b-c” existen pequeñas variaciones en los sistemas 1S1, 1S2, 1S8, 1S4, 3S7, 3S4, 3S3, 3S2, 3S1. La señal “c” se mantiene en todos los sistemas pero es menos intenso en 1S2 y 3S7. Entre las señales “c-d” se presentan distintos cambios de pendiente en todos los casos. Esto se puede deber a que en esa zona también se encuentran los cambios de pendiente del ión nitrato. La señal “d” se mantiene en todos los sistemas, la señal “e” ya no se aprecia solapada y la señal “f” también se mantiene en todos los casos. Sin embargo, en 3S7 existió un cambio muy notorio en la relación de sus intensidades.

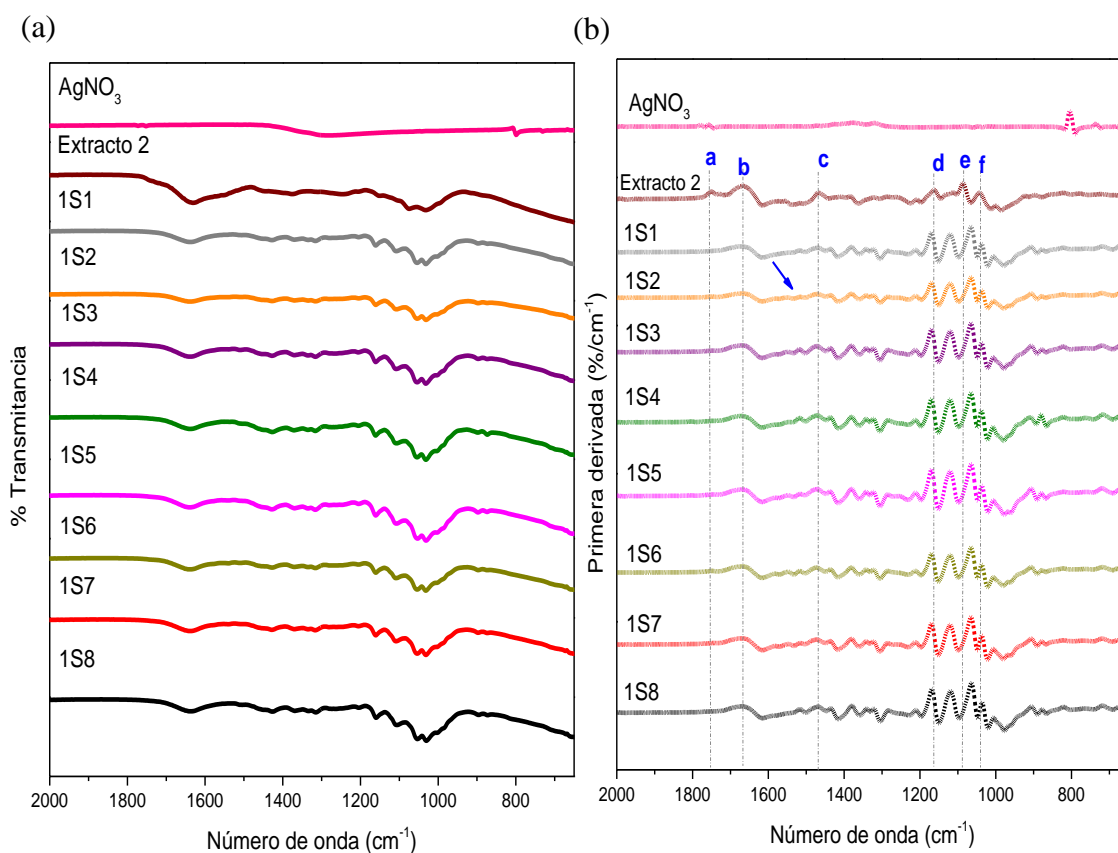


Figura 35. (a) Espectros FTIR y (b) primera derivada de los espectros de los sistemas 1S.

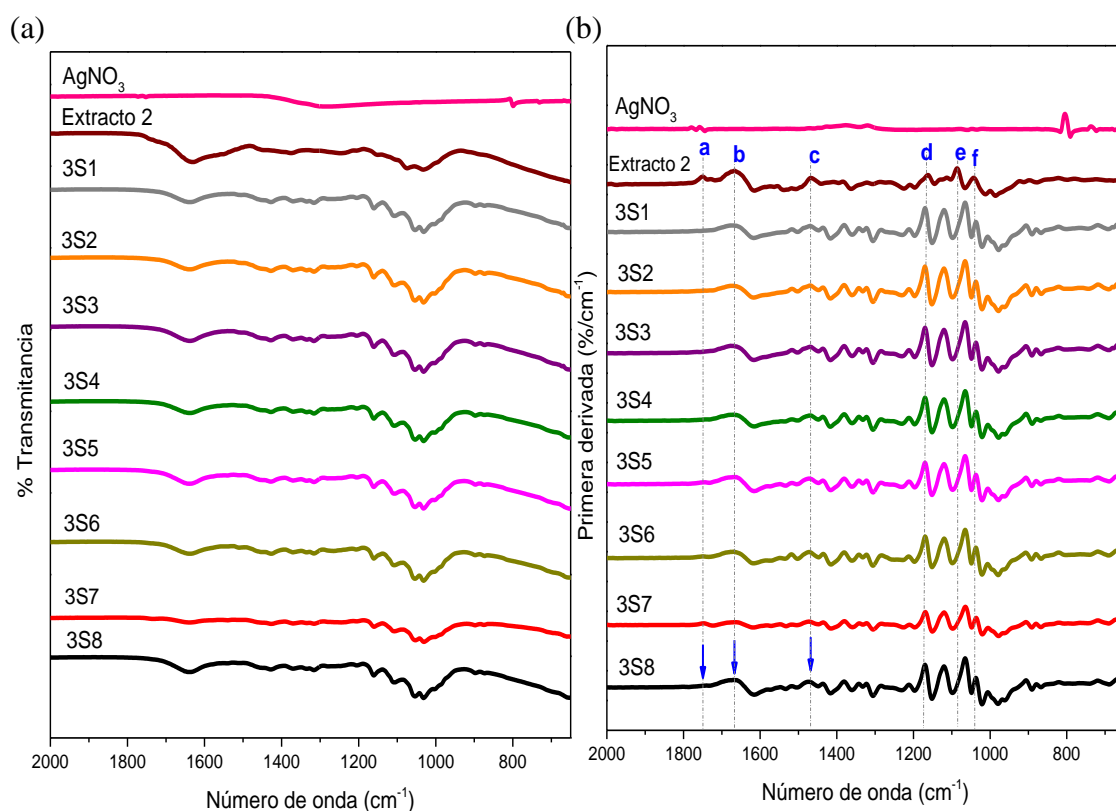


Figura 36. (a) Espectros FTIR y (b) primera derivada de los espectros de los sistemas 3S.

Al existir importantes cambios en la primera derivada de los espectros FTIR de los sistemas de reacción con respecto al del Extracto 2, refleja una participación importante de algunos grupos funcionales de *S. rebaudiana*, entre los que destacan, carbonilos, fenilos y alcoholes en la síntesis de AgNps.

7.3.3 Caracterización por espectrofotometría UV-Vis

Para el análisis de los datos obtenidos por espectrofotometría UV-Vis de las reacciones en los sistemas 1S y 3S se hicieron las siguientes consideraciones:

- Comparar las reacciones a temperatura ambiente (1S1, 1S5, 1S8, 3S1, 3S5 y 3S8).
- Comparar las reacciones a 80 °C (1S2, 1S3, 1S4, 1S6, 1S7, 3S2, 3S3, 3S4, 3S6 y 3S7).

La **Figura 37** muestra el color obtenido en las reacciones a temperatura ambiente y la **Figura 38** el espectro de absorción UV-Vis.



Figura 37. Color de los productos de reacción, 1S1, 1S5, 1S8, 3S1, 3S5 y 3S8.

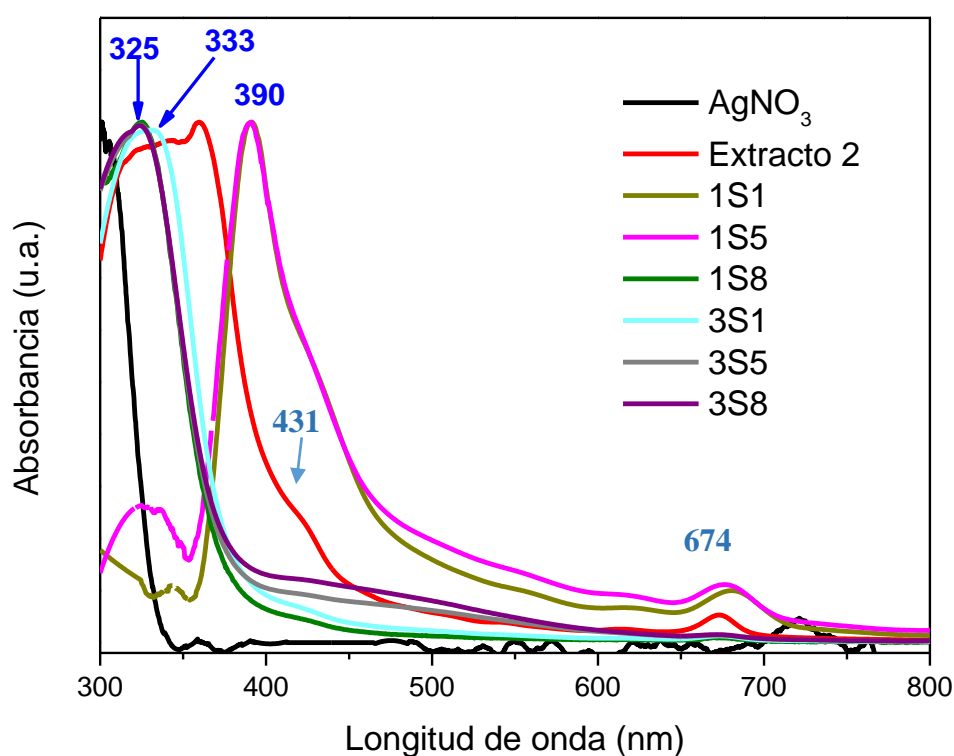


Figura 38. Espectros UV-Vis de los productos de reacción, 1S1, 1S5, 1S8, 3S1, 3S5 y 3S8.

La clorofila es un pigmento natural que tiene una importante participación en el metabolismo de las plantas. El espectro UV-Vis de la clorofila presenta 2 absorciones; la primera absorción se puede encontrar en el rango que va de 430 a 450 nm y la segunda en el rango que va de 600 a 690 nm [40, 41]. En el espectro UV-Vis del extracto 2 de *S. rebaudiana* se observan las absorciones de este compuesto, la primera absorción en 431 nm y la segunda en 674 nm. En los productos de reacción 1S1 y 1S5 el pico de absorción en 674 nm de la clorofila permaneció, mientras que en los productos de reacción 1S8, 3S1, 3S5 y 3S8 disminuyó de intensidad. Se considera que la absorción de la clorofila

permaneció en algunos casos debido al uso de la temperatura ambiente que evitó su descomposición térmica y la disminución de su intensidad a su participación en la formación de AgNps.

Con respecto a las AgNps se observaron absorciones a diferentes longitudes de onda, las más relevantes se encontraron antes de los 430 nm. Por ejemplo, las absorciones de los sistemas 1S1 ($T = \text{amb}$, $VA = 0$ rpm, $VI = 0$) y 1S5 ($T = \text{amb}$, $VA = 500$, $VI = 1$ gota/min) fueron similares, la de mayor intensidad se encontró en 390 nm con una pequeña inflexión alrededor de 430 nm y una de pequeña absorción cercana a la de la sal de plata aproximadamente en 330 nm. Por otro lado, los sistemas 1S8 ($VA=0$, $VI= 1$ gota/min), 3S1 ($T = \text{amb}$, $VA =0$, $VI = 0$), 3S5 ($T = \text{amb}$, $VA = 500$, $VI = 1$ gota/min) y 3S8 ($T = \text{amb}$, $VA= 0$, $VI= 1$ gota/min) presentaron absorciones y perfiles similares; en particular los sistemas realizados con goteo (1S8, 3S5, 3S8) su máxima absorción se encontró en 325 nm mientras que en el sistema sin agitación 3S1 presentó un ligero corrimiento de la banda de absorción a 333nm, es muy probable que el goteo permitió la formación de una nanopartícula con tamaño y morfología en especial. Además, los sistemas 3S5 y 3S8 presentaron una banda ancha que se extiende hasta los 600 nm con un máximo de absorción en 430 nm y fueron los sistemas que presentaron un color rojizo intenso.

Todas las absorciones observadas antes de 430 nm y en 430 nm se atribuyen a nanoesferas ya que se ha reportado en otros trabajos nanoesferas de plata con absorciones que se encuentran en longitudes menores a los 430 nm, esto se debe al efecto que produce la simetría de la nanopartícula por interacción con la luz visible y que ocasiona que existan diferentes frecuencias de resonancia de los plasmones superficiales [31,42]. Se asume que las variables empleadas en cada uno de los sistemas tuvo un efecto significativo en el tamaño, morfología y simetría de las nanopartículas que hizo que presentaran diferente color en los productos obtenidos y absorciones en diferentes longitudes de onda.

Con base en lo anterior, de este apartado se puede concretar lo siguiente.

- Las absorciones de la clorofila se mantuvieron en algunos espectros UV-Vis debido a que el uso temperatura ambiente evitó su descomposición térmica, sin embargo en algunos casos existió disminución de su intensidad debido a su participación en la formación de AgNps.

- Los sistemas que presentaron un cambio de color fueron 1S5, 3S5 y 3S8.
- El que las nanopartículas de Ag de los diferentes sistemas de reacción absorbieron a diferente longitud de onda es evidencia del efecto de las variables empleadas en cada uno de ellos con respecto a la morfología, tamaño y simetría que ocasiona que tengan diferente frecuencia de resonancia de plasmón.

La **Figura 39** muestra el color obtenido en las reacciones a 80 °C y la **Figura 40** el espectro de absorción UV-Vis.



Figura 39. Color de los productos de reacción, 1S2, 1S3, 1S4, 1S6, 1S7, 3S2, 3S3, 3S4, 3S6, y 3S7.

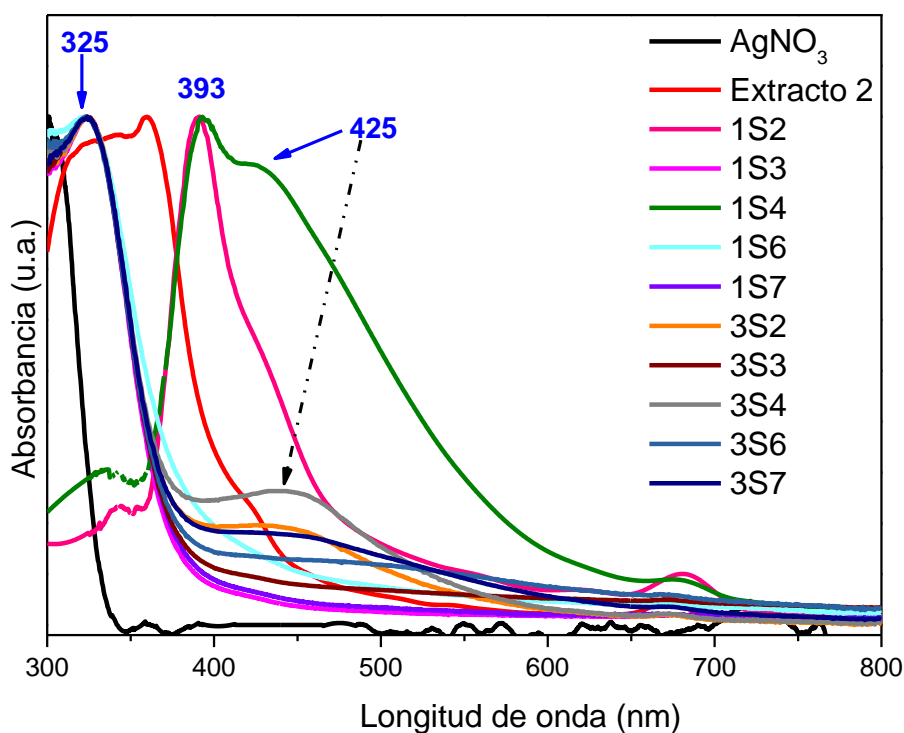


Figura 40. Espectros UV-Vis de los productos de reacción, 1S2, 1S3, 1S4, 1S6, 1S7, 3S2, 3S3, 3S4, 3S6, y 3S7.

En todos los sistemas se observan cambios de color, los más intensos pertenecen a los realizados a mayor concentración. También se observa la desaparición de la señal de la clorofila debido a su descomposición térmica por el aumento de la temperatura.

En los sistemas 1S2 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 0$, $VI = 0$) y 1S4 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$, $VI = 0$) la máxima absorción se presentó en 393 nm pero solo en 1S4 se observa una gran absorción en 425nm. Los demás sistemas presentan su máxima absorción en 325 nm y una banda ancha que se extiende hasta los 600 nm, siendo el sistema 3S4 quien presentó en 425 nm una absorción muy pronunciada. En la síntesis química convencional de AgNps, la velocidad de incorporación de la sal ha sido ampliamente utilizada para favorecer la formación de una morfología. Sin embargo en la síntesis donde se hace uso de extractos de plantas este importante parámetro no ha sido considerado. Es por ello que en este trabajo se realizó un pequeño estudio del efecto de la incorporación lenta del AgNO_3 donde se observó que en los sistemas al 3 mM se presenta un ensanchamiento de la banda por efecto de la adición controlada de AgNO_3 (ver 3S6 y 3S7, **Figura 40**).

Con lo anterior, de este apartado se puede concretar lo siguiente:

- Las absorciones de la clorofila desaparecen debido a su descomposición térmica por efecto del aumento de la temperatura en el sistema de reacción.
- De los dos sistemas de concentración, los espectros que presentaron mejores bandas de absorción fueron los que pertenecían a la concentración 3 mM.
- Se generan bandas más ensanchadas cuando se adicionan cantidades discretas de AgNO_3 en periodos cortos de tiempo (2 gotas/min y 1 gota/min).

7.4. Estudio morfológico y cristalino de las AgNps

En los resultados de las caracterizaciones por UV-vis del apartado anterior, en algunos casos la banda de absorción de AgNps estuvo bien definida, en otros hubo ensanchamiento de la banda. Por lo que, para poder estudiar mejor esa banda de absorción se realizó una separación por centrifugación en todos los productos de reacción y se volvió a estudiar las bandas por espectrofotometría UV-vis. Otro motivo por el cual se realizó la centrifugación fue para poder observar la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM) ya que se necesita eliminar los interferentes que pudieran causar una mala imagen, principalmente la eliminación de materia orgánica, puesto que el haz incidente puede calcinarla. A continuación se muestran los productos de reacción después de ser centrifugados (**Figura 41**).

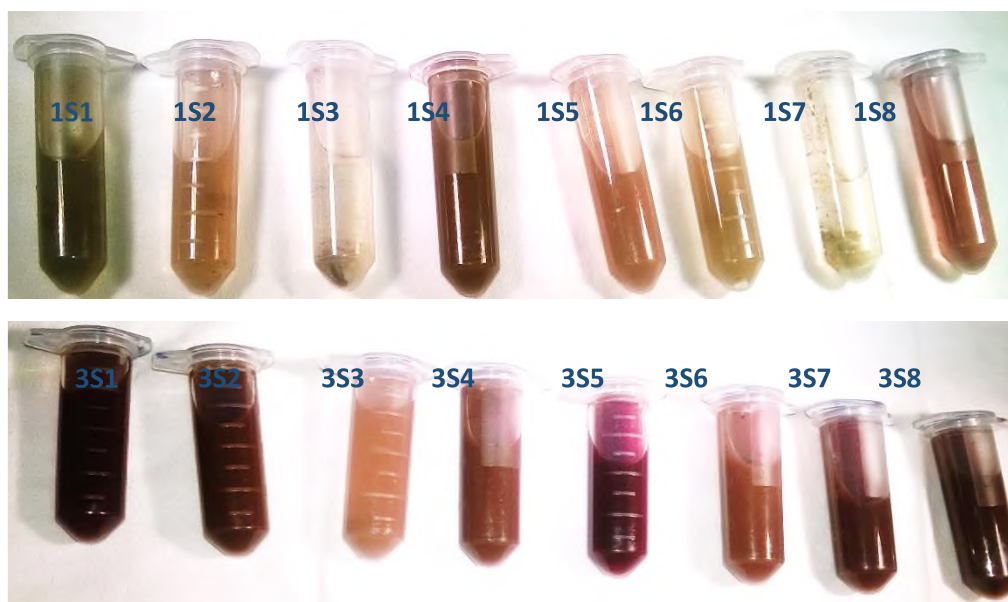


Figura 41. Productos de reacción después de ser centrifugados.

De acuerdo a la **Figura 41** se muestra una mayor evidencia de los cambios de color en las reacciones a las diferentes variables de reacción (temperatura, velocidad de agitación y velocidad de agregado de la sal) en comparación con los sistemas sin centrifugar (ver apartado avance de reacción). Los sistemas 1S3 y 1S7 son casi transparentes, lo cual hace inferir que no fue favorable la producción de AgNps, a diferencia de los demás que tienen una coloración intensa. El producto de reacción 1S1 muestra un color verde, característico de la clorofila del extracto. De acuerdo a lo reportado, los cambios de color de claro a oscuro están relacionados con el tamaño y forma de las nanopartículas. Para el análisis por TEM se hizo una selección con base en la mayor tonalidad de las reacciones y mejor perfil en sus espectros UV-Vis. Los sistemas seleccionados fueron 1S4, 1S5, 1S8, 3S1, 3S2, 3S5, 3S6 Y 3S7.

La **Figura 42** muestra los espectros UV-Vis de los sistemas seleccionados.

Los sistemas 1S4 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 0$), 1S5 ($T = \text{amb}$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min) y 1S8 ($T = \text{amb}$, $VA = 0$ y $VI = 1$ gota/min) muestran una $\lambda_{\text{max}} = 435$ nm, 416 nm y 416nm respectivamente, mostrando el pico más evidente en la reacción 1S4. Se observa también que los sistemas 1S5 y 1S8 presentan su máxima absorción en la misma longitud de onda, a pesar de ser sintetizados con diferentes parámetros, se infiere que este comportamiento puede ser por efecto de la temperatura, ya que ambas reacciones comparten este parámetro. En los tres sistemas de reacción aparece la señal en la zona de irradiación visible a 674 nm correspondiente a la clorofila de la planta. En 1S8 se muestra también una pequeña absorción en 608 nm, es probable que en este sistema se haya formado otro pico de absorción por falta de homogeneización del medio que permitió la obtención de otro tipo de morfología, ya que a diferencia de los otros dos sistemas, la reacción se llevó a cabo sin agitación.

A mayor contenido de la sal precursora (sistemas 3S) el pico máximo está mejor formado. En los sistemas 3S1 ($T = \text{amb}$, $VA = 0$ y $VI = 0$), 3S2 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 0$ y $VI = 0$), 3S5 ($T = \text{amb}$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min) y 3S7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 2$ gota/min) sus espectros UV-Vis son muy similares, presentan una λ_{max} alrededor de 440 nm a pesar de que difieren en las variables de reacción. Contrariamente, el sistema 3S6 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min) muestra un desplazamiento en el valor máximo, siendo de 462 nm y un mayor ensanchamiento de la señal. Es posible considerar que en el sistema 3S6 se originó la formación de diversas morfologías de AgNps. De acuerdo a lo reportado, el primer pico de absorción puede ser atribuido a morfologías esféricas y las

siguientes señales débiles o empalmadas en la banda ancha a morfologías planas como nanoplatos.

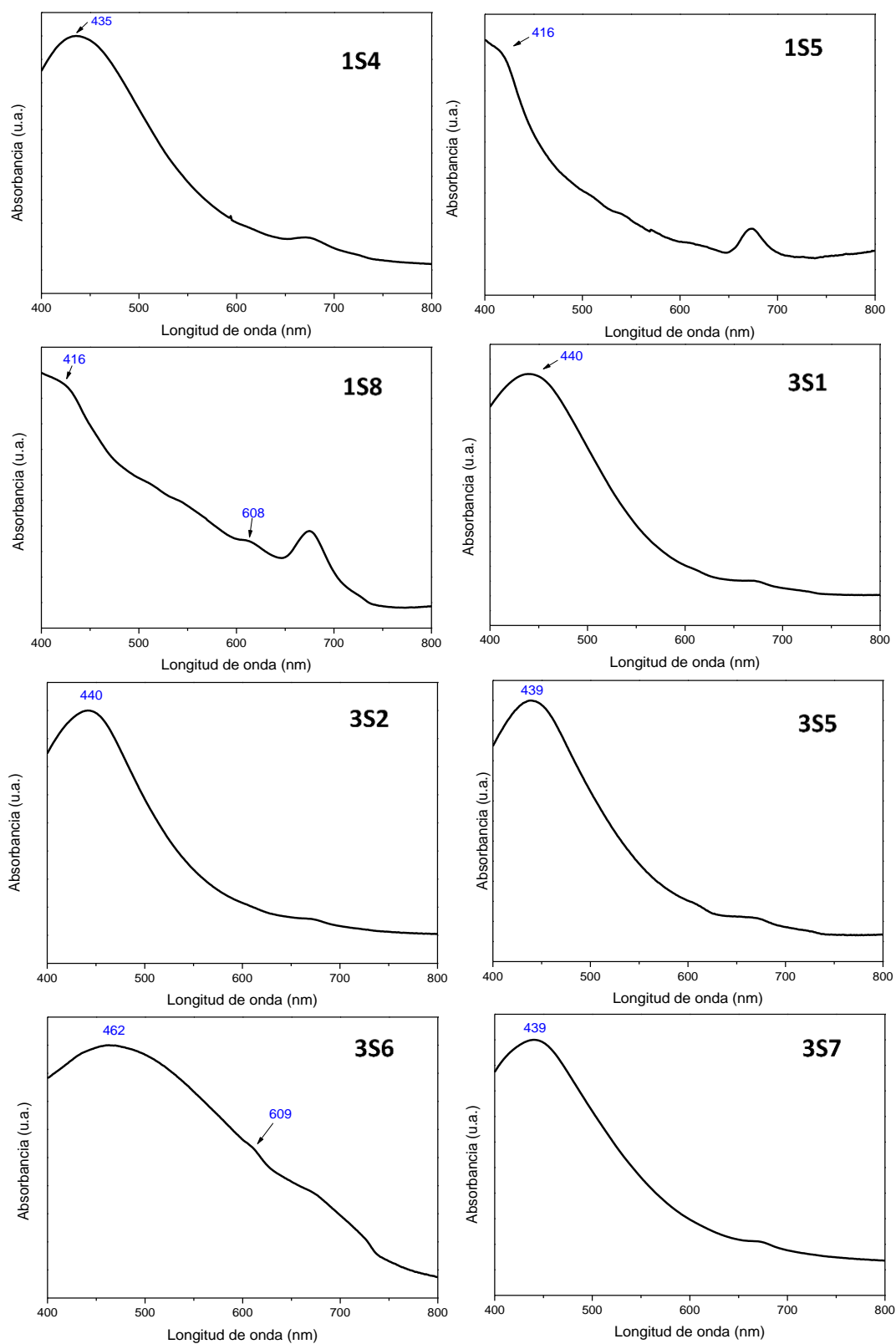


Figura 42. Espectros UV-Vis de los productos de reacción después de ser centrifugados.

Comparando los sistemas 3S6 y 3S7, los cuales difieren en la velocidad de incorporación de la sal de plata (3S6: 1 gota/min, 3S7: 2 gota/min), se considera que cuando la adición es más rápida, la banda de absorción se hace más estrecha. Lo anterior nos hace inferir que las adiciones más rápidas no favorecen la nucleación de partículas con mayor área superficial como los nanoplatos. Aparentemente, la reacción con mayor efecto en la morfología de formación de AgNps fue 3S6 (temperatura 80 °C, 500 rpm y 1gota/min).

La plata posee una estructura cúbica centrada en las caras; su carta de difracción avalada por el Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) se muestra a continuación (**Tabla 8**).

Tabla 8. Carta de difracción de la plata.

Distancia interplanar (Å)	Plano
2.359	(111)
2.044	(200)
1.445	(220)
1.231	(311)
1.176	(222)
1.0215	(400)
0.9375	(331)
0.9137	(420)
0.8341	(422)

Por medio de las micrografías obtenidas a diferentes magnificaciones en microscopia electrónica de transmisión se discute el ordenamiento atómico de las AgNps obtenidas y mediante la difracción de electrones de área seleccionada (SAED por sus siglas en inglés) se calcularon las distancias interplanares.

- **Sistema 1S4 (T = 80 °C, VA = 500 y VI = 0)**

La **Figura 43** muestra las micrografías obtenidas por TEM del sistema 1S4.

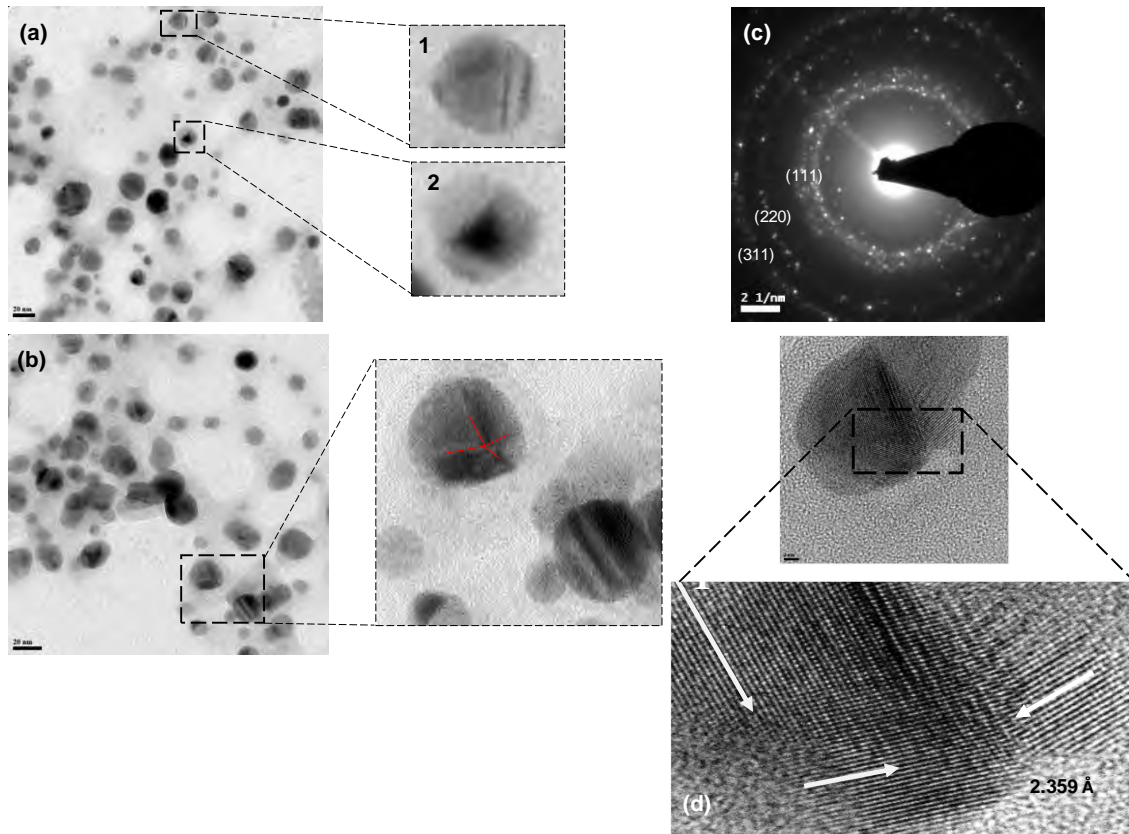


Figura 43. (a, b y d) micrografías por TEM de AgNps del sistema 1S4 a diferentes magnificaciones, (c) SAED.

En las micrografías del sistema 1S4 (**Figuras 43a y 43b**) se aprecian nanoesferas de diversos tamaños, las más grandes se encuentran alrededor de los 20 nm. En la ampliación 1 de la micrografía de la **Figura 43a** la nanopartícula posee una macla laminar. En la ampliación 2 se observa que en el centro de la nanopartícula existe una zona muy oscura, se considera que esta zona se encuentra cargada de átomos de plata encimados por efecto de la coalescencia de varios núcleos. Cuando se da la coalescencia en el proceso de formación de las AgNps, los núcleos pueden unirse sin seguir una orientación generando imperfecciones en los límites de grano, sin embargo existe la posibilidad de que en el límite de grano presenten una simetría de red especular que se denomina límite de macla, en ambos extremos del límite de macla los átomos son imágenes especulares. Las maclas pueden estar compuestas por dos individuos o por varios. Los agregados cristalinos de una macla de varios individuos puede darse en forma laminar y se aprecian como capas parecidas a las hojas de un libro. En la ampliación de la micrografía de la **Figura 43b** se observa la formación de un decaedro (indicado con las

líneas rojas). Los decaedros son figuras geométricas de 10 caras, en este caso son triangulares y de diferente tamaño.

Cuando las celdas de un cristal se encuentran unidas de la misma manera y con la misma orientación se trata de un sistema monocristalino. Existe otro tipo de arreglo llamado policristalino en el que los cristales (también llamados granos) se encuentran orientados de distinta forma. Las estructuras policristalinas generalmente poseen defectos de superficie. La **Figura 43c** muestra el análisis por SAED. La SAED presenta 3 anillos que pertenecen a los planos (311), (220) y (111), los cuales corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å y 2.359 Å respectivamente. En la **Figura 43d** se observan nanopartículas con un arreglo policristalino, se confirman las distintas orientaciones que sigue cada grano dentro de la estructura (indicado con la flechas blancas).

- **Sistema 1S5 (T = amb, VA = 500 y VI = 1 gota/min)**

La **Figura 44** muestra el comportamiento morfológico del sistema 1S5.

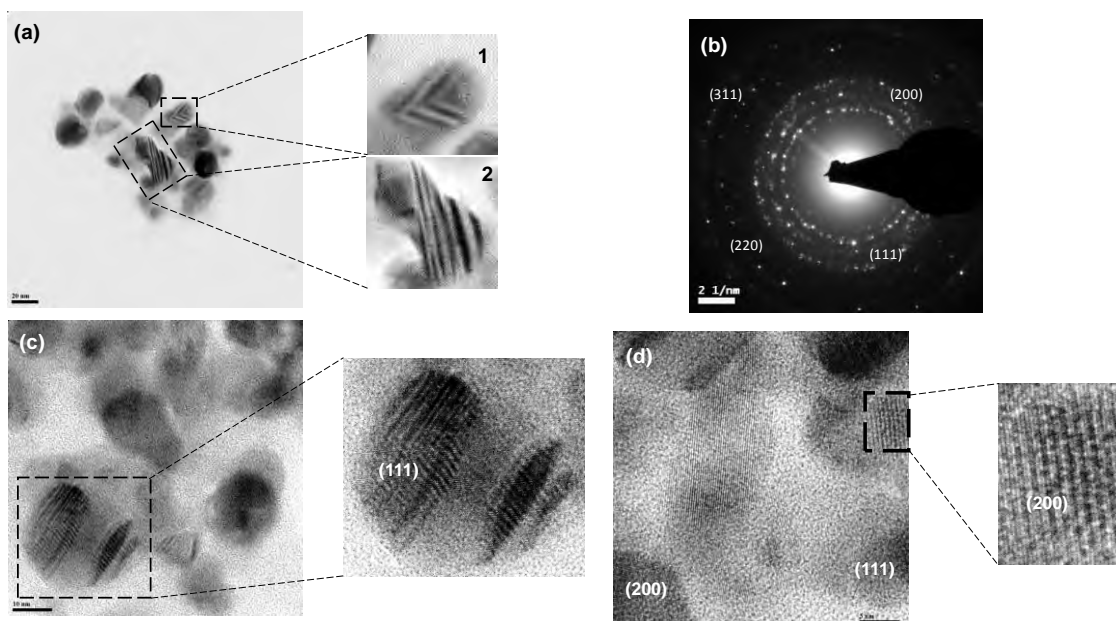


Figura 44. (a, c y d) micrografías por TEM de AgNPs del sistema 1S5 a diferentes magnificaciones, (b) SAED.

En las micrografías de la **Figura 44** se observan nanopartículas esféricas con un diámetro alrededor de 20 nm. Las dos nanopartículas que se amplían de la **Figura 44a**

presentan una macla de agregados laminares. En la nanopartícula de la ampliación 1 se observa que los individuos que integran esta macla son de forma triangular mientras que en la nanopartícula de la ampliación 2 los individuos que integran la macla no presentan forma definida. El análisis por SAED mostrado en la **Figura 44b** presenta 4 anillos que pertenecen a los planos (311), (220), (200), (111) los cuales corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å, 2.359 Å respectivamente. En las micrografías de las **Figuras 44c y 44d** indican los planos (111) y (200) que pertenecen a algunas nanoesferas. Las nanopartículas que tienen el plano (200) poseen distancias interplanares menores.

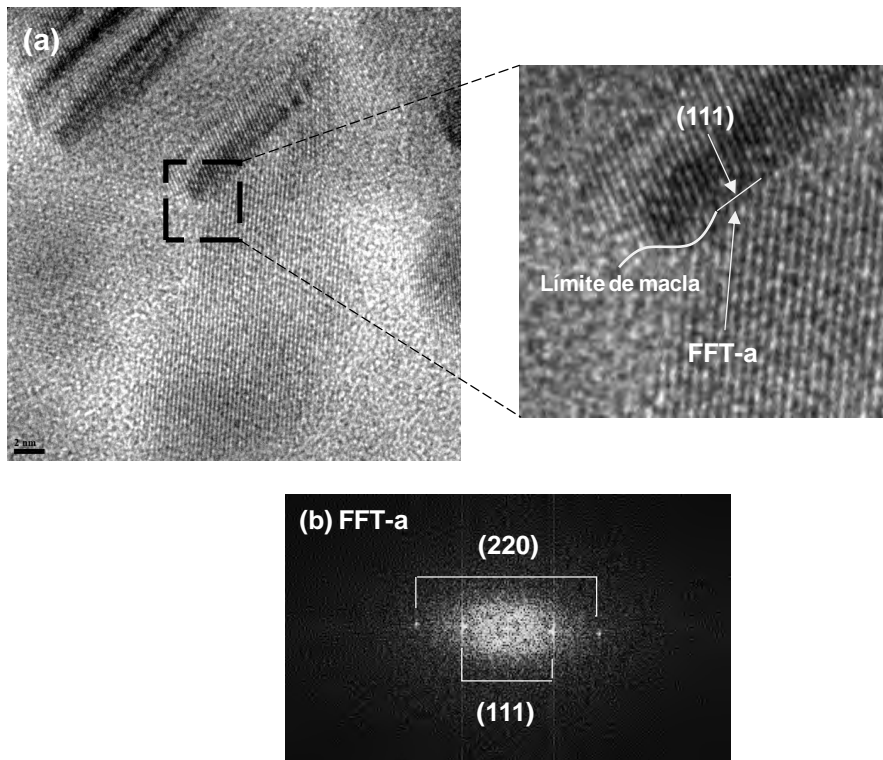


Figura 45. (a) Morfología a alta magnificación de una nanopartícula del sistema 1S5, (b) Análisis FFT de la zona inferior del límite de macla.

En la **Figura 45** se muestra una nanopartícula que posee una macla de dos individuos unidos de forma especular. El lado superior del límite de macla presenta el plano (111) mientras que del otro lado la transformada de Fourier (FFT) muestra la presencia de dos planos, el (111) y el (220). Se considera que la presencia del plano (220) se debe a que se genera un apilamiento entre los átomos que ocasiona que la distancia

interplanar se acorte, esto debido a que cada grano tiene una orientación que se bloquea con la orientación del otro.

En este sistema no se observó la presencia de AgNps con facetas como el decaedro del sistema anterior, por lo que se infiere que las condiciones empleadas en la síntesis de este sistema no favorecen la formación de morfologías distintas a las esféricas.

- *Sistema 1S8* ($T = \text{amb}$, $VA = 0$ y $VI = 1$ gota/min)

La **Figura 46** muestra las morfologías del sistema 1S8.

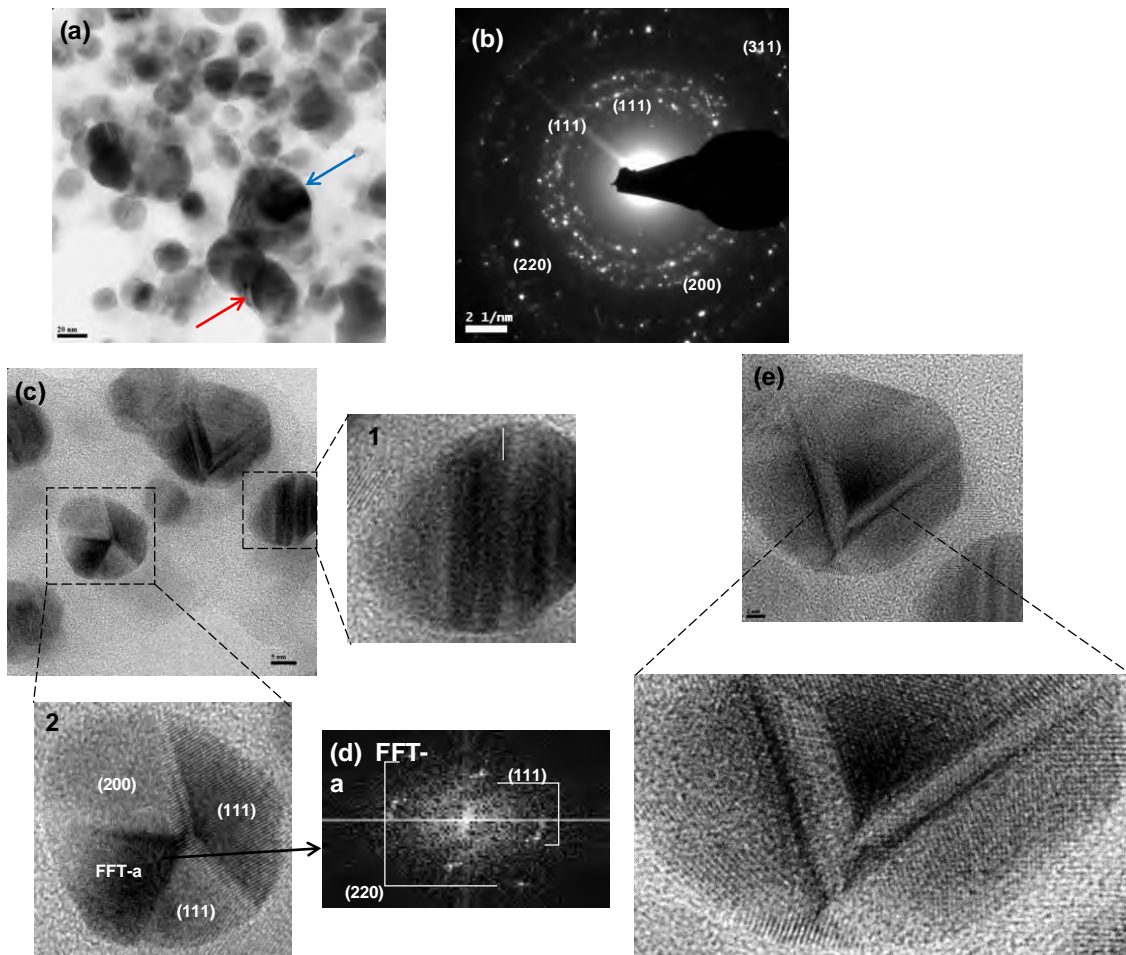


Figura 46. (a, c y e) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 1S8 a diferentes magnificaciones, (b) análisis por SAED y (d) análisis por FFT.

A diferencia de las morfologías anteriores en la **Figura 46a** se observa la presencia de partículas que rebasan los 20 nm (indicado con la flecha azul), es muy probable que esto se deba a la falta de agitación en el sistema, ocasionando la coalescencia de los núcleos en formación. Indicado con la flecha roja se muestra una nanopartícula que podría ser un decaedro pero con las facetas no bien formadas. En este caso se infiere que este comportamiento se debe al uso temperatura ambiente, lo cual que termodinámicamente no favoreció su formación. El análisis por SAED (**Figura 46b**) muestra la formación de 4 anillos que poseen los siguientes planos (311), (220), (200) y (111) y que corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å y 2.359 Å respectivamente. En las ampliaciones de la micrografía de la **Figura 46c** se muestran dos nanopartículas de morfología y crecimiento cristalino diferente. La nanopartícula 1 presenta una macla múltiple debido a los agregados laminares que se observan en su estructura. La nanopartícula 2 presenta varias facetas donde el plano (111) es el que predomina. La faceta más oscura presenta una FFT que posee dos planos, el (111) y el (220) (**Figura 46d**). Se considera el plano (220) se forma porque disminuye la distancia interplanar entre los átomos como consecuencia del apilamiento entre ellos. La **Figura 46e** muestra una nanopartícula con muchos defectos superficiales. Presenta muchos granos de diferente tamaño y orientación, indicativo de una nanopartícula policristalina.

- **Sistema 3S1 (T = amb, VA = 0 y VI = 0)**

La **Figura 47a** muestra AgNps de diferente tamaño y morfología. En la ampliación se observa la formación de un nanoplato triangular no bien formado ya que sus esquinas están redondeadas. De acuerdo a la literatura, los núcleos precursores de nanoplatos triangulares son monocristalinos. La **Figura 47b** ampliación 2 muestra la presencia de otro nanoplato triangular no bien formado y en la ampliación 1 se observa una nanoesfera con una macla múltiple de agregados laminares. La **Figura 47c** muestra a una nanopartícula con el plano (111) en su ordenamiento. En la parte superior izquierda de esta micrografía se observa una nanopartícula con facetas que no lograron formarse totalmente. En la ampliación de esta micrografía se observa una nanopartícula de morfología no definida, ya que uno de sus lados es recto mientras que los demás tienen forma redondeada. En su interior posee zonas con granos orientados en diferentes direcciones con crecimiento de una macla múltiple. El análisis por SAED mostrado en la

Figura 47d presenta 4 anillos que poseen los siguientes planos (311), (220), (200) y (111) y que corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å y 2.359 Å respectivamente.

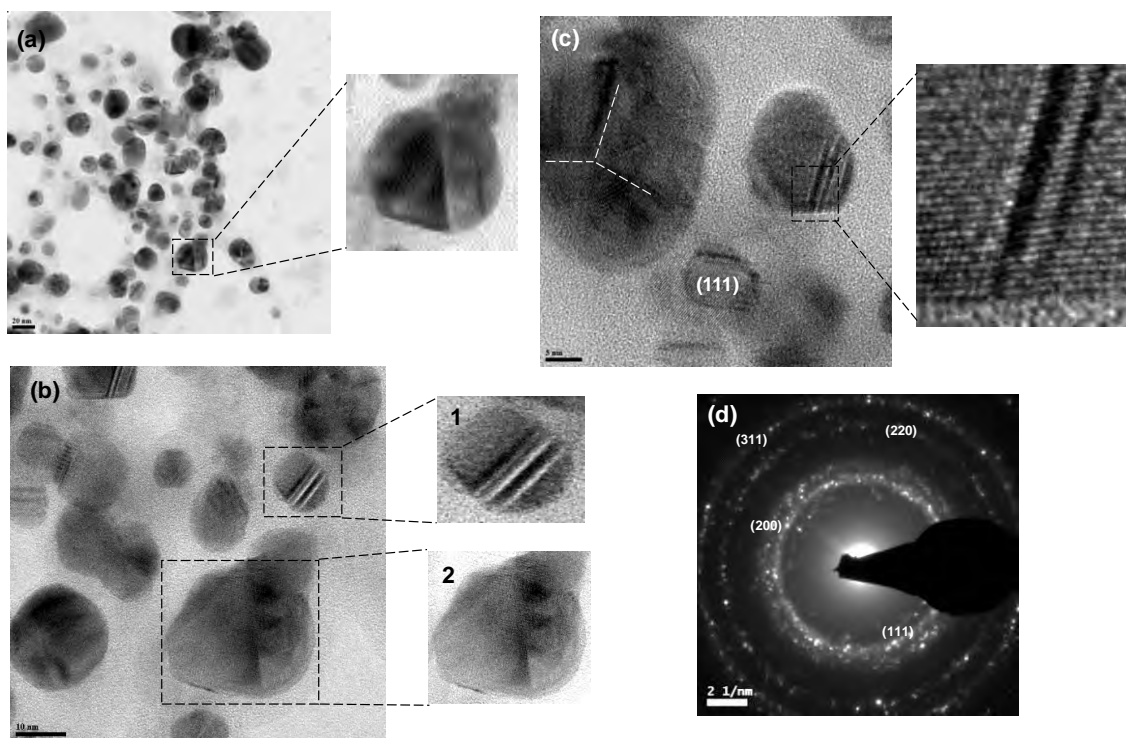


Figura 47. (a,b y c) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S1 a diferentes magnificaciones y (d) análisis por SAED.

- **Sistema 3S2 (T = 80 °C, VA = 0 y VI = 0)**

La **Figura 48** muestra la morfología por TEM de las nanopartículas obtenidas en el sistema 3S2. Se observan distintas morfologías; entre ellas nanobarras, (indicado con flechas negras), nanoplatos triangulares (indicado con flechas rojas) y nanoesferas (indicado con la flecha azul). La **Figura 48b** muestra la presencia de una partícula con forma elipsoidal que rebasa los 50 nm de longitud. En la ampliación de la **Figura 48c** se observan claramente las nanobarras. Estas fueron formadas por agregados laminares, generando una macla múltiple. En la **Figura 48d** se puede observar un nanoplato triangular no bien formado, presenta dos lados rectos y lo demás es redondeado. El análisis por SAED mostrado en la **Figura 48e** presenta 4 anillos que poseen los siguientes planos (311), (220), (200) y (111) y que corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å y 2.359 Å respectivamente.

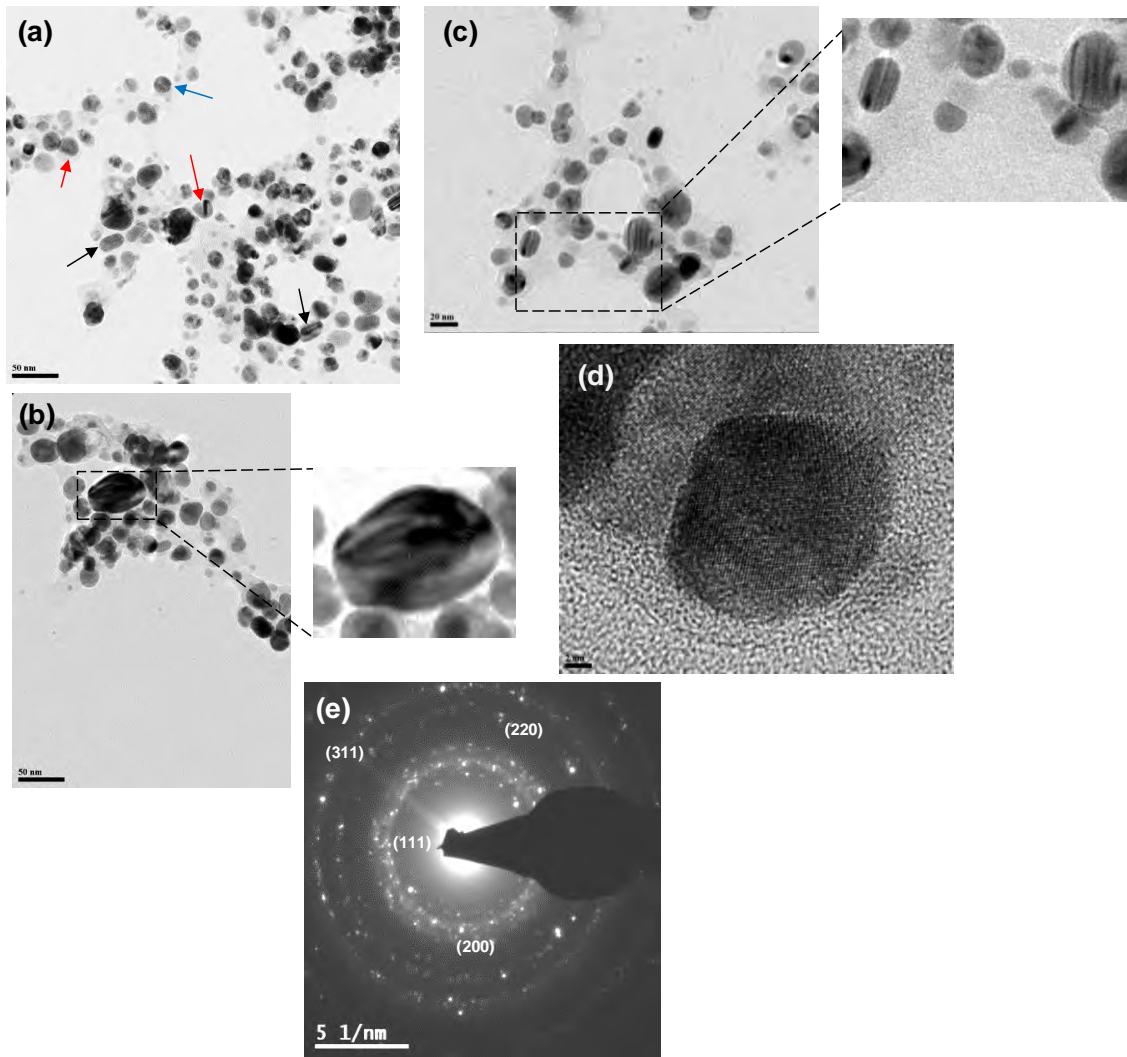


Figura 48. (a, b, c y d) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S2 a diferentes magnificaciones y (e) análisis por SAED.

- **Sistema 3S5 (T = amb, VA = 500 y VI = 1 gota/min)**

La **Figura 49** muestra la morfología por TEM de las nanopartículas obtenidas en el sistema 3S5. Se observa la formación preferente de nanoesferas y nanoplatos triangulares con lados bien definidos (ver ampliación). La **Figura 49b** muestra el fenómeno de Ostwald Ripening en el que se enuncia que partículas más grandes crecen a expensas de las más pequeñas. La coalescencia entre estas dos partículas genera defectos superficiales, ya que cada una posee una orientación en sus átomos generando un apilamiento en el límite de grano. En la **Figura 49c** se observa la presencia de una nanoesfera muy policristalina debido a la gran cantidad de granos orientados de diferente

forma. Todos los granos tienen un punto de unión en común, esta unión se observa muy oscura debido al apilamiento de los átomos. El análisis por SAED mostró 4 anillos que poseen los siguientes planos (311), (220), (200) y (111) y que corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å y 2.359 Å respectivamente (**Figura 49d**). La **Figura 49e** muestra una nanopartícula donde la mitad de su superficie posee el plano (111) y la otra el plano (200). La zona más oscura es la que posee el plano (200) debido a que contiene mayor número de átomos por unidad de área, a diferencia del lado del plano (111). En esta micrografía también se observa un nanoplateo triangular que posee el plano (200) en su estructura.

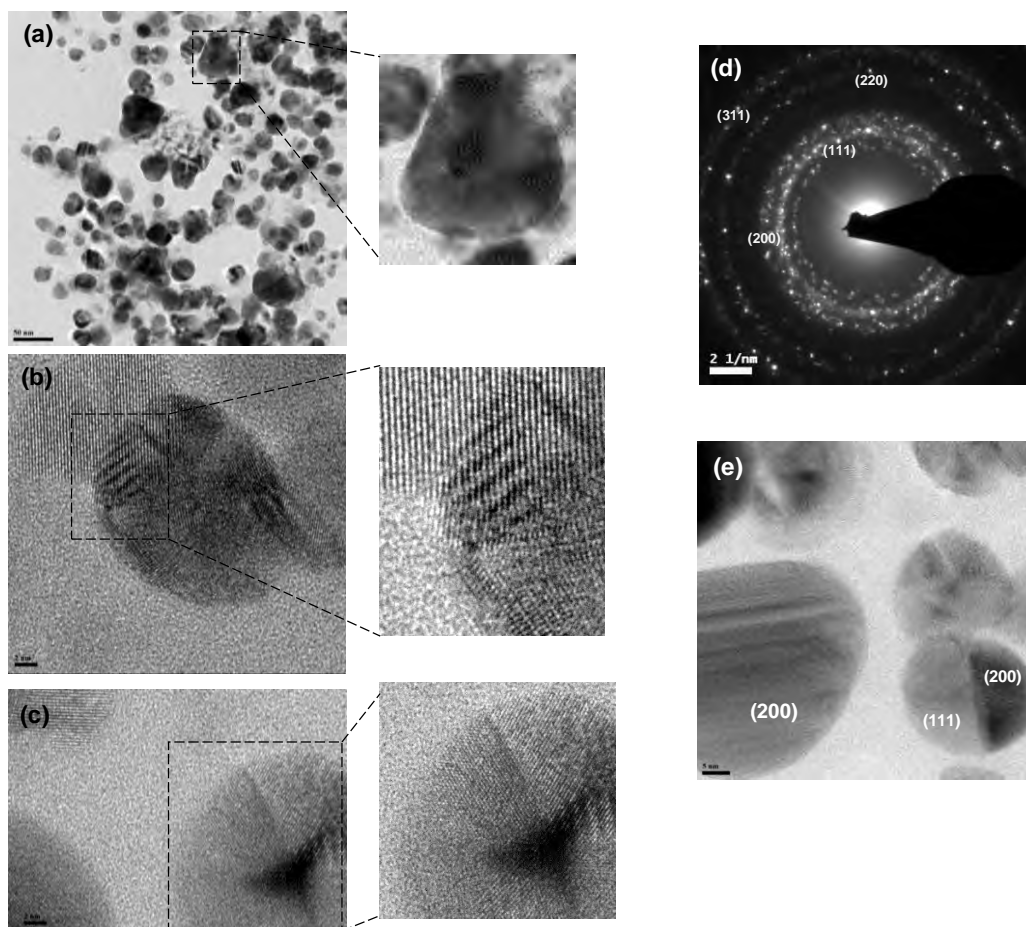


Figura 49. (a, b, c y e) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S5 a diferentes magnificaciones y (d) análisis por SAED.

- **Sistema 3S6** ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $VA = 500$ y $VI = 1$ gota/min)

La **Figura 50** muestra la morfología de las nanopartículas del sistema 3S6.

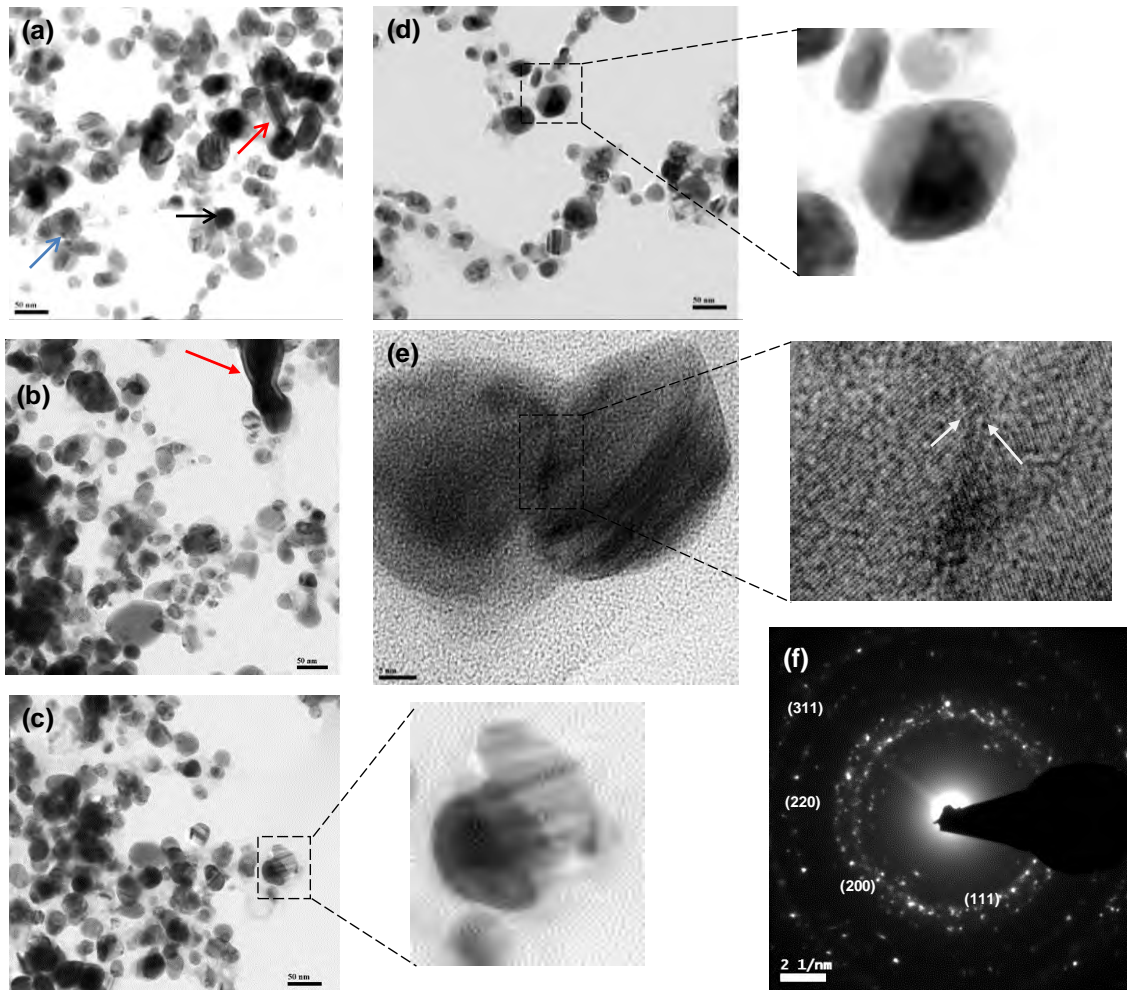


Figura 50. (a,b, c, d y e) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S6 a diferentes magnificaciones y (f) análisis por SAED.

La **Figura 50a** muestra la presencia de nanobarras (indicado con la flecha roja), nanoesferas (indicado con la flecha negra) y nanoplatos triangulares (indicado con la flecha azul). En la **Figura 50b** se evidencia la sal de plata (indicada con flecha roja) que no formó nanopartículas. En la ampliación de la **Figura 50c** se observa la unión de dos partículas, lo cual se considera se debe al fenómeno de Ostwald Ripening. En la ampliación de la **Figura 50d** se puede apreciar una nanopartícula con una región más oscura, donde es probable que los átomos estén unidos por distancias interplanares pequeñas. Además, se observa que los lados de esta nanopartícula querían definirse para formar un nanoplato hexagonal. En la micrografía de la **Figura 50e** se logra apreciar la unión entre dos nanopartículas que generan un límite de grano (ver magnificación). El análisis por SAED mostrado en la **Figura 50f** presenta 4 anillos que poseen los siguientes

planos (311), (220), (200) y (111) y que corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å y 2.359 Å respectivamente.

- **Sistema 3S7 (T = 80 °C, VA = 500 y VI = 2 gota/min)**

La **Figura 51** muestra la morfología de las nanopartículas obtenidas en el sistema 3S7.

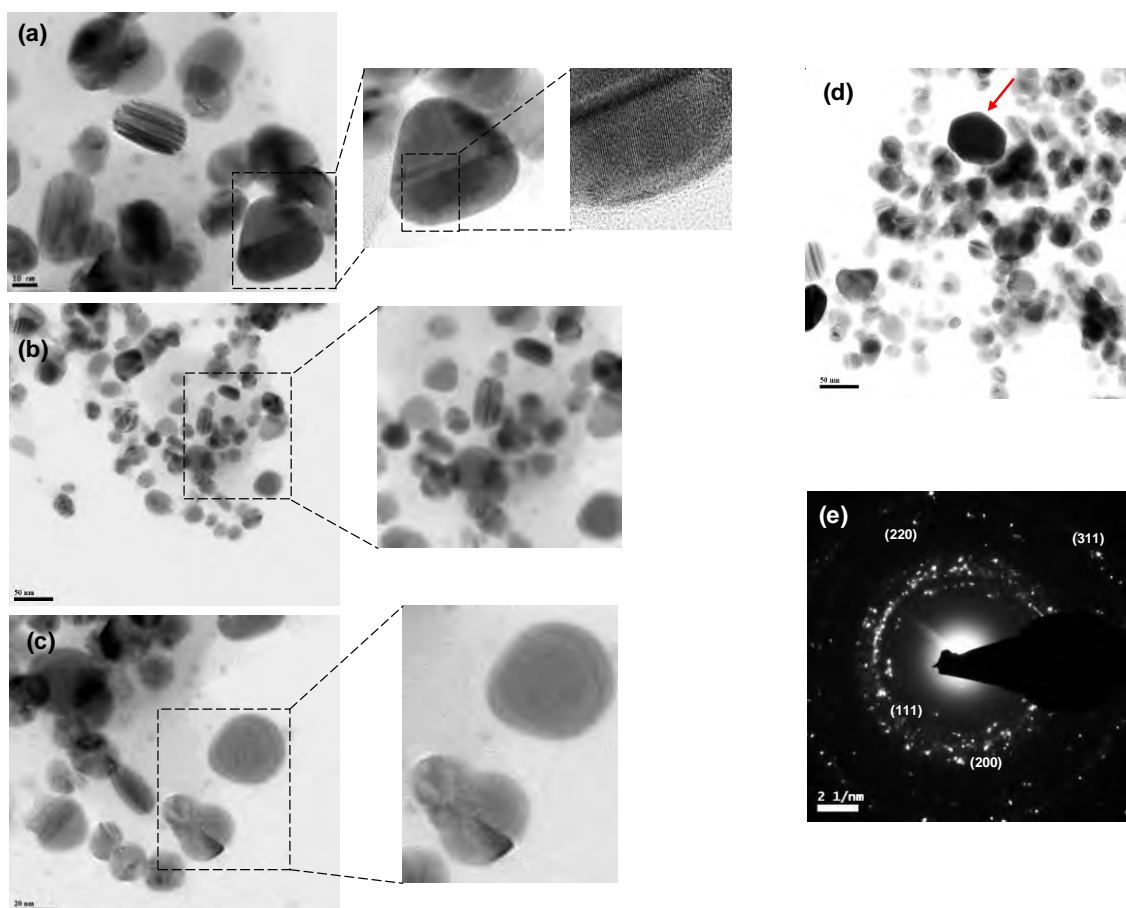


Figura 51. (a, b, c y d) Micrografías por TEM de AgNps del sistema 3S7 a diferentes magnificaciones y (e) análisis por SAED.

En la **Figura 51a** se observa la presencia de nanoplatos triangulares, nanobarras y nanoesferas con maclas múltiples. En la ampliación de un nanoplato triangular, la diferencia en la intensidad de algunas zonas se debe a que las distancias interplanares son distintas, lo que genera mayor apilamiento de los átomos en algunas partes. **La Figura 51b** muestra las mismas morfologías (nanobarras, nanoplatos triangulares y nanoesferas) pero sin tener maclas múltiples (tonalidad clara), lo cual hace inferir que las condiciones de reacción permitieron la generación de crecimientos continuos y no por agregados. Es

sabido que los nanoplatos triangulares son generados a partir de la coalescencia de núcleos esféricos monocristalinos. En la micrografía de la **Figura 51c** se logra apreciar la unión de dos esferas para generar un nanoplato triangular sin embargo su forma no está bien definida: esto puede deberse a que faltó más tiempo de reacción. En la micrografía de la **Figura 51d** se observa la presencia de un nanoplato hexagonal mayor a 50 nm. El análisis por SAED presenta 4 anillos que poseen los siguiente planos (311), (220), (200) y (111) y que corresponden a las distancias interplanares 1.231 Å, 1.445 Å, 2.044 Å y 2.359 Å respectivamente (**Figura 51e**).

7.5 Biopelículas de almidón/AgNps

La inmovilización de AgNps en polímeros termoplásticos es una forma de generar nanocompuestos con propiedades específicas que el termoplástico no puede aportar, como la actividad antimicrobiana. Con el fin de preparar muestras para analizar el comportamiento antimicrobiano se realizaron compuestas con almidón termoplástico y AgNps obtenidas. El almidón termoplástico ha sido utilizado en la generación de biopelículas por ser una fuente de origen natural es el almidón.

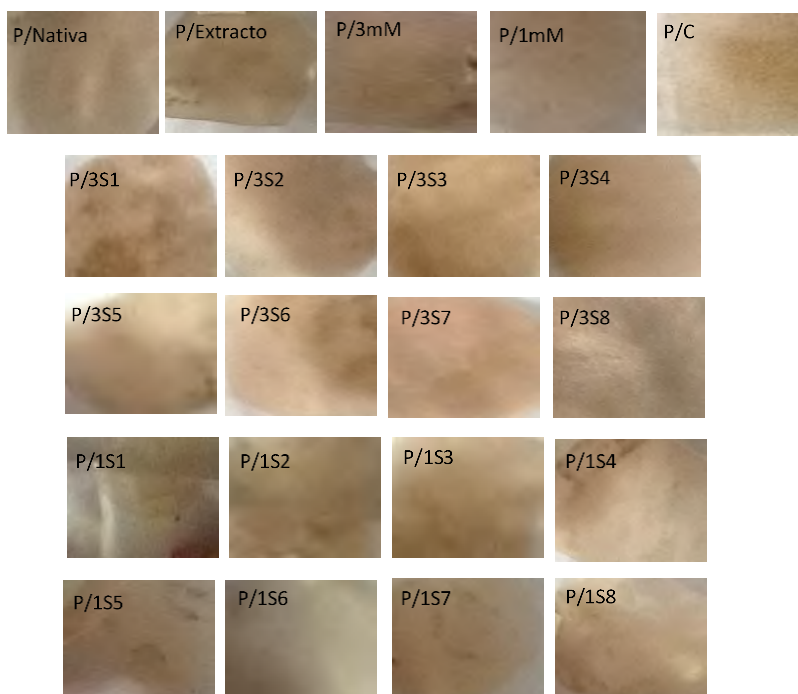


Figura 52. Biopelículas de almidón/AgNps.

Todas las biopelículas almidón/AgNps obtenidas mostraron color, textura y apariencia similar tal como se observa en le **Figura 52**.

Existen algunos trabajos sobre la incorporación de AgNps en polímeros, entre ellos el almidón. No obstante, los reportes son pocos ya que generalmente han empleado el almidón para sintetizar nanopartículas de Ag ya que esta macromolécula puede aportar la función reductora y estabilizante que se necesita para generar nanopartículas [33, 34]

La **Figura 53** muestra los espectros FTIR y el análisis de la primera derivada de las biopelículas de referencia, siendo P/1 mM y P/3 mM; almidón con la sal de plata a 1 y 3 mM respectivamente. P/Extracto; almidón con el extracto de la planta, P/Nativa; almidón solo, P/C; almidón con AgNps comerciales.

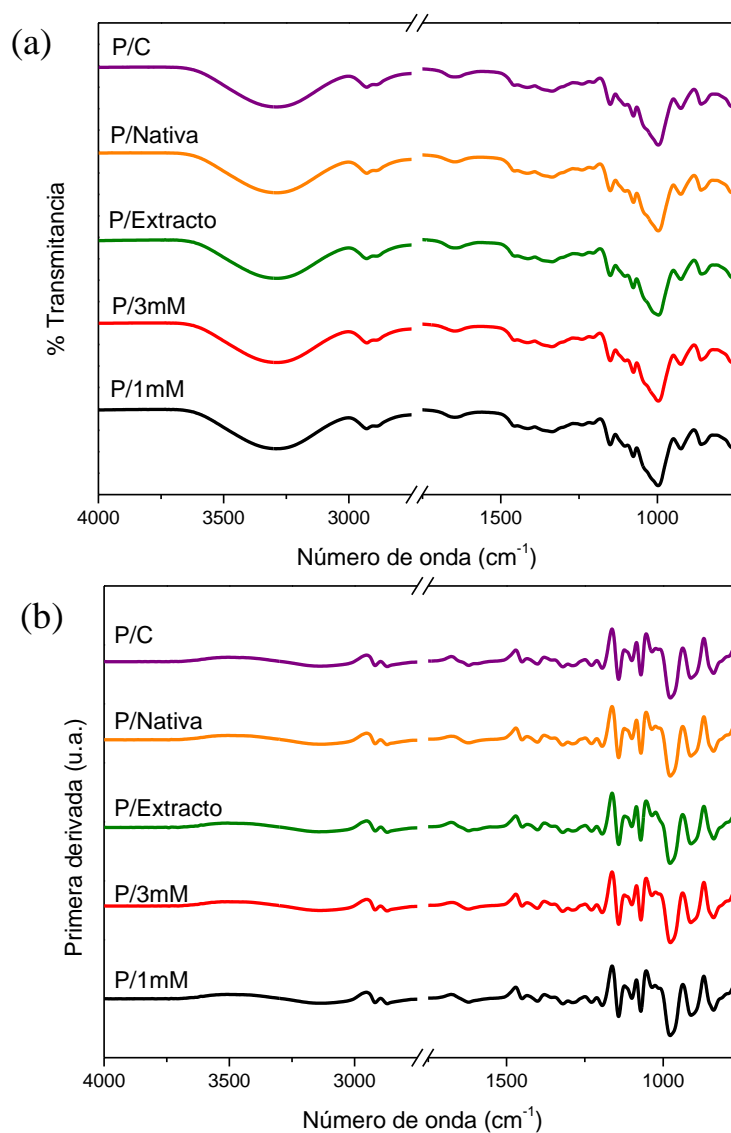


Figura 53. (a) Espectros FTIR de las biopelículas de referencia y (b) resultados de la primera derivada.

En general, no existen diferencias en las señales de las películas en cualquiera de las referencias. En las películas en las que se adicionó AgNO_3 (P/1mM y P/3mM) se esperaba un cambio en las señales de los grupos funcionales oxigenados del almidón, por efecto de su participación en la reducción de átomos de plata, pero no los hubo, lo que hace pensar que las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la elaboración de las biopelículas, no permitió su formación o que la participación de los grupos reductores fue tan poca que no fue perceptible por la sensibilidad del equipo.

La **Figura 54** muestra los resultados de FTIR y sus correspondientes primeras derivadas de los espectros de las películas en todos los sistemas.

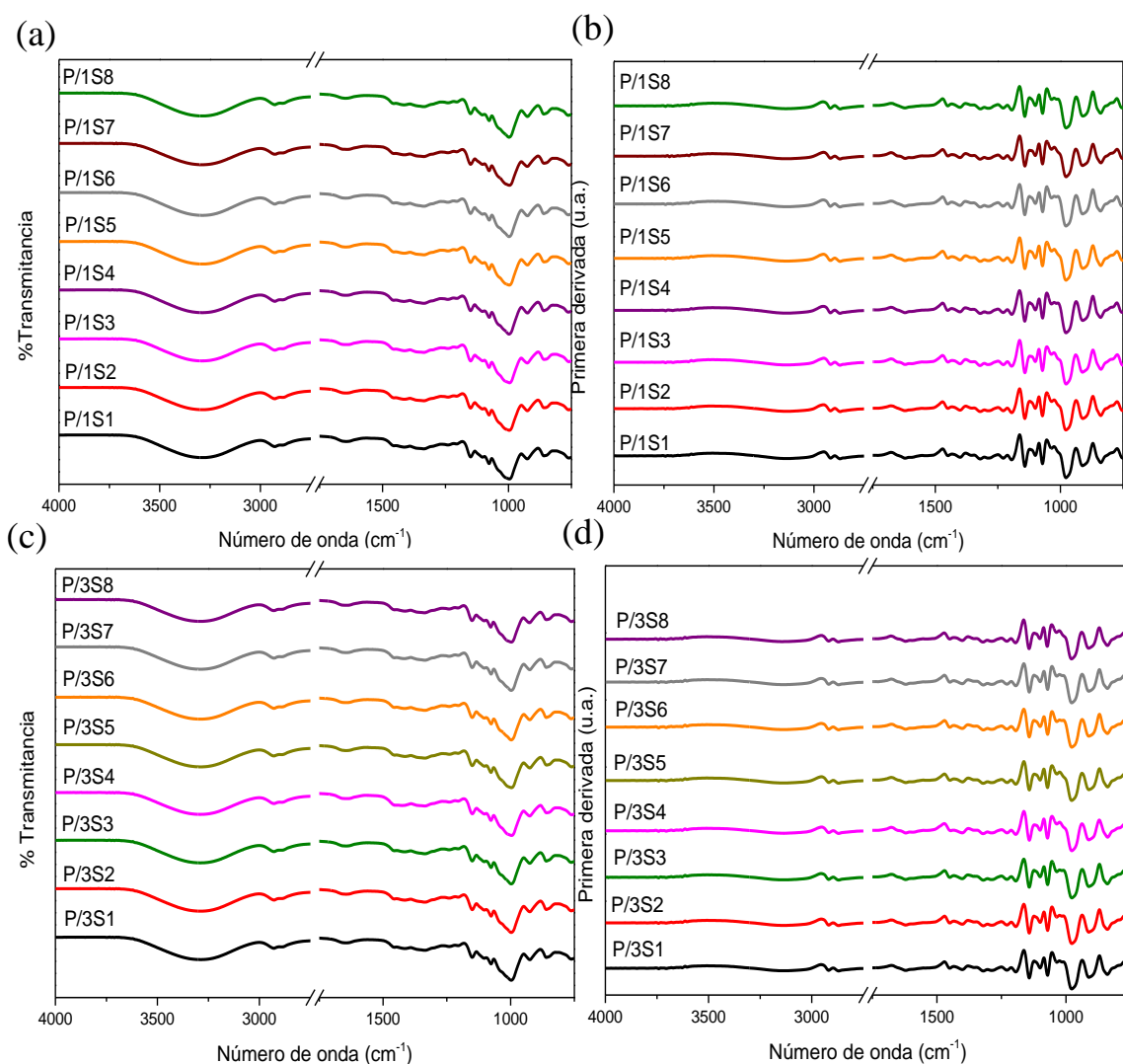


Figura 54. (a) Espectros FTIR de las películas en los sistemas 1S indicados, (b) primera derivada de los espectros de los sistemas 1S, (c) Espectros FTIR de las películas en los sistemas 3S indicados y (d) primera derivada de los espectros de los sistemas 3S.

Los resultados por FTIR de las películas de ambos sistemas 1S y 3S no muestran cambios entre ellas ni con los espectros de las referencias. Esto es consecuencia de que el componente mayoritario es almidón, en el cual no se ve afectada su estructura por la presencia de nanopartículas de plata.

La **Figura 55** muestra los patrones de difracción de las biopelículas de referencia.

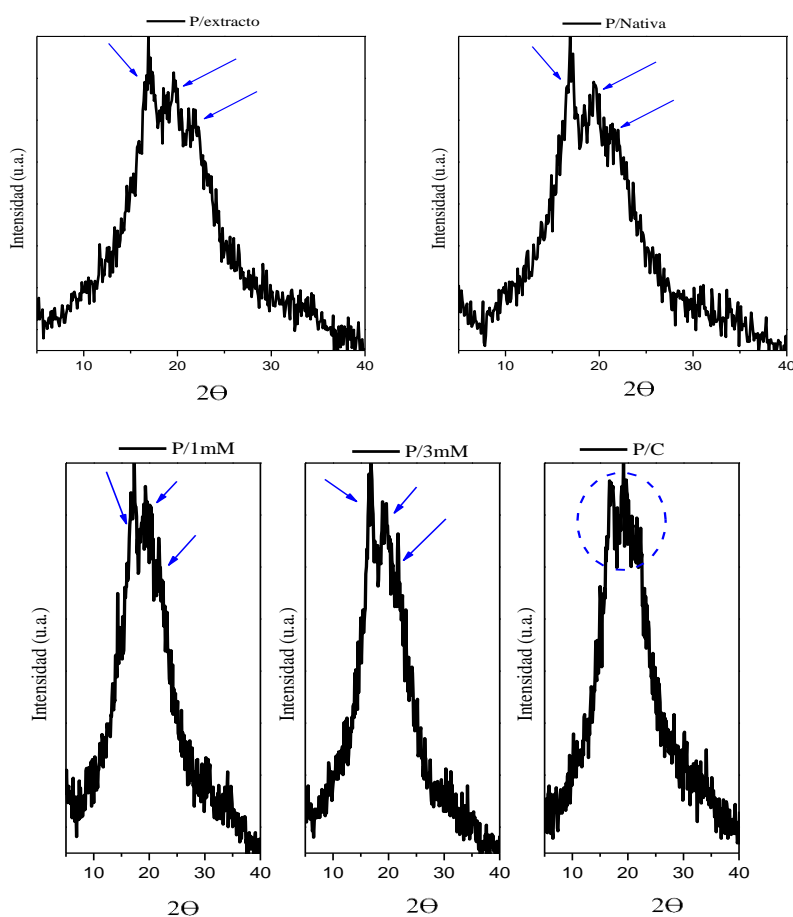


Figura 55. Patrones de difracción de las películas de referencia.

De acuerdo con la **Figura 55** el patrón de difracción del almidón solo (P/Nativa) presenta tres picos principales en $2\theta = 14^\circ$, $2\theta = 17^\circ$ y $2\theta = 22^\circ$, que corresponden a la amilopectina, parte cristalina del almidón. La intensidad de los picos del patrón de difracción de la biopelícula P/Nativa decrecen conforme incrementa 2θ . Con respecto a las biopelículas con AgNO_3 (P/1mM y P/3mM) se observó que no se generaron cambios en el difractograma en comparación con las películas P/Nativa. En P/C existe un cambio en la tendencia de los picos, siendo más intenso el que se encuentra $2\theta = 17^\circ$.

La **Figura 56** muestra los patrones de difracción de las biopelículas almidón/AgNps con 1mM.

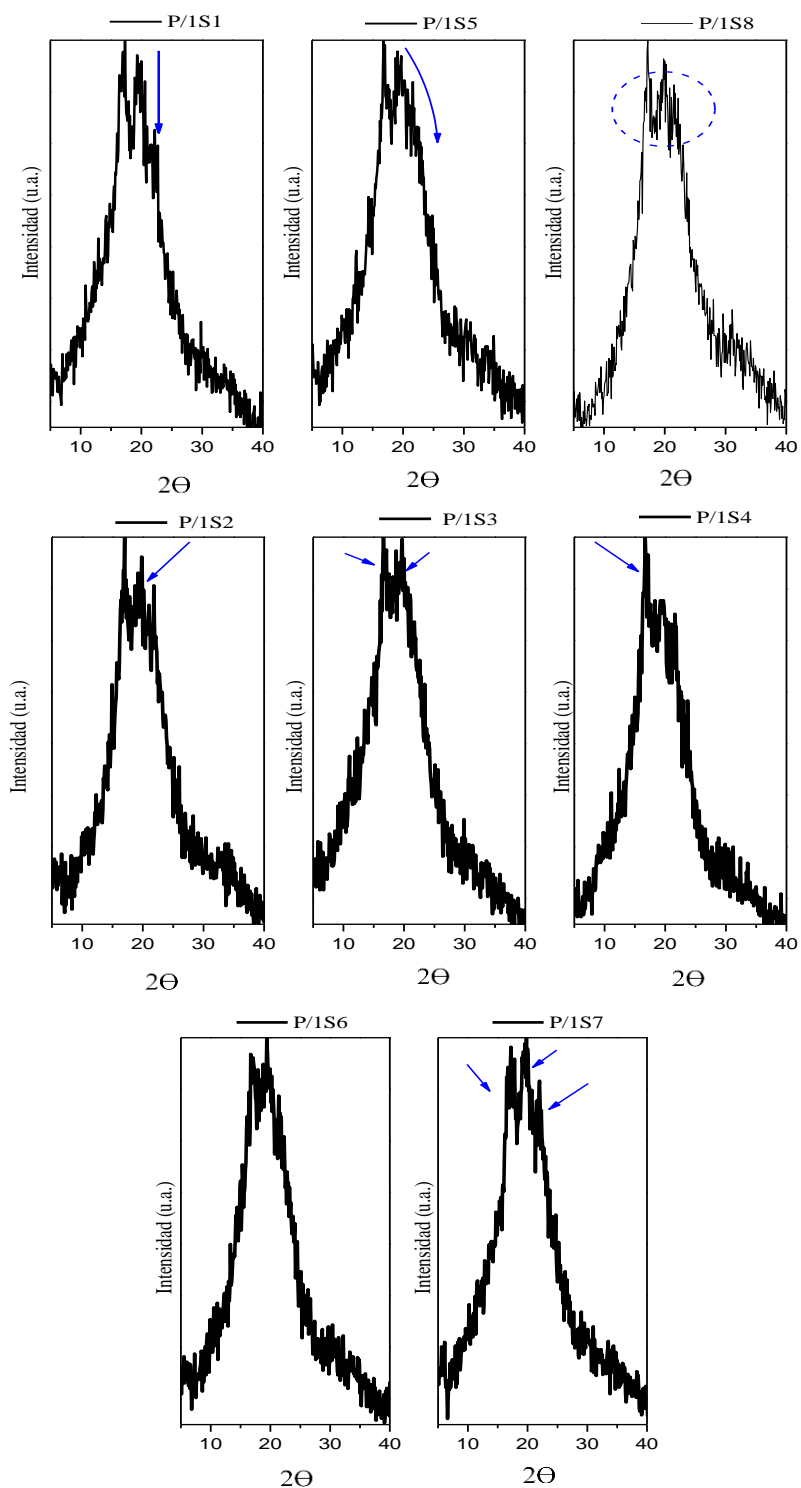


Figura 56. Difractogramas de las biopelículas almidón/AgNps con 1mM.

De acuerdo a la **Figura 56** en el difractograma de P/1S1 el pico en $2\theta = 22^\circ$ disminuye de intensidad, en P/1S5 y P/1S8 el pico en $2\theta = 17^\circ$ se ensancha, en P/1S8 el

pico que se encuentra en $2\Theta = 22^\circ$ casi desaparece. En P/1S3 el pico $2\Theta = 22^\circ$ disminuye de intensidad y se encuentra ensanchado con el pico de $2\Theta = 17^\circ$, en P/1S4 se observa que los dos últimos picos disminuyen de intensidad. Los picos del difractograma de P/1S2 son casi de la misma intensidad, mientras que para P/1S6 y P/1S7 el pico en $2\Theta = 17^\circ$ se observa más intenso que los demás.

La **Figura 57** muestra los patrones de difracción de la biopelículas almidón/AgNps con 3Mm.

De acuerdo a la **Figura 57** el difractograma de P/3S1 presenta la misma tendencia que los picos de P/Nativa, en P/3S5 y P/3S8 se observa una disminución de la intensidad del pico en $2\Theta = 22^\circ$, además los primeros picos en P/3S8 son muy finos. El patrón de difracción de P/3S2 muestra un solapamiento del pico $2\Theta = 17^\circ$ con el de $2\Theta = 22^\circ$; en P/3S3 los picos disminuyen de intensidad mientras que en P/3S4 los picos que se encuentran en $2\Theta = 14^\circ$ y $2\Theta = 17^\circ$ se hacen más finos. El patrón de difracción de P/3S7 sigue la misma tendencia que P/Nativa; en P/3S6 se observan grandes cambios en la intensidad del pico que se encuentra en $2\Theta = 22^\circ$.

Los patrones de difracción de las películas obtenidas permitieron observar cambios en la estructura cristalina del almidón. En este caso, se considera que al existir variaciones en la intensidad de los picos de difracción con respecto a los picos de difracción de la biopelícula nativa (P/Nativa) es un reflejo del efecto de las AgNps en la matriz polimérica. Se supone que el acomodo de las cadenas del almidón dependió del tipo de morfología obtenida en cada uno de los sistemas, reflejándose en ensanchamientos de los picos y la disminución de su intensidad. En general, el pico que es diferente en casi todos los sistemas es el que se encontró en $2\Theta = 22^\circ$.

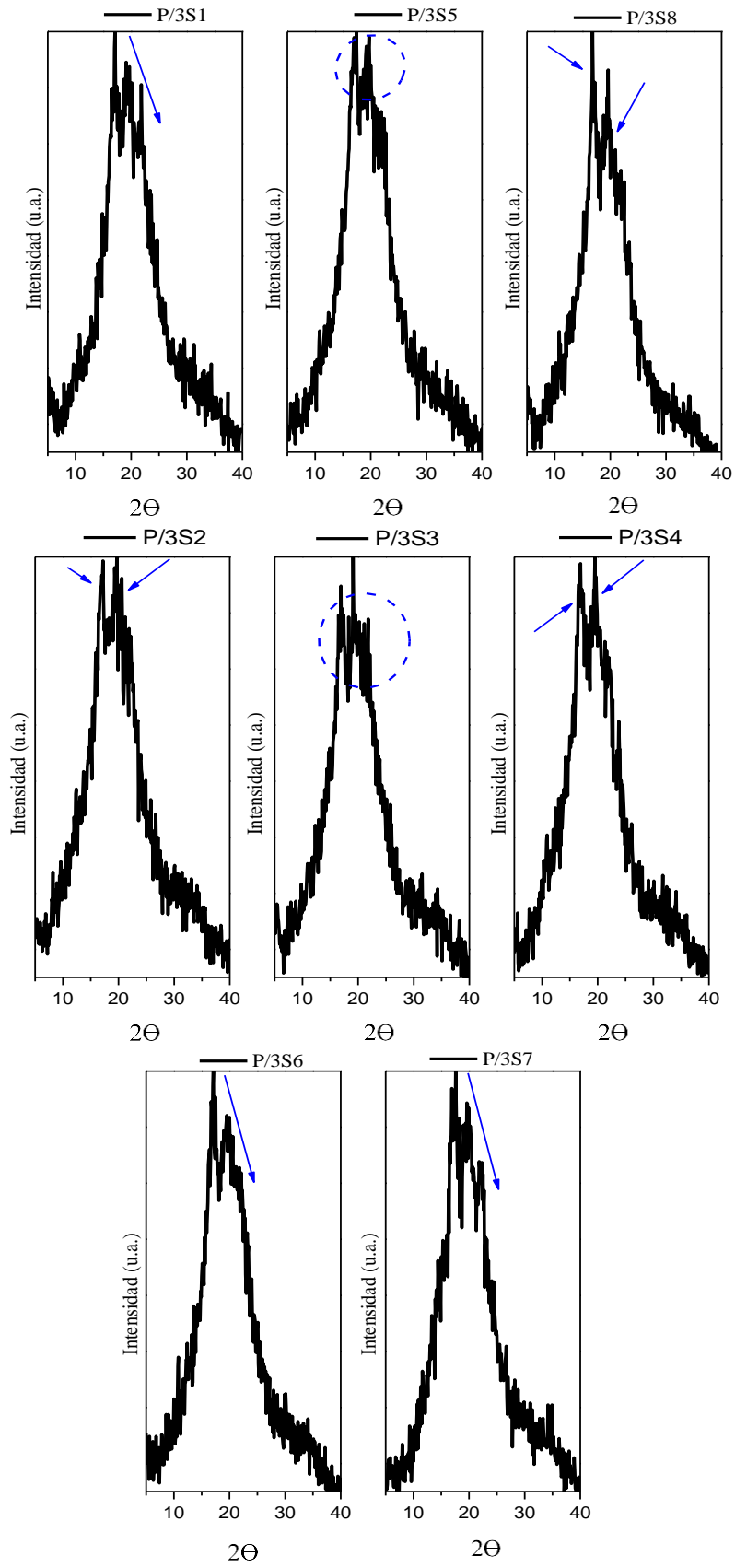


Figura 57. Difractogramas de las biopelículas almidón/AgNps con 3mM.

La **Figura 58** muestra las curvas de pérdida de peso y el cálculo de la derivada de las biopelículas de referencia.

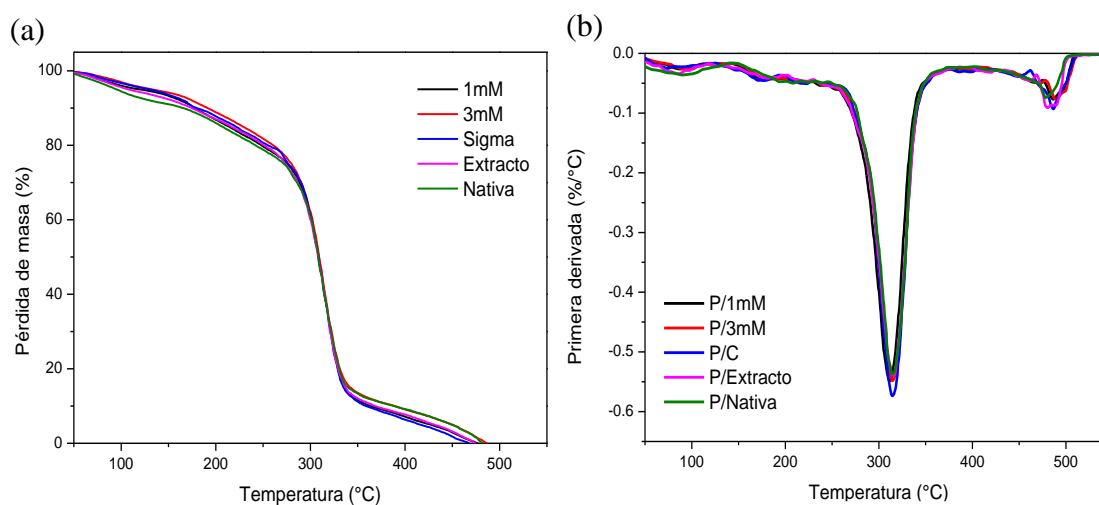


Figura 58. Biopelículas de referencia: (a) análisis termogravimétrico y (b) derivadas de las curvas de pérdida de peso.

De acuerdo a la **Figura 58** no hay diferencias significativas en los termogramas, siendo la temperatura de degradación máxima en 314 °C. No obstante, la biopelícula P/Extracto, la temperatura inicial de degradación comienza antes que en P/Nativa. Se considera que esto se debe a que existen metabolitos que empiezan su degradación antes que las cadenas de almidón.

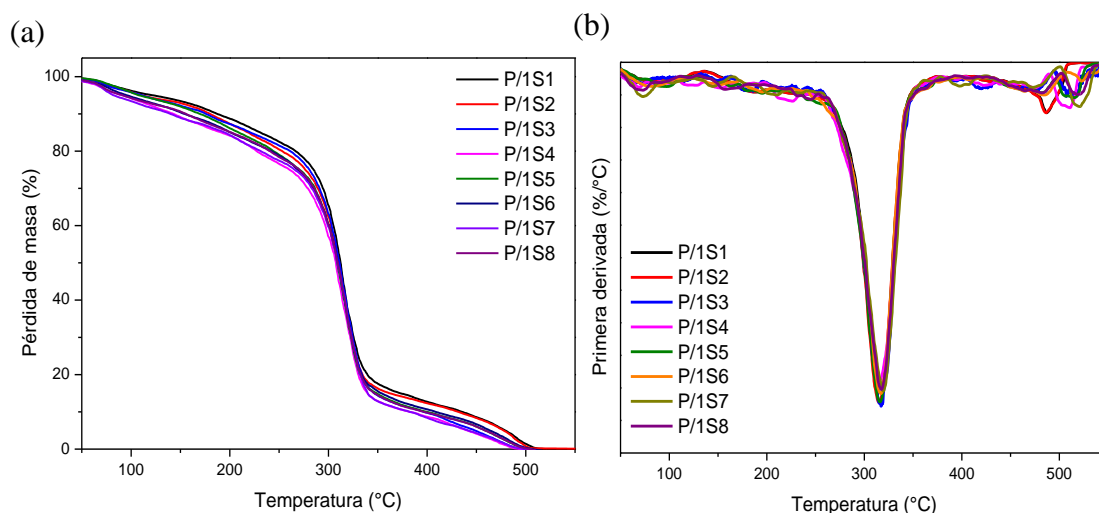


Figura 59. Biopelículas almidón/AgNps a 1mM: (a) análisis termogravimétrico y (b) derivadas de las curvas de pérdida de peso.

La **Figura 59** muestra los termogramas y sus respectivas derivadas de las biopelículas almidón/AgNps a 1mM. Las biopelículas de almidón/AgNps al 1 mM presentan una temperatura de degradación cercana a la biopelícula de P/Nativa.

La **Figura 60** muestra los termogramas y sus respectivas derivadas de las biopelículas almidón/AgNps a 3 mM.

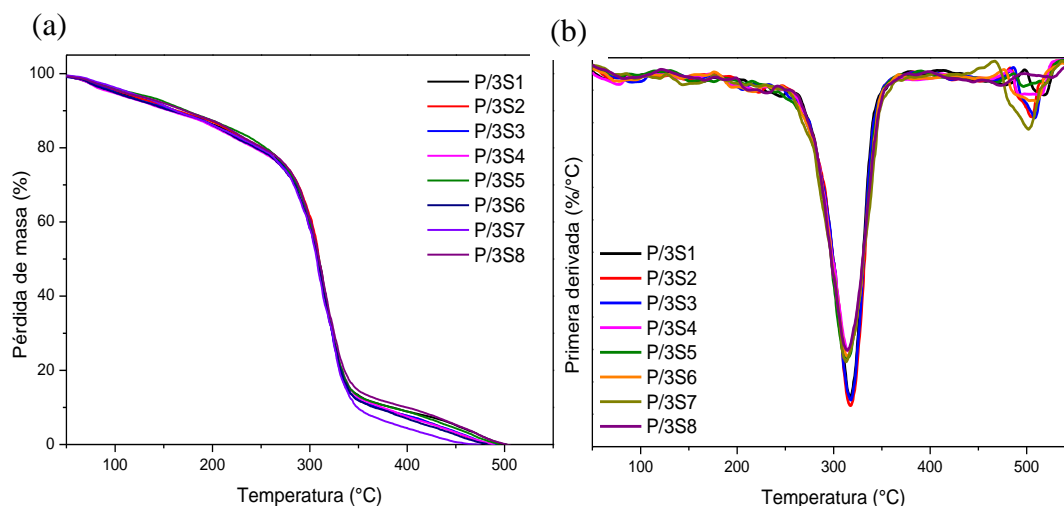


Figura 60. Biopelículas almidón/Nps a 3 mM: (a) análisis termogravimétrico y (b) derivadas de las curvas de pérdida de peso.

De acuerdo a la **Figura 60** las biopelículas P/3S2 y P/3S3 muestran su corrimiento de la temperatura de degradación máxima a 31 °C. Como se observó en el estudio por TEM, algunas AgNps de los sistemas 3S2 y 3S3 presentaron tamaños mayores a los 20 nm, posiblemente este mayor tamaño generó como consecuencia una mayor protección a las cadenas de almidón para ser degradadas.

De manera general se percibió que en las películas de referencia y 1S se observan pequeños corrimientos en la curva de degradación antes de los 200 °C, para los sistemas 3S antes de los 200 °C no se percibe el corrimiento en la curva de degradación; estos comportamientos son debidos a pequeñas variaciones en el acomodo de AgNps entre las cadenas de almidón. Sin embargo, en todos los sistemas ocurren comportamientos interesantes en la primera derivada a partir de 400 °C que se puede deber a la generación de residuos por interacción con la atmósfera de aire.

VIII. CONCLUSIONES

- El extracto de *S. rebaudiana* obtenido a 80 °C presentó mayor contenido de fenoles (0.4509 mg catequina/mg extracto seco) y flavonoides (7.5293×10^{-3} mg rutina/mg extracto seco), así como también bandas más intensas de los grupos funcionales oxigenados en su espectro FTIR, en comparación con el extracto obtenido a temperatura ambiente.
- La temperatura, la concentración y la velocidad de agregado de la sal son las variables de mayor influencia en la formación de AgNps.
- Dependiendo de las condiciones de reacción, las AgNps obtenidas mostraron morfologías diferentes y tamaños menores a 20nm, a excepción de algunas nanopartículas mayores a 50 nm. Las morfologías observadas fueron: principalmente nanoesferas, algunas nanobarras y nanoplatos triangulares y en menor cantidad nanoplatos hexagonales. La formación de nanobarras , nanoplatos triangulares y nanoplatos hexagonales se favorece cuando la sal de plata se adiciona lentamente. Las nanopartículas fueron policristalinas, forman agregados laminares, maclas y la coalescencia entre los núcleos fue sin ordenamiento homogéneo.
- El sistema 1S6 fue el que presentó morfologías con arreglos más uniformes y continuos que se logra por la incorporación lenta de la sal, uso de temperatura y agitación en el sistema de reacción. Estas variables permitieron la buena coalescencia entre los núcleos precursores de nanopartículas.
- Las biopelículas de almigón/AgNps no mostraron variación en sus características físicas (color y textura). Los patrones de difracción de las biopelículas mostraron algunas diferencias con respecto al de referencia, por lo que se considera esto como un efecto del acomodo estructural de las cadenas de almidón por causas de la presencia de las AgNps.

IX. REFERENCIAS

- [1] Medina, P., Mejía, M. T. "Monografía de la plata." *Servicio geológico mexicano (SGM)*. <https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/pdfs/Monografia%20PLATA.pdf>
- [2] Barillo, D. J., Marx, D. E. (2014). "Silver in medicine: A brief history BC 335 to present." *Burns*. 40 Supplement 1, S3-S8.
- [3] Li, H., Gao, Y., Li, C., Ma, G., Shang, Y., Sun, Y. (2016). "A comparative study of the antibacterial mechanisms of silver ion and silver nanoparticles by Fourier transform infrared spectroscopy." *Vibrational Spectroscopy*. 85, 112-121.
- [4] Molina, M., Priego, F., Luque, M.D. (2017). "Characterization of Stevia leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts." *Food Chemistry*. 219, 329-338.
- [5] Durán, S., Rodríguez, M.P., Cordon, K., Record, J. (2012). "Estevia (stevia rebaudiana), edulcorante natural y no calórico." *Revista Chilena Nutricional*. 39, 203-206.
- [6] Wikimedia Commons contributors, "File:Sweet Leaf (Stevia).jpg," *Wikimedia Commons, the free media repository*, [https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Sweet_Leaf_\(Stevia\).jpg&oldid=217543076](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Sweet_Leaf_(Stevia).jpg&oldid=217543076) (accessed May 7, 2018).
- [7] Geuns, J. (2003). "Stevioside." *Phytochemistry*. 64, 913-921.
- [8] Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovisth, D., Saranga, Y., Dudai, N. (2013). "Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under diferent planting times, plant stands and harvest regime." *Industrial Crops and Products*. 50, 731-736.
- [9] Lemus, R., Vega, A., Zura, L., Ah, K. (2012). "Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects." *Food Chemistry*. 132, 1121-1132.
- [10] Mayer, K. M., Hafner, J.H. (2011). "Localized Surface Plasmon Resonance Sensors". *Chemical Reviews*. 111, 3828-3857.

- [11] Gurunathan, S., Han, J.W., Dayem, A.A., Eppakayala, V., Park, J.H., Ssang, C., Lee, K.J., Jin, K. (2013). "Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7)." *Journal of industrial and Engineering Chemistry*. 19, 1600-1605.
- [12] Xiao, X., Tian, W., Xiao, Y. (2014). "Turning plasmon absorption of unmodified silver nanoplates for sensitive and selective detection of copper ions by introduction of ascorbate." *Chinese Chemical Letters*. 25, 1403-1406.
- [13] Amirgani, A., Marashi, P., Fatmehsari, D.H. (2014). "The effects of physicochemical parameters on the synthesis of silver nanowires via polyol method." *International Nano Letters*. 4, 108.
- [14] Hoskote, K. K., Kumar, B. (2015). "Activity study of biogenic spherical silver nanoparticles towards microbes and oxidants." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 135, 639-645.
- [15] Wu, J., Yu, C., Li, Q. (2015). "Regenerable antimicrobial activity in polyamide thin film nanocomposite membranes." *Journal of Membrane Science*. 476, 119-127.
- [16] Wu, W., Wu, M., Sun, Z., Li, G., Ma, Y., Liu, X., Wang, X., Chen, X. (2013). "Morphology controllable synthesis of silver nanoparticles: Optical properties study and SERS application." *Journal of Alloys and Compounds*. 579, 117-123.
- [17] Camargo, P.H.C., Rodrigues, T.S., da Silva, A.G.M., Wang, J. (2015). "Controlled Synthesis: Nucleation and Growth in Solution." *Metallic Nanostructures*. 49-58.
- [18] Thanh, N.T.K., Maclean, N., Mahiddine, S. (2014). "Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution." *Chemical Reviews*. 114, 7610-7630.
- [19] Blasco, G., Gómez, F.J. (2014). "Propiedades funcionales del plátano (Musa sp)." *Rev Med UV. Universidad Veracruzana*.
- [20] Zamudio, P.B. (2005). "Elaboración de películas degradables de almidón de plátano: Evaluaciones de sus propiedades mecánicas y de barrera." Tesis de Maestría en Ciencias de Desarrollo de Productos Bióticos. *Instituto Politécnico Nacional*.
- [21] Zhang, P., Whistler, R., BeMiller, J., Hamaker, B. (2005). "Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review." *Carbohydrate Polymers*. 59, 443-458.

- [22] Millán, C.E. (2004). "Estudios estructurales y moleculares del almidón de fuentes no convencionales: mango (*Mangifera indica* L.), plátano (*Musa paradisiaca*) y okenia (*Okenia hypogaea*)." Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. *Instituto Politécnico Nacional*.
- [23] Méndez, M.G. (2006). "Caracterización fisicoquímica y molecular del almidón de plátano (*Musa Paradisiaca* L. var. Macho) modificado por métodos químicos." Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. *Instituto Politécnico Nacional*.
- [24] Rivas, M. (2006). "Caracterización fisicoquímica y molecular del almidón de plátano (*Musa Paradisiaca* L. var. Macho) modificado por métodos químicos." Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos bióticos. *Instituto Politécnico Nacional*.
- [25] Pérez, D.M. (2017). "Modelado de la cinética de gelatinización parcial del almidón." Tesis Doctorado en Tecnología Avanzada. *Instituto Politécnico Nacional*.
- [26] Espinosa, V. (2008). "Estudios estructurales de almidón de fuentes no convencionales: Mango (*Mangifera indica* L.) y plátano (*Musa paradisiaca* L.)." Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. *Instituto Politécnico Nacional*.
- [27] Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y. (2009). "Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities." *Advances in Colloid and Interface Science*. 145, 83-96.
- [28] Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., Parikh, R. Y. (2010). "Biological synthesis of metallic nanoparticles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6,257-262.
- [29] Banala, R. R., Nagati, V. B., Karnati, P. R. (2015). "Green synthesis and characterization of *Carica papaya* leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties." *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 637-644.
- [30] Nayak, D., Pradhan, S., Ashe, S., Rauta, P. R., Nayak, B. (2015). "Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431 carcinoma." *Journal of Colloid and Interface Science*. 457, 329-338.

- [31] Yilmaz, M., Turkdemir, H., Kilic, M. A., Bayram, E., Cicek, A., Mete, A., Ulug, B. (2011). "Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*." *Materials Chemistry and Physics*. 130, 1195-1202.
- [32] Pelissari, F.M., Andrade, M.M., do Amaral, P.J., Menegalli, F.C. (2017). "Nanocomposites base don Banana Starch Reinforced with Cellulose Nanofibers Isolated from Banana Peels." *Journal of Colloid and Interface Science*. 505, 154-167.
- [33] Usman, A., Hussain, Z., Riaz, A., Khan, A.N. (2016). "Enhanced mechanical, thermal and antimicrobial properties of poly(vinyl alcohol)/graphene oxide/starch/silver nanocomposites films." *Carbohydrate Polymers*. 153, 592-599.
- [34] Cheviron, P., Gouanvé, F., Espuche, E. (2016). "Preparation, characterization and barrier properties of silver/montmorillonite/starch nanocomposite films." *Journal of Membrane Science*. 497, 162-171.
- [35] Agüero, D. (2015). "Efecto de la modificación de la arcilla montmorillonita sobre el comportamiento estructural y degradativo en películas de almidón/TiO₂/arcilla". Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. *Universidad del Papaloapan*.
- [36] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela, R.M. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent." *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.
- [37] Dewanto, V., Wu, Xianzhong, Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). "Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3010-3014.
- [38] Flores, E., García, F.J., Flores, E., Núñez, M.C., González, R.A., Bello, L.A. (2004). "Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de platano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto." *Acta Científica Venezolana*. 55, 86-90.
- [39] Elumalai, D., Kaleena, P.K., Ashok, K., Suresh, A., Hemavathi, M. (2016). "Green synthesis of silver nanoparticle using *Achyranthes aspera* and its larvicidal activity against three major mosquito vectors." *Engineering in Agriculture, Environment and Food*. 9, 1-8.

- [40] Kang, Y., Park, J., Jung, S.K., Chang, Y.H. (2018). "Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins." *Food Chemistry*. 245, 943-950.
- [41] Rosas, C.D., (2007). "Pigmentos fotosintéticos en la columna de agua determinados mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas (HPLC-RP): Variabilidad espacio-temporal y efectos de radiación UV." Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. *Universidad Austral de Chile*.
- [42] Cakić, M., Glišić, S., Nikolić, G., Nikolić, G. M., Cakić, K., Cvetinov, M. (2016). "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles." *Journal of Molecular Structure*. 1110, 156-161.
- [43] Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., Bajpai, V. K. (2012). "Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert." *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64, 807-811.
- [44] Maier, S. (2007). "Plasmonics: Fundamentals and Applications." *Springer*. Centre for Photonics & Photonic Materials, Department of Physics. University of Bath, United Kingdom.
- [45] Mohan, S., Oluwafemi, O.S., Kalarikkal, N., Thomas, S. (2015). "Antibacterial and sensing properties of dextrose reduced starch-capped silver nanoparticles synthesised via a completely Green method." *Materials Today Proceedings*. 2, 3943-3949.
- [46] Ávalos, A., Pérez, E. (2009). "Metabolismo secundario de plantas." *Reduca, serie de Fisiología Vegetal*. 2, 119-145.
- [47] Zia, M., Khan, M.A., Khan, T., Nadhman, A. (2016). "Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles." *Advances in Colloid and Interface Science*. 234, 132-141.
- [48] Wade, L.C. (2004). "Química Orgánica". Quinta Edición. *Pearson Prentice Hall*. 1175-1179.
- [49] Torres, A., González, V.A., Garza, M., Gauna, E. (2011). "Síntesis de nanocompuestos de plata con almidón." *Revista Ingenierías UANL*, 14, 34-41.
- [50] Monge, M. (2009). "Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas." *Investigación Química*. 105, 33-41.

[51] Khodashenas, B., Ghorbani, H.R. (2015). "Synthesis of silver nanoparticles with different shapes." *Arabian Journal of Chemistry*.

[52] Bankura, K., Maitry, D., Mollick, M. M. (2014). "Antibacterial activity of Ag–Au alloy NPs and chemical sensor property of Au NPs synthesized by dextran." *Carbohydrate Polymers*. 107, 151-157.

[53] Barua, S., Mitragotri, S. (2014). "Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects." *Nano Today*, 9, 223-243.

[54] Cheviron, P., Gouanvé, F., Espuche, E. (2015). "Starch/silver nanocomposite: Effect of thermal treatment temperature on the morphology, oxygen and water transport properties." *Carbohydrate Polymers*. 134, 635-645.

[55] Cristescu, R., Visan, A., Socol, G., Surdu, A.V., Oprea, A.E., Grumezscu, A.M., Chifiriuc, M.C., Boehm, R.D., Yamaleyeva, D., (2016). "Antimicrobial activity of biopolymeric thin films containing flavonoid natural compounds and silver nanoparticles fabricated by MAPLE: A comparative study." *Applied Surface Science*. 374, 290-296.

[56] Deng, Y., Li, J., Pu, Y., Chen, Y., Zhao, J., Tang, J. (2016). "Ultra-fine silver nanoparticles dispersed in mono-dispersed amino functionalized poly glycidyl methacrylate based microspheres as an effective anti-bacterial agent." *Reactive and Functional Polymers*. 103, 92-98.

[57] Kharissova, O. V., Dias, H. V., Kharisov, B., Pérez, B., Pérez, V. (2013). "The greener synthesis of nanoparticles." *Trends in Biotechnology*. 31, 240-248.

[58] Macocinschi, D., Filip, D., Zaltariov, M., Varganici, C. (2015). "Thermal and hydrolytic stability of silver nanoparticle polyurethane biocomposites for medical applications." *Polymer Degradation and Stability*. 121, 238-246.

[59] Mittal, A. K., Chisti, Y., Banerjee, U. (2013). "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts." *Biotechnology Advances*. 31, 346-356.

[60] Mohan, S., Oluwafemi, O. S., Songca, S. P., Jayachandran, V. P., Rouxel, D., Joubert, O., Kalarikkal, N., Thomas, S. (2016). "Synthesis, antibacterial, cytotoxicity and

sensing properties of starch-capped silver nanoparticles." *Journal of Molecular Liquids*. 213, 75-81.

[61] Raho, R., Paladini, F., Lombardi, F., Boccarella, S., Zunino, B., Pollini, M. (2015). "In-situ photo-assisted deposition of silver particles on hydrogel fibers for antibacterial applications." *Materials Science and Engineering*. 55, 42-49.

[62] Rehan, M., Mashaly, H. M., Mowafi, S., Abou El-Kheir, A., Emam, H. E. (2015). "Multi-functional textile design using in-situ Ag NPs incorporation into natural fabric matrix." *Dyes and Pigments*. 118, 9-17.

[63] Selvam, C., Muhammed Irshad, E. C., Lal, D. M., Harish, S. (2016). "Convective heat transfer characteristics of water–ethylene glycol mixture with silver nanoparticles." *Experimental Thermal and Fluid Science*. 77, 188-196.

[64] Sivaranjani, V., Philominathan, P. (2016). "Synthesize of Titanium dioxide nanoparticles using Moringa oleifera leaves and evaluation of wound healing activity." *Wound Medicine*. 12, 1-5.

[65] Vasanth, K., Llango, K., MohanKumar, R., Agrawal, A., Dubey, G.P. (2014). "Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction." *Colloids Surf B Biointerfaces*. 117, 354-359.

[66] Wojcieszak, D., Mazur, M., Kaczmarek, D., Szponar, B., Grobelny, M., Kalisz, M., Pelczarska, A., Szczygiel, I., Poniedzialek, A., Osekowska, M. (2016). "Structural and surface properties of semitransparent and antibacterial (Cu,Ti,Nb)Ox coating." *Applied Surface Science*. 380, 159-164.

