UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FÍSICA Y QUÍMICA

SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA APLICACIONES COMO FUNGICIDA EN LOS FITOPATÓGENOS *Fusarium solani* Y/O *Rhizopus stolonifer* QUE ATACAN LA PLANTA DE AGUACATE

Green synthesis of silver nanoparticles to applications as a fungicide in the phytopathogens *Fusarium solani* and/or *Rhizopus stolonifer* that attack the avocado plant

MEMORIA DE TESIS DE MAESTRÍA

Ing. JHOAN MAURICIO MORENO VARGAS

Manizales, Colombia

2021

SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA APLICACIONES COMO FUNGICIDA EN LOS FITOPATÓGENOS *Fusarium solani* Y/O *Rhizopus stolonifer* QUE ATACAN LA PLANTA DE AGUACATE

Green synthesis of silver nanoparticles to applications as a fungicide in the phytopathogens *Fusarium solani* and/or *Rhizopus stolonifer* that attack the avocado plant

Memoria de Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ciencias-Física.

Ing. JHOAN MAURICIO MORENO VARGAS
Directora: PhD. ELISABETH RESTREPO PARRA
Codirector: LUIS EDGAR MORENO MONTOYA

LABORATORIO FÍSICA DE PLASMA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física y Química
Manizales, Colombia
2021

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS 7
RESUMEN 8
ABSTRACT 11
INTRODUCCIÓN 13
1.1. Formulación del problema 16
1.2. Objetivo general 16
1.3. Objetivos específicos 16
1.4. Hipótesis 16
CAPÍTULO 1 MARCO CONCEPTUAL 17
1.1. Introducción 18
1.2. Nanomateriales: definición y clasificación. 18
1.3. Nanopartículas: clases, métodos de síntesis y aplicaciones generales 19
1.4. Nanopartículas de plata 26
1.5. Técnicas de caracterización de las nanopartículas de plata 30
1.5.1. Espectroscopia ultravioleta visible UV-VIS 30
1.5.2. Difracción de Rayos X (XRD) 31
1.5.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 32
1.5.4. Dispersión dinámica de luz (DLS) 33
1.5.5. Espectroscopia de absorción atómica (EAA) 34
1.5.6. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) 36
CAPÍTULO 2 ETAPA EXPERIMENTAL 37
2.1. Introducción 38
2.2. Materiales 38
2.3. Equipos 39
2.4. Selección de reactivos 40
2.5. Pruebas preliminares 40
2.6. Estandarización del proceso de síntesis de AgNPs 43
2.7. Caracterización del extracto 47
2.8. Caracterización de las AgNPs 47
2.9. Pruebas microbiológicas 48
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 50

3.1. Introducción 51
3.2. Espectroscopia UV-vis 51
3.3. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) 53
3.4. Difracción de Rayos X (XRD) 55
3.5. DISPERSION DINAMICA DE LUZ 58
3.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 60
3.7. Espectroscopia de absorción atómica 62
3.8. Pruebas microbiológicas (Difusión en agar) 62
CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES 69
CAPÍTULO 5 PERSPECTIVAS Y FUTUROS TRABAJOS 71
BIBLIOGRAFÍA 73

Índice de figuras

Figura 1.1 Técnicas de síntesis de nanopartículas según los enfoques Top-down y Bottom-Up (Khan, I. *et al*., 2017) 22
Figura 1.2 Fases de la síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos de plantas (Shafey, 2020) 24
Figura 1.3 Relación entre el tamaño y la forma de las NPs de plata con el pico de absorción característico en UV-Vis (Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón, 2019) 31
Figura 1.4 Esquema de difracción y ley de Bragg (Fuente propia) 31
Figura 1.5 Esquema difractómetro de rayos X (Flores, 2014) 32
Figura 1.6 Esquema del microscopio electrónico de barrido (Salguero Salas, 2016) 33
Figura 1.7 Esquema de dispersión dinámica de luz (Giudice, 2017) 34
Figura 1.8 Esquema espectroscopia de absorción atómica (Martínez, 2020) 35
Figura 1.9 Concentración versus absorbancia - curva de calibración (Martínez, 2020). ... 36
Figura 2.1 Espectros UV-vis de diferentes métodos preliminares ensayados 41
Figura 2.2 Espectros UV-vis de repeticiones del método 5 estandarizado (ME). 43
Figura 2.3 Diagrama de precedencia de las principales etapas para la síntesis de nanopartículas de plata. Fuente: Autor 44
Figura 2.4 Secuencia de actividades conducentes a la obtención del extracto de cilantro. Fuente: autor. 45
Figura 2.5 Mezcla de reactivos y precipitación de las nanopartículas. Fuente: autor. 46
Figura 2.6 Ideograma que ilustra el proceso de síntesis de nanopartículas. Fuente: autor. 47
Figura 3.1 Espectro UV-vis de nanopartículas de plata. 52
Figura 3.2 Espectro FTIR de extracto de cilantro (Coriandrum sativum). 54
Figura 3.3 Difractograma XRD de nanopartículas de plata. 55
Figura 3.4 Difractograma XRD de nanopartículas de plata entre 2 theta =30°y 48°. 56
Figura 3.5 Distribución de tamaño de partícula por DLS 59
Figura 3.6 Diámetro hidrodinámico comparado con diámetro determinado en SEM 60
Figura 3.7 Imagen de microscopia electrónica de barrido de las NPs de plata SEM 61
Figura 3.8 Registro fotográfico del crecimiento del hongo *Fusarium solani* 63
Figura 3.9 Porcentaje de inhibición para *Fusarium* en el tiempo 64
Figura 3.10 Registro fotográfico del crecimiento del hongo *Rhizopus stolonifer* 65
Figura 3.11 Porcentaje de inhibición para *Rhizopus* en el tiempo 67

Índice de tablas

Tabla 2.1 Descripción de materiales empleados. 38
Tabla 2.2 Descripción de equipos empleados 39
Tabla 2.3 Condiciones relevantes de los métodos preliminares aplicados para la síntesis de AgNPs……...41
Tabla 3.1 Cálculo de valores de sen2θ a partir de los datos de XRD 57
Tabla 3.2 Diámetro con su desviación estándar de crecimiento del *Fusarium solani* en función del tiempo, para diferentes concentraciones de NPs de plata 64
Tabla 3.3 Diámetro con su desviación estándar de crecimiento del *Rhizopus stolonifer* en función del tiempo, para diferentes concentraciones de NPs de plata 64

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por el apoyo académico brindado durante el proceso formativo de este posgrado.

- A la profesora Elisabeth Restrepo Parra por su apoyo y motivación en los diferentes momentos de esta investigación, así como por la gestión de recursos para el desarrollo de este proyecto.

- A mi padre, por su compañía constante y asesoría en temas académicos y de redacción de este documento.

- Al laboratorio de física del plasma, por darme la oportunidad de hacer parte de ese grupo de trabajo que permite impulsar mis capacidades investigativas.

- A mis compañeros del laboratorio física del plasma, en especial a Laura María Echeverry, por su apoyo incondicional.

- Al grupo del Tecno-parque del Sena regional Manizales, por su gran colaboración y asesoría en temas relacionados con las pruebas microbiológicas.

- A mi madre, hermano y prometida, por su apoyo y motivación constante, compañía y amor.

- A Dios por darme la oportunidad de progresar día a día e ir alcanzando uno a uno los objetivos de vida propuestos.

RESUMEN

El propósito de este documento es exponer de una manera ordenada y sistemática el proceso que se llevó a cabo para sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) con el objetivo de evaluar el efecto derivado de poner en contacto estos materiales en solución con los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium solani*, que atacan la planta de aguacate. La obtención de las nanopartículas de plata se produjo por medio de un método biológico conocido como síntesis verde. El método consiste en mezclar una solución que contiene iones de plata, denominada agente precursor, con un extracto de hojas de cilantro denominado agente reductor. Para llegar a un método estándar a partir del cual se pudieron obtener las nanopartículas, se probaron diferentes métodos variando algunos parámetros relacionados con el agente precursor y con el agente reductor. Una vez los espectros de UV-Vis confirmaron la evidencia de la presencia de nanopartículas se procedió a estandarizar y aplicar dicho método.

La formación de las AgNPs empleando el extracto de hojas de cilantro como agente reductor fue monitoreada a través de espectroscopia UV-Vis. Como resultado, se obtuvo un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 428±1,5 nm, característico de la excitación del plasmón superficial de las AgNPs.

A partir de los resultados de difracción de rayos-X (XRD), se pudo comprobar que la estructura cristalina del material analizado es cúbica centrada en las caras (FCC), y que el parámetro de red calculado es 0,4075 nm, características que corresponden al metal plata.

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), utilizada para determinar el tamaño hidrodinámico mostró que existe una alta dispersión en cuanto al tamaño de las AgNPs obtenidas. Este resultado fue corroborado mediante el análisis por SEM, técnica que demostró que las nanopartículas son de diferentes tamaños y formas irregulares, aunque con tendencia a ser esféricas.

El extracto de hojas de cilantro se sometió a un análisis de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Con la ayuda de esta técnica se logró identificar la presencia de grupos funcionales hidroxilo, carbonilo y carboxilo, los cuales, participan en la reducción de los iones de plata, para formar las nanopartículas.

Finalmente se llevó a cabo el experimento denominado prueba por difusión en agar, con el objetivo de evaluar el efecto de las nanopartículas sintetizadas al colocarlas en contacto con los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium solani*. Se utilizaron cuatro concentraciones de nanopartículas 0,1; 0,2; 0,5 y 1,0 mg/ml y se evaluó el comportamiento a las 24, 48 y 120 horas. Se observó una relación directa entre la concentración y el porcentaje de inhibición lo que conduce a concluir que efectivamente las AgNPs tienen propiedades antifúngicas.

Palabras claves: NANOPARTÍCULAS DE PLATA, ANTIFUNGICO, SINTESIS VERDE, FITOPATÓGENOS, PLANTA DE AGUACATE

ABSTRACT

The purpose of this document is to expose in an orderly and systematic way the process that was carried out to synthesize silver nanoparticles to evaluate the effect derived from putting these materials in contact in solution with the fungi *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, which attack the avocado plant. The silver nanoparticles were obtained using a biological method known as green synthesis. The method involves mixing a solution containing silver ions, called a precursor agent, with an extract of coriander leaves called a reducing agent. To arrive at a standard method from which the nanoparticles could be obtained, different methods were tested by varying some parameters related to the precursor agent and the reducing agent. Once the UV-vis spectra confirmed the evidence of the presence of nanoparticles, this method was standardized and applied.

The formation of silver nanoparticles using coriander leaf extract as a reducing agent was monitored through UV-Vis spectroscopy. As a result, a maximum peak of absorption was obtained at a wavelength of 428±1.5 nm, characteristic of the excitation of the surface plasmon of silver nanoparticles.

From the results of XRD, it was possible to verify that the crystal structure of the analyzed material is cubic centered on the faces (FCC) and that the calculated lattice parameter is 0.4075 nm, characteristics that correspond to the silver metal.

The dynamic light scattering (DLS) technique, used to determine the hydrodynamic size, showed that there is a high dispersion in terms of the size of the silver NPs obtained. This result was corroborated by analysis by SEM, a technique that also showed that the nanoparticles are of different sizes and irregular shapes, although with a tendency to be spherical.

The coriander leaf extract underwent a Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis. With the help of this technique, it was possible to identify the presence of hydroxyl, carbonyl and, carboxyl functional groups, which participate in the reduction of silver ions, to form nanoparticles.

The experiment called diffusion test in agar was carried out, to evaluate the effect of the synthesized nanoparticles when placed in contact with the fungi *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*. Four concentrations of 0.1 nanoparticles were used; 0,2; 0.5 and 1.0 mg/ml and the behavior was evaluated at 24, 48 and 120 hours. A direct relationship between the concentration and the percentage of inhibition was observed, which leads to the conclusion that silver nanoparticles do indeed have antifungal properties.

Keywords: fungicide, avocado plant, silver nanoparticles, phytopathogens, Green synthesis.

INTRODUCCIÓN

Los materiales están en el centro de todos los avances tecnológicos. La realidad de esta afirmación se hace evidente al considerar el progreso espectacular que se ha hecho en los últimos años en campos tan diversos como la energía, las telecomunicaciones, el transporte, la construcción, la optoelectrónica y la medicina. El dominio del desarrollo, la síntesis y el procesamiento de los materiales abre oportunidades para contribuir al avance científico tecnológico de la sociedad y de esta manera aportar a la calidad de vida y a la fortaleza económica de un país.

La nanotecnología ha captado hoy en día un gran interés y se proyecta como una alternativa prometedora a diversos problemas que aquejan a la humanidad en campos tan diversos como la medicina, la alimentación, la generación de energía, la protección del medio ambiente y la agricultura entre otras. A través del control y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia en la nanoescala, la nanotecnología incursiona en múltiples campos entre los cuales podemos mencionar la síntesis y las aplicaciones de los materiales en estas dimensiones.

Los materiales en la nanoescala al parecer los ha utilizado el ser humano desde tiempos muy remotos, aunque no intencionalmente. Sin embargo, en la actualidad se han convertido en objeto de investigación permanente debido a que se han descubierto excepcionales propiedades que son diferentes a las del mismo material en una escala micro o macro. Ahora bien, para poder estudiar sus propiedades es necesario primero producirlos o sintetizarlos, lo cual no es sencillo. Por esta razón, los esfuerzos de muchos investigadores se han enfocado en el desarrollo de técnicas conducentes, ya sea para tratar de reducir materiales del nivel macro al nivel nano o por el contrario, construirlos átomo a átomo, empleando para cada caso métodos físicos, químicos o biológicos o una combinación de estos.

Los métodos de síntesis que se reportan en la literatura científica presentan diferencias significativas en cuanto a las propiedades finales de los materiales que se producen, su grado de complejidad, el consumo de energía, el costo y en particular el impacto que pueden generar para el medio ambiente. Atendiendo a estos factores, la tendencia es utilizar métodos sencillos, de bajo costo y mínimo

impacto ambiental, en este contexto, la síntesis verde o biosíntesis de nanomateriales se destaca como una de las alternativas más atractivas.

De otra parte, las aplicaciones que se le están dando y las que se proyectan para estos materiales son innumerables y muy llamativas. En la medicina se están utilizando para administrar medicamentos en dosis óptimas y para el diagnóstico y terapia del cáncer. En el campo ambiental y la salud humana, en la eliminación de metales pesados en el agua. En el sector de la energía, se prevé que estos materiales son una muy buena alternativa para generar energías renovables. En la agricultura moderna, la nanotecnología promete aportar soluciones mediante el uso de nanopartículas (NPs) para el control de microorganismos patógenos, debido a que estos materiales poseen propiedades antifúngicas, antivirales y antibacteriales que se pueden usar para el control de microorganismos como hongos, virus y bacterias que atacan a las plantas.

Atendiendo a este contexto se emprendió la investigación que se reporta en este documento, cuyo objetivo se orientó a la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) por ruta verde utilizando el extracto de la planta de cilantro como agente reductor, la caracterización mediante técnicas físico-químicas de las AgNPs obtenidas y posteriormente la evaluación de sus efectos sobre los hongos *Fusarium solani* y/o *Rhizopus stolonifer* que atacan a la planta del aguacate.

El capítulo dos contiene el marco conceptual, en el cual, se revisan los aspectos teóricos que le dan soporte al tema de la investigación. Allí se encuentran definiciones acerca de los nanomateriales y su clasificación con base en diferentes criterios. Se profundiza en el tema de las nanopartículas en aspectos tales como: definición, clasificación y métodos de síntesis, haciendo especial énfasis en la síntesis verde basada en extractos de plantas. Luego se aborda el tema de las nanopartículas de plata, métodos de síntesis, aplicaciones y técnicas de caracterización. Dentro de las aplicaciones de estos materiales se enfatiza en su uso como material apropiado para combatir hongos y bacterias que atacan a las plantas.

El capítulo tres se enfoca en la etapa experimental. Allí se detallan aspectos tales como: los materiales y equipos utilizados en la síntesis de las AgNPs y en el experimento microbiológico. Se hace una descripción de los experimentos preliminares que sirvieron de base para llegar a un método estandarizado de síntesis de AgNPs. Además, se explican los procedimientos para producir el extracto de cilantro y para obtener las nanopartículas. Por último, se hace alusión a las técnicas de caracterización utilizadas, los equipos y su propósito.

En el capítulo cuatro se muestran los resultados y la discusión de los mismos, en este se pretende exponer la explicación física tras cada fenómeno.

Por último, se presentan las conclusiones del trabajo, algunas recomendaciones que pueden ser un insumo para futuras investigaciones y la bibliografía respectiva.

1.1. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto sobre el crecimiento de *Fusarium solani* y/o *Rhizopus stolonifer*. principales fitopatógenos que atacan a la planta del aguacate, al colocarlos en contacto con NPs de plata?

1.2. Objetivo general

Producir nanopartículas de plata (AgNPs) por síntesis verde y evaluar sus efectos sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solani* y/o *Rhizopus stolonifer*.

1.3. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de plata por ruta verde utilizando el extracto de la planta de cilantro (*Coriandrum sativum*) como agente reductor.
2. Caracterizar mediante técnicas físico-químicas las nanopartículas de plata obtenidas.
3. Evaluar los efectos sobre el hongo *Fusarium solani* y/o *Rhizopus stolonifer* generados por el contacto con las nanopartículas de plata con diferentes concentraciones.

1.4. Hipótesis

Las NPS de plata sintetizadas por ruta verde a partir del extracto de la planta de cilantro afecta el crecimiento del hongo (*Fusarium solani* y/o *Rhizopus stolonifer*.) que ataca la planta del aguacate.

CAPÍTULO 1
MARCO CONCEPTUAL

1.1. Introducción

A continuación, se desarrolla el tema de las NPs, incluyendo aspectos relacionados con su clasificación, los métodos de síntesis y en particular, haciendo énfasis en la síntesis biológica o verde. Se mencionan algunas características y aplicaciones de las NPs, en diferentes campos. Por último, se centra la exposición en el tema de las AgNPs, haciendo alusión a algunas características físico-químicas, métodos de síntesis más utilizados, el extracto de hojas de cilantro como agente reductor para la síntesis verde de estas NPs, así como algunas aplicaciones, y técnicas de caracterización.

1.2. Nanomateriales: definición y clasificación.

La investigación en nuevos materiales es una constante en todos los campos de la ingeniería. Los investigadores enfocan sus esfuerzos en desarrollar materiales con propiedades excepcionales para implementar en aplicaciones desconocidas y para avanzar en el desarrollo de nuevas tecnologías (Gutierrez Vazquez & Oñoro, 2008). Dentro de este campo son numerosas las investigaciones que se están haciendo en materiales compuestos, biomateriales, materiales inteligentes, metales celulares también conocidos como espumas metálicas y por supuesto en nanomateriales.

El grupo de los nanomateriales se ha convertido en objeto de intensa investigación en los últimos años, debido a que en tales materiales sus propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y magnéticas son muy diferentes a las de los mismos materiales en *bulk*, gracias a que la proporción de átomos en la superficie con respecto al interior es mucho más alta que en materiales de tamaño más elevado. Por consiguiente, si se reducen las dimensiones de un material, se modifican sus propiedades (Díaz del Castillo Rodríguez, 2012).

Según Trapiella Alfonso (2013), se definen los nanomateriales como materiales que contienen partículas con una o más dimensiones entre 1 y 100 nanómetros. No obstante, la Comisión Europea recomienda considerarse un nanomaterial como un material de partículas sueltas o aglomeradas en el cual por lo menos la mitad de sus partículas presenten tamaños comprendidos entre 1 y 100 nanómetros, sugiere,

además, qué se incluya dentro de los materiales nanométricos a los alótropos del carbono, como los fullerenos, nanotubos de carbono, el grafeno, entre otros, en los que una o más de sus dimensiones son menores a 1 nanómetro. También indica, que dentro de la definición deben incluirse los materiales cuya relación superficie específica por unidad de volumen sea superior a 60 m^2/cm^3, sin ser este un parámetro excluyente (INSHT 2015).

Los nanomateriales pueden ser estudiados y clasificados teniendo en cuenta diferentes criterios: según su origen, su composición química o su estructura dimensional (Cornejo, 2015). Según su origen, los nanomateriales pueden ser naturales, manufacturados o incidentales. Según su composición química se pueden clasificar en nanomateriales basados en metales, nanomateriales base carbono, dendrímeros y nanocompuestos (Díaz del Castillo Rodríguez, 2012).

Una de las clasificaciones más utilizadas en la literatura y por la comunidad científica, es la clasificación según la tipología dimensional de su estructura en la cual los nanomateriales se categorizan según la cantidad de dimensiones del material que superan la escala nanométrica. Bajo este criterio, estos materiales se clasifican en 0-D, 1-D, 2-D y 3-D (Sánchez Moreno, 2017; Trapiella Alfonso, 2013). Los nanomateriales 0-D son aquellos en los cuales todas sus dimensiones están dentro de la nanoescala, es decir, ninguna dimensión es mayor a 100 nm. Los nanomateriales 1-D son los que poseen una dimensión fuera de la nanoescala, tienen forma acicular o de aguja e incluyen los nanotubos, nanobarras y nanoalambres (Sánchez Moreno, 2017). Los nanomateriales 2-D, son aquellos en los cuales, dos dimensiones no están confinadas en la nanoescala, presentan forma laminar e incluyen nanofilms, nanocapas o nanorecubrimientos (Sánchez Moreno, 2017). Finalmente, los nanomateriales 3-D engloban a todos aquellos nanomateriales 0-D, 1-D y 2-D que se pueden ensamblar formando estructuras tridimensionales policristalinas (Ortega-Liébana, 2018).

1.3. Nanopartículas: clases, métodos de síntesis y aplicaciones generales

La representación más común de materiales 0-D, son las nanopartículas. Según Hernández Díaz (2013), una nanopartícula típica se compone de pequeñas

“partículas primarias”, las cuales tienen una relación de superficie-volumen muy alta. Poseen cerca del 98, 40 y 10 % del total de sus átomos sobre la superficie o en los límites de grano, si sus partículas primarias son del orden de 1, 5 y 20 nm respectivamente. La alta proporción de átomos en su superficie y en los límites de grano es responsable de la diferencia de propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas y magnéticas entre las NPs con respecto a los materiales nanoestructurados. Las nanopartículas pueden ser monocristalinas o policristalinas, amorfas o cristalinas, elementales o compuestos químicos. Con base en sus características físico-químicas, pueden ser: basadas en carbono, cerámicas, semiconductoras (Q-dots), poliméricas, basadas en lípidos y metálicas (Khan et al., 2017)

Según Kumar K *et al*. (2018), las NPs metálicas son metales de tamaño nanométrico con dimensiones (longitud, ancho, espesor) dentro de un rango de tamaño comprendido entre 1 y 100 nm. También se definen como entidades o agregados aislados de átomos metálicos, generalmente de forma esférica de entre 1 y 100 nanómetros, rodeados de una capsula estabilizadora que evita su aglomeración y mantiene una alta relación área superficial-volumen (Díaz del Castillo Rodríguez, 2012; Hernández Díaz, 2013). Las NPs metálicas están hechas exclusivamente de precursores metálicos (Khan *et al.*, 2017) y según INSHT (2015), la mayoría de los metales y sus aleaciones pueden producirse en dimensiones nanométricas, siendo el oro, la plata, el cobre, el titanio, el zinc y las aleaciones de platino y paladio las de mayor producción.

Existen actualmente numerosos métodos, técnicas o rutas de síntesis de NPs. Estos pueden clasificarse de acuerdo con su estrategia de síntesis, fuentes de energía utilizadas o de acuerdo con la naturaleza del proceso (Hernández Díaz, 2013). Según la estrategia de síntesis, los diferentes métodos suelen agruparse en dos categorías o enfoques: 1) el enfoque *Top-down* (enfoque descendente), cuyas técnicas se basan en el uso de materiales a granel, los cuales se reducen para formar NPs mediante procesos físicos, químicos o mecánicos, por ejemplo: por molienda mecánica o por litografía la cual permite esculpir un material en escala macroscópica hasta la nanoescala utilizando técnicas de ataque químico (disolución

con ácidos o disolventes) o físico (bombardeo de iones), y 2) el enfoque *Bottom-up* (enfoque ascendente), cuyas técnicas se basan en el crecimiento o ensamblado de estructuras nanométricas a partir de precursores moleculares con una escala inferior a la de los nanomateriales (Ortega-Liébana, 2018). A su vez, las técnicas *Bottom-up* se pueden clasificar en técnicas en fase gaseosa y técnicas en fase líquida, según el entorno físico en el que se producen (Ortega-Liébana, 2018). En la figura 1.1, se muestra un esquema de la clasificación de las técnicas de síntesis de NPs según la estrategia de síntesis.

La energía esta siempre involucrada en la síntesis de NPs. Los métodos de síntesis de NPs pueden clasificarse en función de los tipos de energía usados en el proceso de síntesis. Algunos ejemplos de estos métodos son: rayos láser, plasma, calentamiento Joule, pulverización catódica (sputtering), rayo de electrones, microondas, hidrotérmico, liofilización, combustión y flama (Hernández Díaz, 2013).

Según Hernández Díaz (2013), en las diferentes técnicas o métodos para la síntesis de NPs pueden involucrarse procesos físicos, químicos, biológicos, o inclusive alguna combinación de estos, por tanto, según la naturaleza del proceso, las técnicas o métodos se pueden clasificar en: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos (Sánchez Moreno, 2017; Siddiqi et al., 2018).

La mayoría de los métodos de síntesis, tanto físicos como químicos, implican costos considerables por el gasto energético y/o los reactivos necesarios para los procesos de obtención de NPs, además de que en muchos casos generan implicaciones medioambientales ya sea por el consumo de energía o por la producción de subproductos químicos altamente contaminantes (Ahmad et al., 2003; Huang et al., 2007; Iravani, 2011). Como alternativa para disminuir el impacto ambiental y reducir los costos, ha surgido la síntesis verde para la obtención de NPs (Hernández Díaz, 2013; Iravani, 2011).

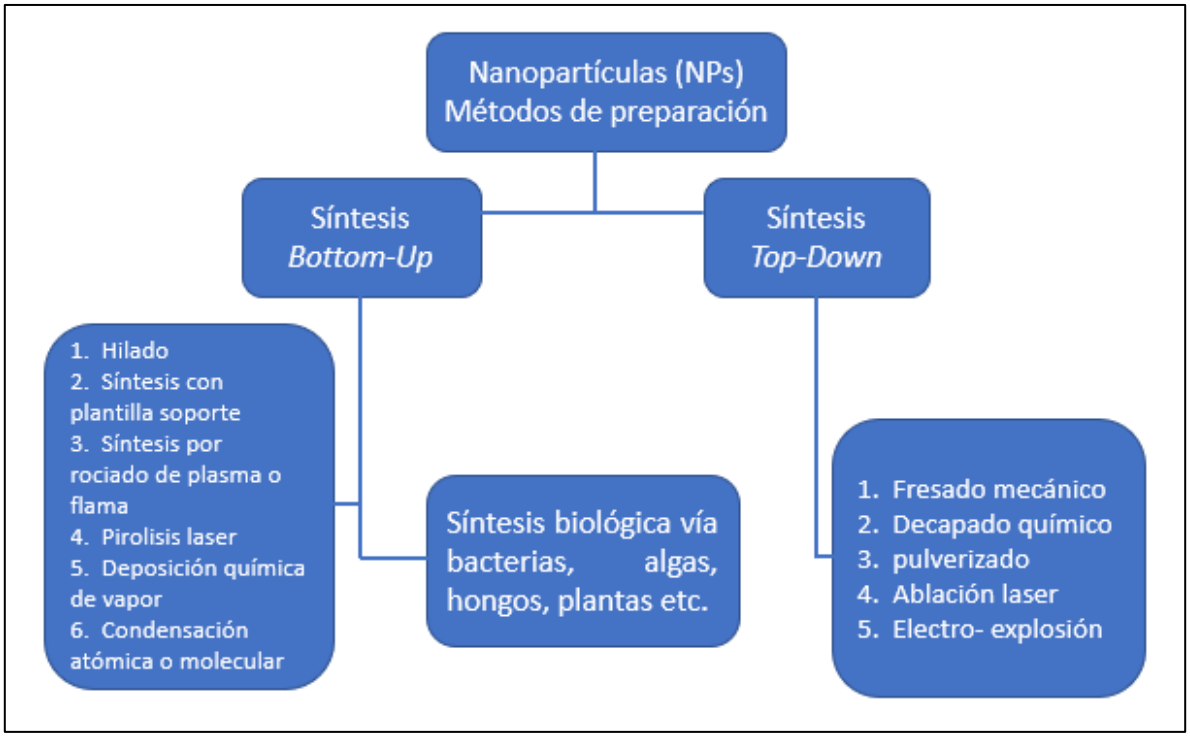


Figura 1.1 Técnicas de síntesis de nanopartículas según los enfoques Top-down y Bottom-Up (Khan, I. et al., 2017)

La síntesis verde o biosíntesis como método biológico ofrece a su vez diferentes alternativas para su aplicación en el proceso de síntesis de NPs metálicas. En este método, se pueden utilizar bacterias, actinomicetos, hongos, levaduras, algas y partes de plantas (tallo, hojas, o semillas), para sintetizar NPs metálicas (Hernández Díaz, 2013; Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón, 2019; Salguero Salas, 2016; Siddiqi *et al*., 2018).

Según Singh *et al*. (2018), entre los métodos ecológicos disponibles de síntesis, la utilización de extractos de plantas es un método bastante simple y fácil para producir NPs a gran escala en relación con la síntesis mediada por bacterias u hongos. Para la síntesis de NPs metálicas, la biodiversidad vegetal se ha considerado ampliamente debido a la disponibilidad de fotoquímicos, es decir, metabolitos secundarios sintetizados por las plantas tales como: cetonas, aldehídos, flavonas, amidas, terpenoides, ácidos carboxílicos, fenoles y ácido ascórbico, presentes en varios extractos de plantas especialmente en hojas (Kumar K *et al*., 2018).

Dado que las plantas tienen el potencial de acumular ciertas cantidades de metales pesados en sus diversas partes, estos componentes son capaces de reducir las sales metálicas a NPs metálicas. En consecuencia, las técnicas de biosíntesis que emplean extractos de plantas han ganado una mayor consideración como métodos simples, eficientes, rentables y factibles, así como un excelente medio alternativo a los métodos de preparación convencionales. Varias plantas incluyendo aloe-vera (*Aloe Barbadensis Miller*), avena (*Avena sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), limón (*Citrus limon*), cilantro (*Coriandrum sativum*), mostaza (*Brassica juncea*) y limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*) se han utilizado para sintetizar AgNPs y AuNPs (Kumar K *et al*., 2018).

Según la misma fuente referenciada anteriormente, para la síntesis de NPs mediada por extracto de hojas de plantas, el extracto se mezcla con soluciones de precursores metálicos en diferentes condiciones de reacción. Los fitoquímicos presentes en los extractos de hojas de plantas tienen un potencial asombroso para reducir los iones metálicos en un tiempo mucho más corto en comparación con los hongos y las bacterias, además, el extracto de hojas de plantas juega un papel doble al actuar como agente reductor y estabilizador en el proceso de síntesis. Los extractos de plantas contienen flavonoides, en los cuales, a su vez, están presente varios grupos funcionales, que tienen una mayor capacidad para reducir los iones metálicos. Contienen azúcares como la glucosa y la fructosa que también pueden ser responsables de la formación de nanopartículas metálicas. Están compuestos por carbohidratos y biomoléculas de proteínas, que actúan como agente reductor para promover la formación de NPs metálicas. Además, las proteínas con grupos aminos funcionalizados ($–NH_2$) disponibles en extractos de plantas pueden participar activamente en la reducción de iones metálicos

Shafey (2020), establece que en general, hay tres fases presentes en la síntesis de NPs metálicas a partir de extractos de plantas (figura 1.2), a saber:

La primera fase es la de activación, que consiste en la biorreducción de iones, sales metálicas y proceso de nucleación de los iones metálicos reducidos.

La segunda fase es de crecimiento, combinación espontánea de partículas pequeñas con partículas más grandes, a través de un proceso conocido como maduración de Ostwald.

La tercera fase es la terminación, que define la forma final de las NPs. El proceso de formación de NPs por extracto vegetal.

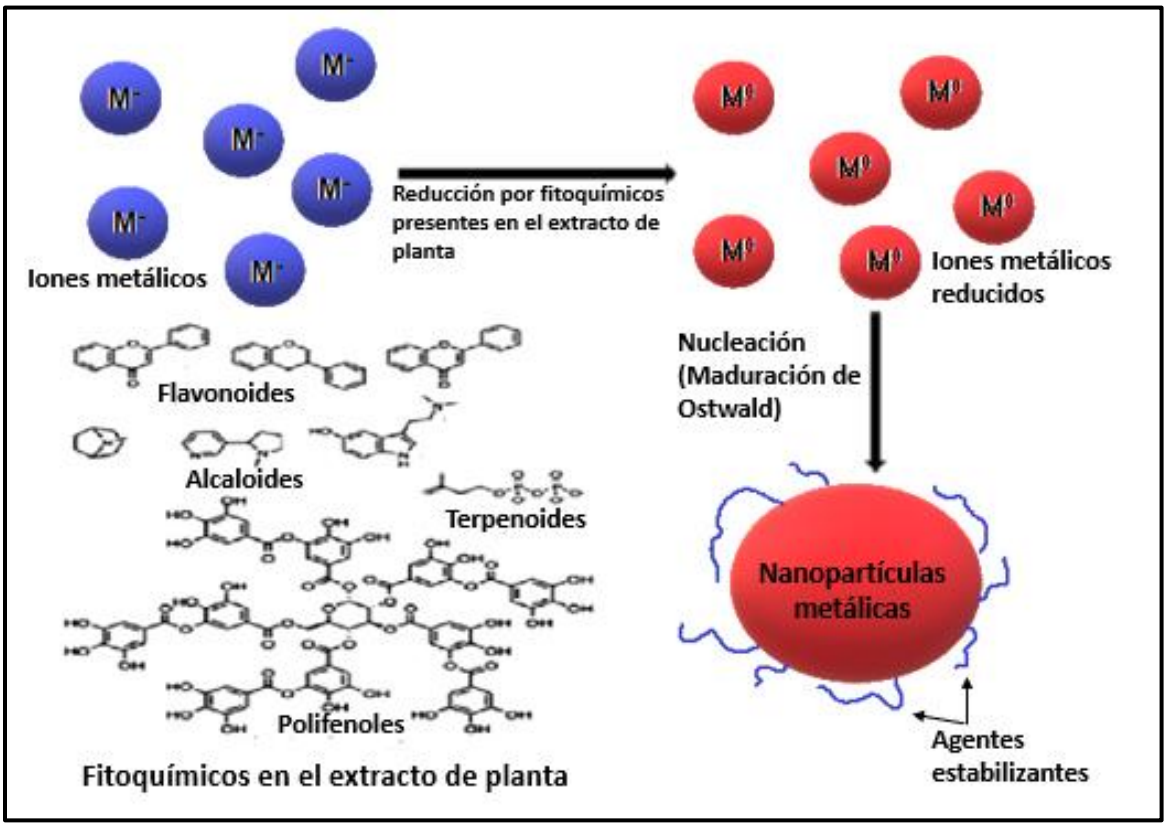


Figura 1.2 Fases de la síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos de plantas (Shafey, 2020)

A temperatura ambiente, el extracto de la planta se mezcla con una solución de sal metálica y en minutos se completa la reacción. La tasa de producción de NPs y su cantidad puede verse afectada por la concentración del extracto de la planta, su naturaleza, la concentración de la sal metálica, la temperatura y el pH. Mediante este método, se han sintetizado NPs de oro y plata (Siddiqi *et al*., 2018).

Las NPs metálicas muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas, mecánicas, térmicas y catalíticas, las cuales, dependen de múltiples parámetros, tales como: su tamaño, forma, distribución, composición, cristalinidad, porosidad, estructura y su relación área superficial/volumen(Escobar Falconí, 2015). Tomando en consideración sus especiales propiedades, se prevé que estos nuevos materiales pueden ser utilizados en numerosas aplicaciones en campos como la medicina, los productos comerciales, el tratamiento del agua, la generación de energías renovables y en la agricultura (Escobar Falconí, 2015).

En la medicina, estos materiales han atraído un interés creciente por su capacidad para administrar medicamentos en el rango de dosis óptimo, lo que se traduce en una mayor eficiencia terapéutica de los medicamentos y una disminución en los efectos secundarios (Restrepo Salazar & López Sánchez, 2012). También, la mayoría de las NPs metálicas tienen un inmenso potencial para el diagnóstico y la terapia del cáncer debido a su absorción y dispersión de luz mejoradas por resonancia de plasmones superficiales (SPR). Las nanopartículas de oro (AuNPs), gracias a sus propiedades, se pueden aprovechar para la fototerapia térmica selectiva con láser, en el tratamiento del cáncer (Jain *et al*., 2007). Las AgNPs se utilizan cada vez más en apósitos para heridas, catéteres y diversos productos domésticos debido a su actividad antimicrobiana y antifúngica (AshaRani et al., 2009; Miura & Shinohara, 2009).

La presencia de NPs en productos disponibles comercialmente es cada vez más común. Las NPs de metales nobles, incluidos Au y Ag, tienen muchos colores en la región visible según la resonancia del plasmón. Las características únicas de absorbancia de plasmón de estas NPs se han aprovechado para una amplia variedad de aplicaciones, incluidos sensores químicos y biosensores (Jana *et al*., 2016).

Otra aplicación importante tiene que ver con la remoción de metales pesados entre ellos mercurio y plomo del agua. Aplicación en la que se aprovecha la alta relación superficie/volumen de las NPs ya que facilitan la absorción de estos metales en su superficie (Marimon Bolivar, 2018).

Estudios recientes nos advirtieron sobre las limitaciones y escasez de los combustibles fósiles en los próximos años debido a su carácter no renovable. Por lo tanto, los científicos están cambiando sus estrategias de investigación para generar energías renovables a partir de recursos fácilmente disponibles a bajo costo. En esta búsqueda descubrieron que las NPs son los mejores candidatos para este propósito debido a su gran área superficial, comportamiento óptico y naturaleza catalítica. Especialmente en aplicaciones fotocatalíticas, las NPs se utilizan ampliamente para generar energía a partir de la división foto-electroquímica (PEC) y electroquímica del agua (Avasare *et al.*, 2015).

En el sector agrícola, la nanotecnología ha venido teniendo un papel preponderante. Las plantas durante su ciclo de crecimiento son atacadas por plagas y enfermedades controladas básicamente con agroquímicos sintéticos, que generan un gran impacto ambiental negativo. Por eso, en la agricultura moderna sustentable, la nanotecnología promete aportar soluciones mediante el uso de NPs para el control de microorganismos patógenos, lo que se traduce en un menor impacto ecológico. El uso de NPs metálicas de cobre (Cu), hierro (Fe), plata (Ag), titanio (Ti) y otras, en la agricultura e industria alimentaria, se debe principalmente a su actividad antimicrobiana, es decir, a la capacidad que tienen estos materiales para tratar o prevenir enfermedades causadas por microorganismos como hongos, parásitos, virus, bacterias, entre otros (Ahmad et al., 2003; Ashraf et al., 2019; Diaz Soria, 2021; Ramírez et al., 2017).

1.4. Nanopartículas de plata

Desde el punto de vista químico, la plata (Ag) es un metal noble, se puede encontrar en estado casi puro, sin embargo, por lo general se encuentra en minerales que contienen compuestos de plata, como la argentita (Ag_2S), proustita (Ag_3AsS_3), pirargirita (Ag_3SbS_3) y cloruro de plata (AgCl). La plata posee número atómico 47, su estado de oxidación más común es +1, sin embargo, también se puede hallar como +2, por ejemplo, en el difluoruro de plata (AgF2), y con +3 en el tetrafluoruro argentato de potasio (KAgF4) (Medina Hernández & Mejía Silva, 2015).

La plata ha sido utilizada desde la antigüedad, principalmente para la desinfección del agua. A partir del siglo XVII se describe como producto medicinal con múltiples propósitos. A fines del siglo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares. En la década de 1920 la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos aprueba soluciones de plata iónica como agentes antibacterianos (Cardoso, 2016).

Existen indicadores de que las AgNPs se encuentran presentes desde siempre en la naturaleza y que la producción deliberada de este material se practica desde hace más de 100 años. El primer reporte de obtención de AgNPs, data de 1889, cuando M. C. Lea informa sobre la síntesis de plata coloidal estabilizada con citrato, procedimiento mediante el cual el tamaño promedio de las partículas obtenidas fue de 7 a 9 nm. También se describe ya en 1902, la estabilización de nanoplata utilizando proteínas (Cardoso, 2016).

Las diferentes rutas para producir AgNPs involucran técnicas de síntesis físicas, químicas y biológicas. La reducción química es el método de síntesis más frecuente, utilizando para ello sales de plata, reductores y un estabilizante o agentes de terminación para controlar su crecimiento. El nitrato de plata ($AgNO_3$), es la sal más utilizada debido a su bajo costo y estabilidad química comparada con otras sales disponibles (Cardoso, 2016).

La síntesis biológica o síntesis verde de AgNPs, ha ganado terreno frente a los otros métodos por las ventajas y efectos positivos que ofrece. Utilizando este método de síntesis, aalgunos investigadores han reportado el uso de extractos de plantas y específicamente el extracto de cilantro (Coriandrum Sativum), como agente reductor y estabilizante para la síntesis de nanopartículas de plata (Camacho Polo & Deschamps Mercado, 2013; Hernández Díaz, 2013; Luna et al., 2016; Salguero Salas, 2016; Sathyavathi et al., 2010).

El cilantro es una hierba anual que pertenece a la familia Apiaceae (Umbelliferae), originaria de las regiones del Mediterráneo y Oriente Medio y reconocida como

planta medicinal (Kamarthi & Shanigarapu, 2018). La actividad antioxidante en extractos de semillas y hojas de cilantro se ha estudiado empleando varios métodos analíticos y los estudios han indicado que los extractos de hojas exhiben una actividad antioxidante más fuerte que los extractos de semillas, además, que su actividad antioxidante se correlaciona positivamente con el contenido fenólico total. En estudios muy recientes, se ha demostrado que la potente actividad antioxidante del cilantro puede aprovecharse en la preparación y estabilización más ecológica de materiales avanzados. En efecto, nanopartículas de oro, cobre, plata y níquel se han biosintetizado utilizando extractos acuosos de hojas de cilantro (Kamarthi & Shanigarapu, 2018; Kulkarni et al., 2015; Luna et al., 2016; Vasudeo & Pramod, 2016)

El cilantro contiene acidos fenólicos, incluidos los ácidos cafeico y clorogénico. También contiene aceites esenciales como (E) -2-decenal, linalol, (E) -2-dodecenal, (E) -2-tetradecenal, 2-decen-1- ol, (E) -2- decenal, dodecanal, (E) -2-tridecenal, (E) -2-hexadecenal, pentadecenal y α-pineno (Vasudeo & Pramod, 2016). Además, flavonoides (fitonutrientes responsables de los intensos colores de las frutas y verduras), como quercetina, keampferol, ramnetina, apigenina, de los cuales se sabe que, la mayoría de ellos suprimen los radicales libres (Vasudeo & Pramod, 2016).

En la escala nanométrica, la plata presenta inusuales propiedades físicas, químicas y biológicas, además de su actividad antimicrobiana. Según Siddiqi et al. (2018), las AgNPs, además de las aplicaciones en electrónica, en catálisis y en recubrimientos, se han utilizado específicamente en agricultura y medicina como antibacterianos, antifúngicos y antioxidantes. Se ha demostrado que las AgNPs detienen el crecimiento y la multiplicación de muchas bacterias y hongos. Se ha sugerido que las AgNPs producen especies reactivas de oxígeno y radicales libres que provocan apoptosis que conducen a la muerte celular y previenen su replicación, puesto que, estas partículas son más pequeñas que los microorganismos y por lo tanto, se

difunden en la célula y rompen la pared celular. También se ha demostrado que las nanopartículas más pequeñas son más tóxicas que las más grandes y que la toxicidad depende del tamaño, la concentración, el pH del medio y el tiempo de exposición a los patógenos.

Según Calderón-Jiménez et al. (2017), las AgNPs presentan propiedades físico-químicas distintivas, como alta conductividad eléctrica y térmica, dispersión Raman mejorada en la superficie, actividad catalítica y propiedades ópticas no lineales, que han dado lugar a una variedad de nuevos productos y aplicaciones científicas. Además, las AgNPs por sí mismas no tienen propiedades antibacterianas o antifúngicas, pero debido a la liberación de iones de plata se les confiere tales propiedades. La plata metálica se oxida en presencia de humedad, liberando iones que inhiben la actividad microbiana de bacterias, levaduras y hongos. La velocidad de oxidación de la plata es función del tamaño de las partículas, requiriéndose partículas con un diámetro inferior a 100 nm, es decir, nanométricas, para asegurar la presencia de un área superficial protectora que libere iones de plata continuamente. Estos iones forman compuestos insolubles en las paredes celulares, como son los grupos sulfhidrilo, dando lugar a la pérdida de líquidos y electrolitos en los hongos provocando su deshidratación y muerte (Herrero, 2018).

El aguacate es una fruta o verdura originaria de México, se usa como alimento en crudo o en ensaladas, combinado con otras verduras, también en cremas y sopas, debido a su bajo contenido en azúcar (Silvia Bustos & Hernandez Castiblanco, 2017). El cultivo de esta planta, sobre todo bajo condiciones de humedad es susceptible a diversos patógenos que generan enfermedades en diferentes partes de su estructura, como pueden ser las hojas, las ramas, las raíces o el fruto; las cuales finalmente terminan por retrasar, deteriorar o acabar con la cosecha del producto final. En general estas afecciones son generadas por hongos, entre los que se destacan el *Phytophthora cinnamomi,* el *Verticillium sp*., *Armillaria mellea, Rosellinia sp., Fusarium solani y Rhizopus stolonifer.* los cuales provocan pudrición en las raíces, marchites, coloración en el árbol y una posible muerte rápida del mismo (Tamayo Molano, 2007).

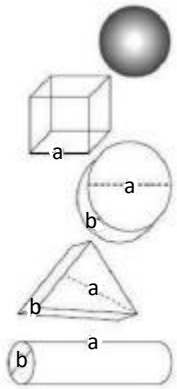
1.5. Técnicas de caracterización de las nanopartículas de plata

Para la caracterización de las nanopartículas de plata se tienen diferentes métodos: Espectroscopia ultravioleta visible UV-VIS, Difracción de rayos X XRD, Microscopia de barrido electrónico SEM, Dispersión de luz dinámica DLS, entre otras.

1.5.1. Espectroscopia ultravioleta visible UV-VIS

Esta es una técnica que consiste en la irradiación de fotones, sobre una muestra en solución o suspensión a analizar, variando la longitud de onda de los mismos, en un barrido por el espectro electromagnético desde la región ultravioleta hasta la infrarroja, pasando por la región visible y cubriendo un rango de longitud de onda entre 190nm y 1110nm aproximadamente. Algunos de los fotones irradiados sobre la muestra son absorbidos por esta, lo que genera una transición electrónica entre los niveles energéticos del material en estudio. Estos cambios o saltos energéticos se dan normalmente del nivel energético u orbital ocupado más alto, al nivel energético desocupado más bajo, además, ese cambio de energía que está asociado a una longitud de onda, es característico de cada material, pero a la vez, es influenciado por diferentes factores como la estructura atómica, el pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica del medio que rodea las nanopartículas, entre otras (Naveen Kumar, 2020; Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón, 2019).

Mediante esta técnica de espectrofotometría se puede tener un acercamiento a la composición, forma y tamaño del material estudiado, en este caso las nanopartículas de plata, ya que en el espectro de absorción generado por estas se presentarán corrimientos o cambios de posición en los picos característicos del material, al variar los factores mencionados anteriormente permitiendo así determinar estas características de la muestra, como lo expresan Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón (2009), quienes como lo muestra la figura 1.3 hicieron una relación entre estas características y la longitud de onda típica de absorbancia en UV-Vis.



FORMA	TAMAÑO (nm)	PICO DE ABSORBANCIA (nm)
Esfera	5-80	390-420
Cubo	55	420
Plato circular	a= 36-60 b= 9-26	475-574
Plato triangular	a= 60 b= 24	552
Barra	a= 30-150 b= 10	L*= 400 T*= 450-620

L= longitudinal *T= transversal*

Figura 1.3 Relación entre el tamaño y la forma de las NPs de plata con el pico de absorción característico en UV-Vis (Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón, 2019)

1.5.2. Difracción de Rayos X (XRD)

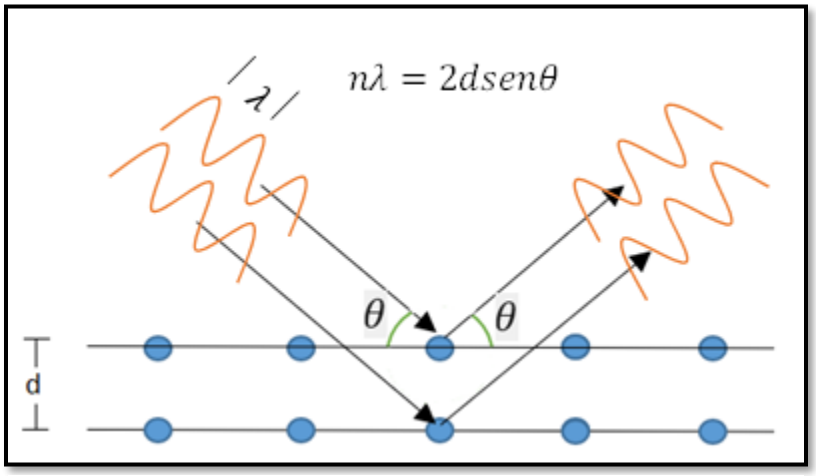


Figura 1.4 Esquema de difracción y ley de Bragg (Fuente propia)

La difracción de rayos X (XRD), es una técnica de caracterización indirecta, que mediante la aplicación de radiación electromagnética en el rango cuyas longitudes de onda son similares a la separación entre los átomos de la muestra a estudiar (rayos X), permite determinar la estructura cristalina y obtener un patrón de difracción de la muestra, si esta tiene una organización ordenada o cristalina. La difracción de rayos X soporta su funcionamiento en la ley de Bragg, que determina

la relación entre la distancia inter planar de los átomos, la longitud de onda del haz incidente y el ángulo en el que incide y se difracta dicho haz sobre la muestra, para que se dé una interacción constructiva entre los máximos de los haces difractados y generar así una señal intensa en el patrón de difracción. Esta técnica permite caracterizar composicionalmente los materiales, ya que cada material tiene un patrón de difracción característico que permite su identificación (Hernández Díaz, 2013; Naveen Kumar, 2020). Para poner en práctica esta técnica se hace uso de un difractómetro, cuya estructura y elementos principales se muestran a continuación en la figura 1.5.

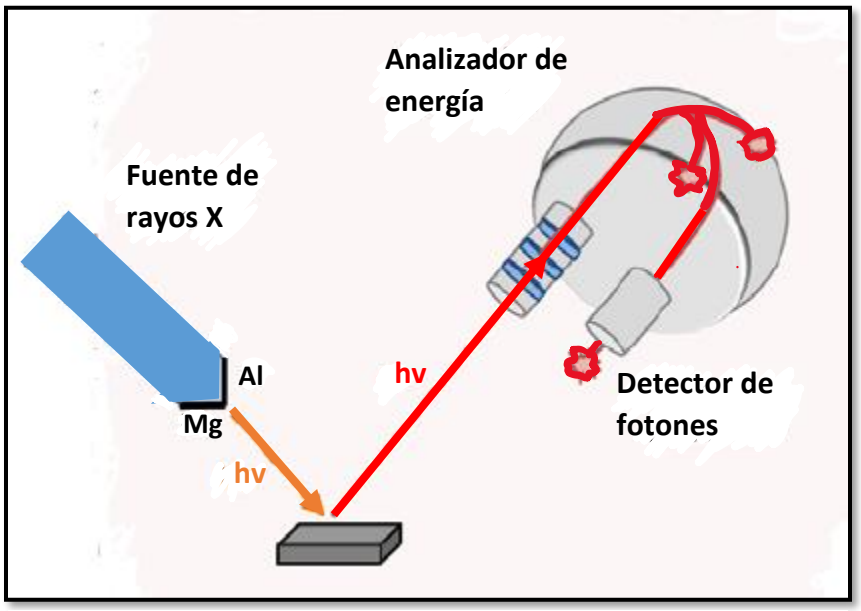


Figura 1.5 Esquema difractómetro de rayos X (Flores, 2014)

1.5.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido es una técnica de caracterización morfológica en la cual se hace incidir un haz de electrones dirigidos con precisión a la superficie del material en estudio. Los electrones irradiados sobre el material, conocidos como electrones primarios, generan un desprendimiento de electrones superficiales de los átomos del material en estudio, estos electrones llegan a un sensor que se encarga de recibirlos, intensificarlos e interpretarlos, para posteriormente convertirlos en una

imagen de la sección estudiada. La resolución en esta técnica es la distancia mínima entre dos puntos vecinos que pueden ser diferenciados uno del otro, esta depende de la longitud de onda de los electrones incidentes y es por esto que se pueden apreciar aumentos significativos en las secciones analizadas (Hernández Díaz, 2013; Naveen Kumar, 2020).

En la figura 1.6 se puede observar esquematizado el funcionamiento y los componentes básicos del microscopio electrónico de barrido.

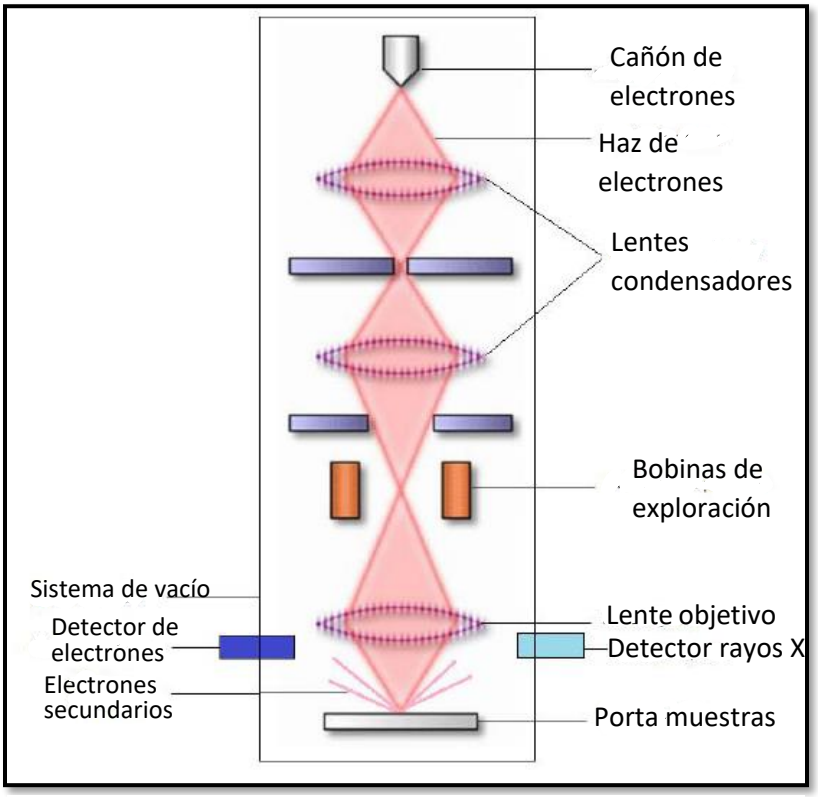


Figura 1.6 Esquema del microscopio electrónico de barrido (Salguero Salas, 2016)

1.5.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz es una técnica de caracterización que permite determinar el tamaño de partículas disueltas en un solvente, a través de la interacción de un haz de luz incidente sobre la muestra y las fluctuaciones que este pueda presentar en el tiempo debido al movimiento browniano de las partículas suspendidas. Mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein de la hidrodinámica

($d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$), se calcula el tamaño de una partícula a través del coeficiente de difusión traslacional y la viscosidad del medio en el cual se encuentran suspendidas las partículas estudiadas, contemplando el hecho de que, a mayor tamaño de la partícula, esta presenta mayores dificultades para realizar el movimiento aleatorio dentro del líquido en el que se encuentran suspendidas (Naveen Kumar, 2020; Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón, 2019).

En la figura 1.7 se presenta un esquema que permite analizar claramente el funcionamiento y los elementos que intervienen en la dispersión dinámica de luz para el cálculo del tamaño de partículas en suspensión.

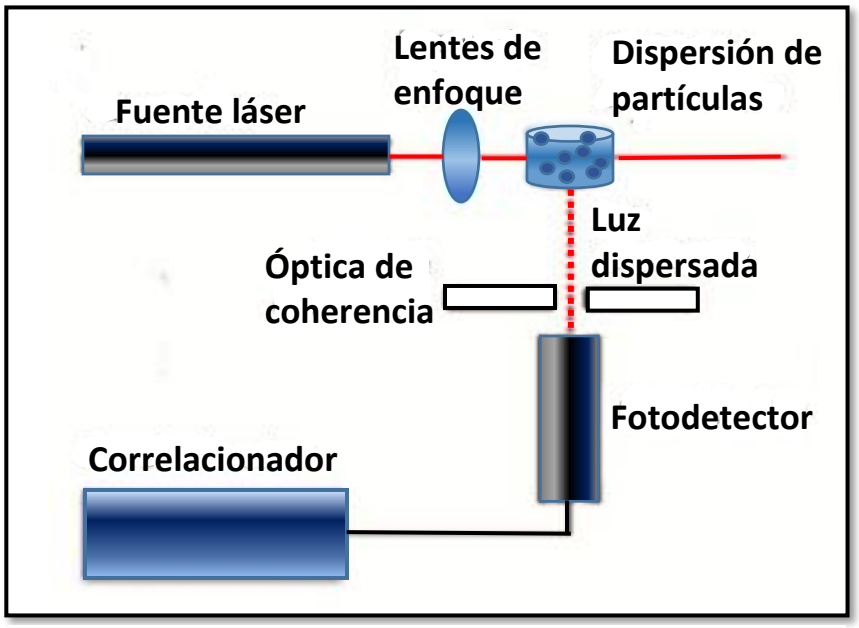


Figura 1.7 Esquema de dispersión dinámica de luz (Giudice, 2017)

1.5.5. Espectroscopia de absorción atómica (EAA)

La espectrometría de absorción atómica es un método utilizado en la química analítica para determinar concentraciones específicas de un elemento en una mezcla determinada. Es un método bastante utilizado debido a su practicidad, precisión y relativo bajo costo. Como los demás métodos de espectroscopia, la absorción atómica basa su funcionamiento en el hecho de que los átomos de cada material interactúan de manera diferente con la radiación incidente sobre ellos,

absorbiendo luz en longitudes de onda características debido a la cuantización energética que existe entre los niveles cuánticos de sus electrones (Martínez, 2020).

En esta técnica de caracterización se lleva el material a un estado de átomos libres mediate la aplicación de temperatura a la muestra, normalmente mediante llama. Estando en estado de átomos libres, el material es irradiado con una luz energéticamente coherente con el material medido, es decir, con la longitud de onda adecuada. Después de interactuar con los átomos, el haz de radiación pasa por un monocromador, que busca aislar las ondas de radiación a la longitud de onda medida, para posteriormente llegar a un sensor o detector, que se encarga de reunir los datos para ser amplificados y determinar la absorbancia de la muestra. En la figura 1.8 se puede observar un esquema del proceso mencionado (Gallegos et al., 2012; Martínez, 2020).

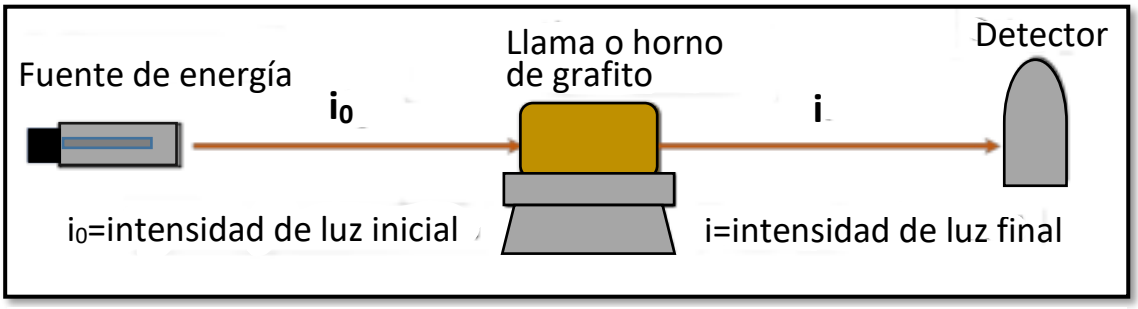


Figura 1.8 Esquema espectroscopia de absorción atómica (Martínez, 2020)

Después de obtener los datos de absorbancia de la muestra, se puede calcular a partir de estos la concentración del material en la muestra, gracias a la relación lineal que existe en cierto rango de estas dos variables, y que se puede encontrar a través de una curva de calibración con una muestra patrón del material en cuestión tal y como se muestra en la figura 1.9.

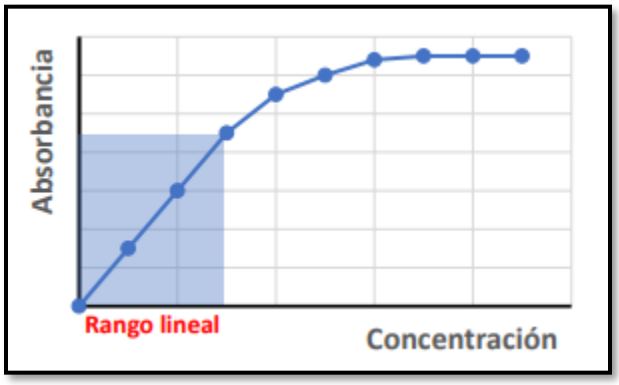


Figura 1.9 Concentración versus absorbancia - curva de calibración (Martínez, 2020).

1.5.6. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier es una técnica de caracterización que permite detectar y determinar especies químicas en una muestra, a través de su interacción con radiación del espectro infrarrojo, que si bien no tiene la suficiente energía para provocar transiciones en los niveles energéticos de los electrones, si provoca efectos, principalmente vibracionales, en los enlaces atómicos o moleculares del material irradiado (Salguero Salas, 2016).

La radiación infrarroja, que medida en número de ondas se encuentra en un rango de 12800 y 10 cm-1, provoca vibraciones de tensión y flexión, entre otros tipos, en los enlaces de los átomos y/o moléculas, las cuales podrían explicarse respectivamente como un acercamiento y alejamiento repetitivo entre los átomos en una dirección paralela al eje del enlace, y una variación cíclica entre los ángulos formados entre los enlaces (Ventura, 2006).

Los espectros resultantes de esta técnica de infrarrojo son característicos de cada compuesto, lo que permite identificar elementos desconocidos mediante la comparación con resultados previos o almacenados en bases de datos que servirán de guía a manera de huella dactilar del compuesto (Salguero Salas, 2016).

CAPÍTULO 2
ETAPA EXPERIMENTAL

2.1. Introducción

En este apartado se reportan las diferentes actividades experimentales realizadas para dar cumplimiento a los objetivos planteados en el proyecto. Aquí se brinda información sobre los materiales utilizados y equipos empleados en la síntesis de nanopartículas. Se hace una descripción de los experimentos previos realizados que condujeron a la estandarización del proceso. También se describe este último, lo mismo que los equipos empleados en la caracterización de las nanopartículas metálicas obtenidas y el extracto de cilantro.

2.2. Materiales

MATERIALES	CARACTERÍSTICAS	FUNCIÓN
Nitrato de Plata ($AgNO_3$)	Estado físico: gránulos. Marca: Panreac Masa atómica: 169,87 Estado g/mol	Sal metálica utilizada como precursor en el proceso de síntesis de AgNPs.
Cilantro (*Coriandrum sativum*)	Estado físico: hierba natural. Familia: Apiáceas. Fuente de obtención: Mercado de abasto de la ciudad.	Planta a partir de la cual se obtuvo el extracto, utilizado como agente reductor en la síntesis de AgNPs.
Hongo Fusarium Solani	Código de distribución: (ATCC 36031) Proveedor: Labcare de Colombia.	Fitopatógenos sobre los cuales se evaluó la eficacia antifúngica de las AgNPs sintetizadas
Hongo Rhizopus Stolonifer	Código de distribución: (ATCC 6227b) Proveedor: Labcare de Colombia.	
Agar PDA		Medio de cultivo para los hongos estudiados

Tabla 2.1Descripción de materiales empleados.

En la tabla 2.1 se presentan los materiales empleados durante el desarrollo de la investigación, la descripción de algunas características, así como la función que cumplen en este proceso.

2.3. Equipos

En la tabla 2.2 se relacionan los diferentes equipos y sus funciones, los que fueron utilizados para el proceso de síntesis de AgNPs.

EQUIPOS	**FUNCIÓN**
Beakers de diferentes capacidades.	• Lavado de las hojas y obtención del extracto de cilantro. • Preparación de la solución acuosa (Nitrato de plata con agua desionizada). • Mezcla y agitación de la solución metálica con el extracto de hojas de cilantro.
Horno de resistencia.	• Deshidratar las hojas de cilantro.
Mortero.	• Reducir tamaño de las hojas deshidratadas.
Placa con agitador magnético con control de temperatura y rpm.	• Agitar las hojas de cilantro con el agua desionizada para la obtención del extracto. • Agitar la solución metálica con el extracto de hojas de cilantro.
Equipo para filtrado con bomba de vacío.	• Filtrado del extracto.
Pipeta pasteur.	• Depositar gota a gota el extracto en la solución acuosa.
Tubos falcon.	• Almacenar las NPs durante el proceso de filtrado y después de este.
Centrífuga marca Inmediat, referencia 800D.	• Precipitado de las NPs.
Cajas Petri	• Cultivo de los hongos.

Tabla 2.2 Descripción de equipos empleados

2.4. Selección de reactivos

Para el proceso de síntesis de AgNPs, utilizando el método de síntesis verde, se seleccionaron dos reactivos. Como agente precursor se escogió el nitrato de plata ($AgNO_3$). Su selección se hizo en razón a que en diferentes trabajos en los cuales se reporta la síntesis de este tipo de materiales, recurrentemente aparece esta sal metálica. Además, es un precursor que está disponible en el laboratorio donde se llevó a cabo la investigación. Como agente reductor es escogió el extracto de cilantro *(Coriandrum sativum)*, debido a que diferentes autores han reportado su utilización con buenos resultados (Ashraf et al., 2019; Salguero Salas, 2016; Sathishkumar et al., 2016; Sathyavathi et al., 2010), además, porque en el contexto regional es una planta de fácil adquisición por su abundancia y bajo costo.

2.5. Pruebas preliminares

El propósito de realizar pruebas preliminares fue el de encontrar las variables adecuadas del proceso, a partir de las cuales se tuviera evidencia, mediante la aplicación de la técnica de UV-Vis, de la presencia de nanopartículas de plata en la suspensión final.

La primera actividad que se llevó a cabo fue la preparación del extracto de cilantro, tomando como referencia diferentes protocolos expuestos en la bibliografía revisada (Abbas et al., 2020; Ashraf et al., 2019; Camacho Polo & Deschamps Mercado, 2013; Hernández Díaz, 2013; M. Z. H. Khan et al., 2018; Salguero Salas, 2016; Sathyavathi et al., 2010).

Los pasos que se siguieron en la preparación del extracto fueron los siguientes:

1. Separación de las hojas de cilantro de los tallos.
2. Limpieza de las hojas con agua destilada.
3. Deshidratación de las hojas, utilizando para tal fin un horno de resistencia.
4. Maceración de las hojas.
5. Obtención del extracto hirviendo las hojas maceradas en agua destilada.
6. Proceso de filtrado del extracto.

En el proceso de obtención del extracto se variaron algunos parámetros, por ejemplo: la cantidad de hojas, la cantidad de agua, el tamaño final de las hojas maceradas, la temperatura y el tiempo de deshidratación y el tiempo de ebullición de las hojas en el agua destilada.

Posteriormente se preparó la solución acuosa mezclando agua desionizada con el nitrato de plata ($AgNO_3$), proceso en el cual se varió únicamente la concentración (molaridad).

El siguiente paso fue la mezcla de los dos reactivos, solución acuosa y extracto de cilantro. También, en este proceso se variaron parámetros tales como: relación solución acuosa-extracto y el tiempo de agitación.

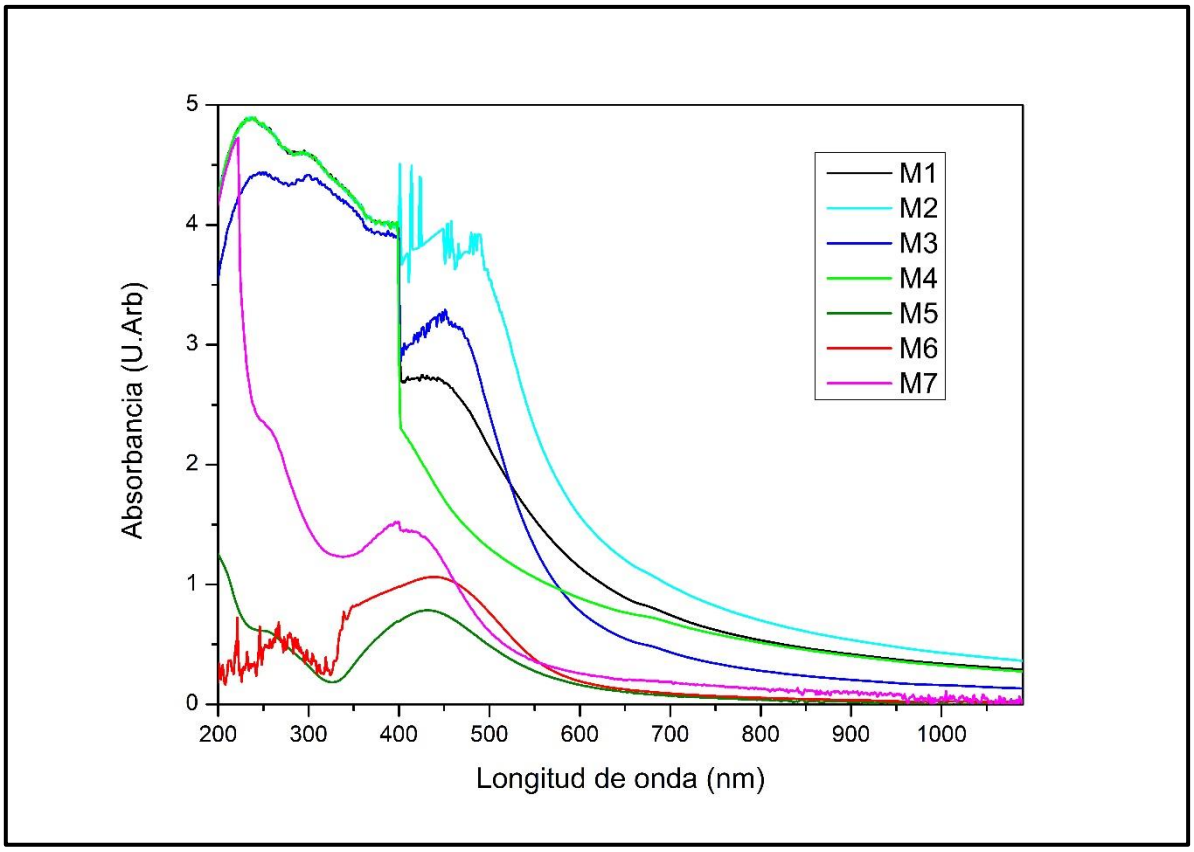


Figura 2.1 Espectros UV-vis de diferentes métodos preliminares ensayados

método	Volumen solución acuosa $AgNO_3$	Molaridad solución acuosa AgNO3	Condición de las hojas	Cantidad de hojas por volumen de H_2O (destilada)	Tiempo de ebullición del extracto	Volumen extracto
M1	100ml	0,01M	Polvo	20g/400ml	15min	22ml
M2	10ml	0,01M	Polvo	10g/100ml	15min	2,2ml
M3	10ml	0,1M	Polvo	10g/100ml	15min	2,2ml
M4	30ml	0,001M	Polvo	30g/100ml	60min	6,6ml
M5	30ml	0,01M	Trituradas	10g/100ml	15min	6,6ml
M6	30ml	0,01M	Trituradas	10g/100ml	60min	6,6ml
M7	30ml	0,05M	Trituradas	10g/100ml	15min	6,6ml

Tabla 2.3 Condiciones relevantes de los métodos preliminares aplicados para la síntesis de AgNPs

Posterior a cada uno de los ensayos preliminares de síntesis, se procedió a analizar el resultado de estos a través de UV-Vis, por ser este un método de caracterización rápido y de fácil acceso. La figura 2.1, muestra algunos espectros obtenidos para diferentes métodos de síntesis probados.

Para esta técnica de caracterización, la AgNPs presentan un pico característico en el espectro a longitudes de onda comprendido entre 400 y 450nm, atribuido a la formación del pico de resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas (Camacho Polo & Deschamps Mercado, 2013; Siddiqi et al., 2018). Como se puede observar, en la figura 2.1, el espectro correspondiente a los métodos M1 a M4, no coinciden con los reportes bibliográficos porque en estos se observa contaminación en el espectro por parte de restos orgánicos del cilantro, que al parecer no reaccionaron en el proceso de síntesis por su alta concentración, y un considerable corrimiento hacia longitudes de onda grandes. Los espectros de los métodos M5, M6 y M7, mostrados en la figura 2.1, indican la presencia de AgNPs, de acuerdo con comparaciones con la teoría y la literatura (Castrillón Rivera & Palma Ramos, 2015; Deyá & Bellotti, 2015; Kamarthi & Shanigarapu, 2018; Salguero Salas, 2016).

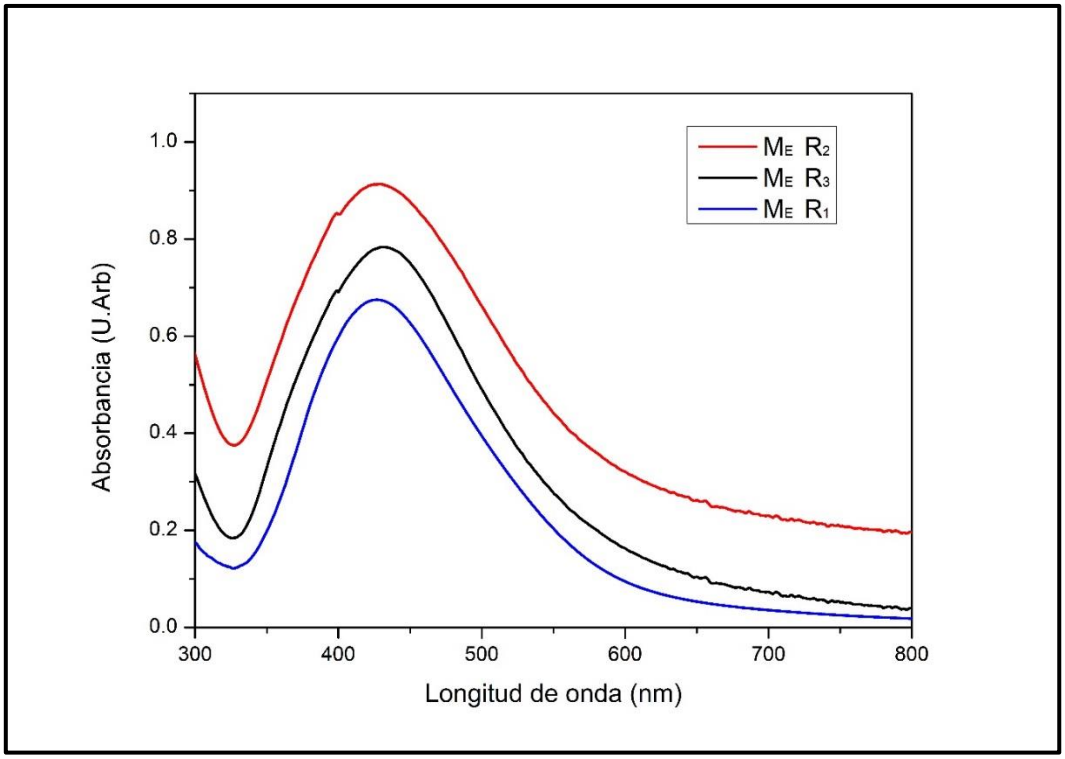


Figura 2.2 Espectros UV-vis de repeticiones del método 5 estandarizado (ME).

De acuerdo con los resultados observados en la figura 2.1, se escogió el método 5 para la síntesis de las nanopartículas. Este método, basado en el trabajo realizado por Salguero-Salas (2016), se repitió tres veces con el fin de evaluar la repetitividad en el resultado. La figura 2.2, muestra los espectros UV-vis correspondientes a este método y sirvió de base para estandarizar el proceso de síntesis de las nanopartículas.

2.6. Estandarización del proceso de síntesis de AgNPs

Con base en los resultados de UV-Vis mostrados en el método M5, se procedió a estandarizar el proceso. En la figura 2.3 se muestra un diagrama de precedencia en el cual se presentan las principales etapas del proceso de obtención de AgNPs por síntesis verde.

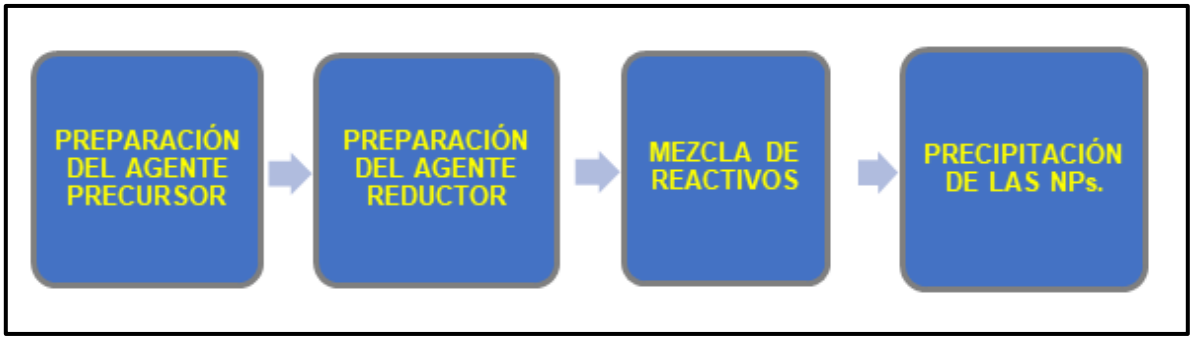


Figura 2.3 Diagrama de precedencia de las principales etapas para la síntesis de nanopartículas de plata. Fuente: Autor

A continuación, se describen las actividades realizadas en cada etapa:

***Etapa 1. Preparación del agente precursor o solución acuosa*.** En un beaker con agua desionizada, colocado sobre la placa del agitador magnético y a 600 rpm a temperatura de 60°C, se fueron disolviendo partículas de nitrato de plata ($AgNO_3$), hasta alcanzar una concentración de 0,01 molar (0,01M). Como resultado de esta actividad, se obtuvieron 30 ml de la solución acuosa.

Etapa 2. Preparación del agente reductor. Como se expuso anteriormente, el agente reductor utilizado fue el extracto de hojas de cilantro. Para la preparación del extracto se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- Obtención de las hojas de cilantro después de eliminar tallos y raíces, mediante un proceso manual.
- En un beaker se depositaron 10 gramos de hojas, cuya masa fue medida en una balanza electrónica, las cuales fueron posteriormente lavadas con agua destilada para eliminar impurezas de tamaño considerable, como arena o polvo o residuos orgánicos. Este proceso se repitió tres veces.
- En un horno de resistencia eléctrica a una temperatura de 40°C y durante 24 horas aproximadamente, las hojas fueron deshidratadas.
- En un mortero de maceración, las hojas deshidratadas fueron reducidas a trozos más pequeños.
- En un beaker, las hojas trituradas fueron mezcladas con 100 ml de agua destilada.

- La mezcla, hojas trituradas y agua destilada se sometió a una temperatura de 100°C, durante 20 minutos con agitación magnética constante de 600 rpm con el fin de obtener el extracto de las hojas de cilantro.
- El extracto inicialmente obtenido fue filtrado con el fin de eliminar residuos sólidos.
- Por último, el extracto obtenido se almacenó en un recipiente plástico y se colocó en un refrigerador ARCTIKO a una temperatura de 4°C para su posterior uso.

En la figura 2.4, se muestran algunas fotos que ilustran las actividades llevadas a cabo para la obtención del extracto de hojas de cilantro.

Etapa 3. Mezcla de reactivos. A la solución acuosa, se agregaron gota a gota 6,6 ml de extracto puro y se mantuvo la agitación magnética a 600 rpm durante una hora a una temperatura de 60°C. Transcurrido este tiempo y después de observarse una coloración amarilla-marrón como evidencia de la síntesis de NPs de plata, similar a lo reportado por Camacho Polo & Deschamps Mercado (2013), Salguero Salas (2016) y Venkatesham et al. (2014), se envasó esta mezcla en tubos falcon.

Figura 2.4 Secuencia de actividades conducentes a la obtención del extracto de cilantro. Fuente: autor.

Etapa 4. Precipitación de las NPs. La mezcla envasada en tubos falcon, fue sometido a centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm. Como resultado del paso anterior, se precipitaron las nanopartículas al fondo del recipiente, lo que permitió eliminar el sobrenadante y resuspender las nanopartículas en 10 ml de agua desionizada, proceso que se repitió dos veces más buscando limpiar las nanopartículas. La figura 2.5, muestra la secuencia de las actividades realizadas en las dos últimas etapas.

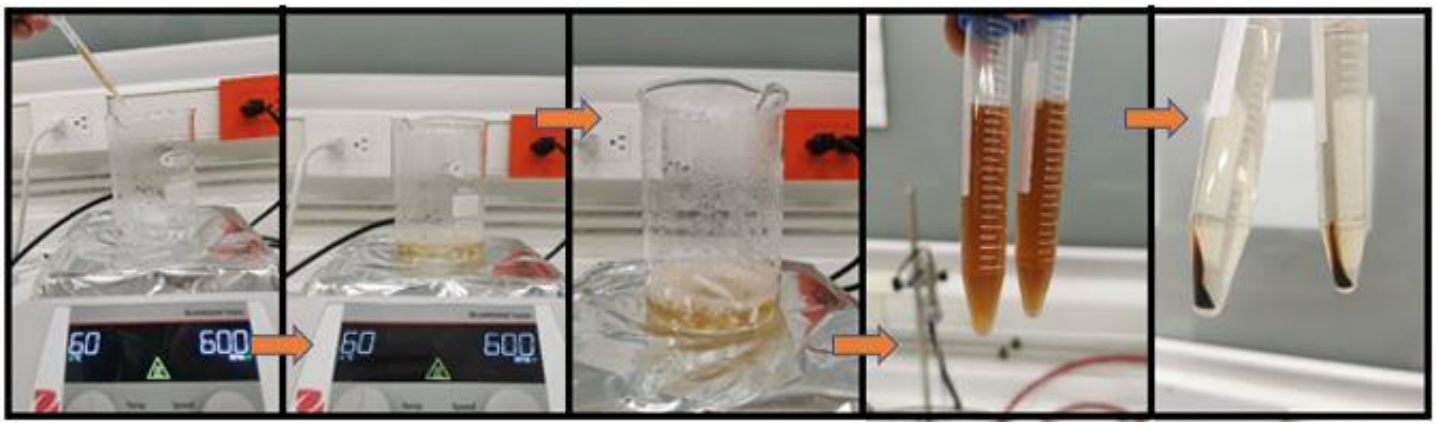


Figura2.5 Mezcla de reactivos y precipitación de las nanopartículas. Fuente: autor.

Finalmente se puede observar la figura 2.6 que corresponde a un ideograma del proceso estandarizado de obtención de NPs de plata.

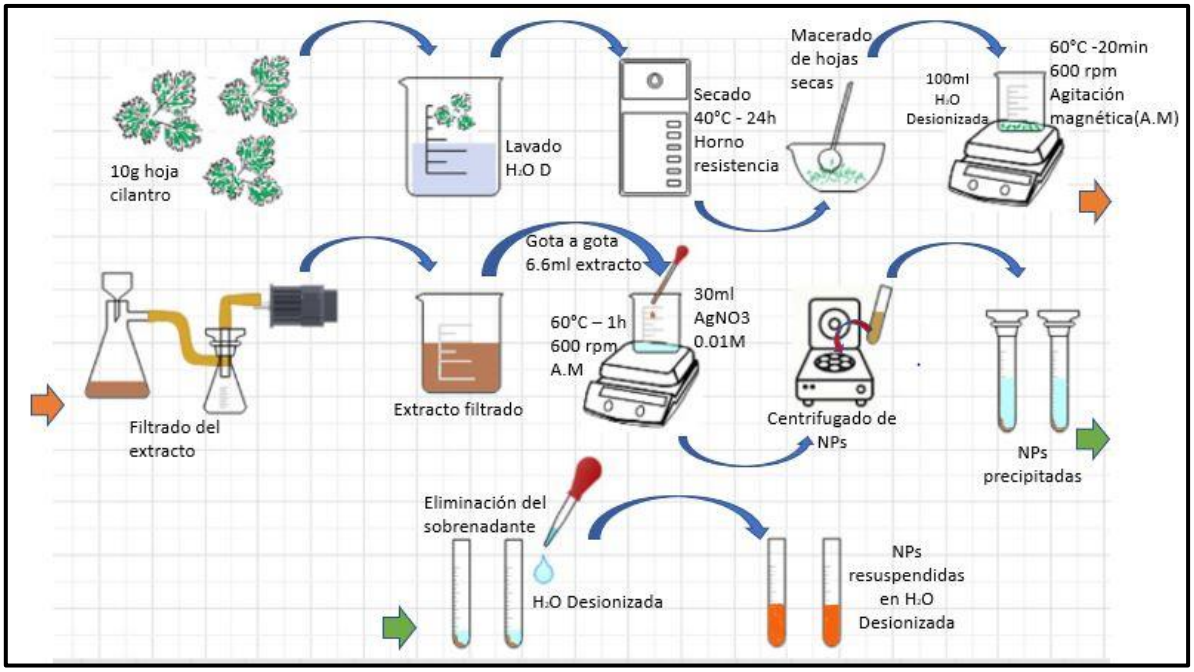


Figura 2.6 Ideograma que ilustra el proceso de síntesis de nanopartículas. Fuente: autor.

2.7. Caracterización del extracto

Con el fin de determinar los grupos funcionales presentes en el extracto de hojas de cilantro y reconocer componentes que hacen su aporte como agente reductor y surfactante en el proceso de síntesis de AgNPs, una muestra en forma de gota se colocó sobre la celda del espectroscopio Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), marca Bruker ALPHA II, ubicado en laboratorio de física del plasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.

2.8. Caracterización de las AgNPs

Muestras en suspensión fueron cargadas en un espectrofotómetro UV-Vis y sometidas a radiación en un rango espectral de 200 a 1100 nm, con el propósito de obtener espectros de absorbancia. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro ubicado en el laboratorio de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

Con el fin de determinar el tamaño hidrodinámico de las partículas suspendidas en agua desionizada, algunas muestras sintetizadas, fueron sometidas a Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Este proceso se llevó a cabo en el equipo Malvern Zsizer que se encuentra en el tecnoparque del Sena en la ciudad de Medellín.

Se realizaron medidas de SEM sobre las muestras obtenidas, con el fin de determinar el tamaño de las nanopartículas y contrastarlo con los resultados arrojados por DLS, además de obtener imágenes de las nanopartículas y su composición elemental por EDS. Estas medidas se realizaron en el microscopio electrónico de barrido Tescan Vega 3 LMU ubicado en el tecnoparque del Sena, nodo Bucaramanga.

Se hicieron pruebas de difracción de rayos X (XRD), sobre las nanopartículas obtenidas, con el fin de determinar características estructurales. Esta caracterización se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales en el difractómetro Bruker Advance, con un rango de medida de 20 a 80 grados en dos theta, con geometría Bragg-Brentano, perteneciente al laboratorio de física del plasma. Para realizar estas medidas se depositó y secó gota a gota, la suspensión de nanopartículas sobre una placa de silicio hasta alcanzar un buen espesor en la película.

Con el fin de determinar la concentración de NPs de plata presentes en las suspensiones resultantes del proceso de síntesis, se separó una parte de la suspensión y se sometió a absorción atómica en el equipo iCE 3000 series AA spectrometer de Thermo scientific, del laboratorio de aguas residuales de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Este dato fue utilizado para controlar las concentraciones de nanopartículas que se utilizaron en las pruebas microbiológicas con fitopatógenos.

2.9. Pruebas microbiológicas

Con el fin de evaluar la respuesta de los fitopatógenos *Fusarium solanis* y *Risophus stolonifer* al ser expuestos a NPs de plata sintetizadas, se llevó a cabo el experimento que se describe a continuación, el cual fue realizado en el Tecnoparque del Sena Seccional Manizales.

Se hicieron dos experimentos variando la concentración de las NPs. En el primero, el cual puede asumirse como un experimento preliminar, se trabajó con una muestra patrón y dos concentraciones 0,1 y 0,2 mg/ml, es decir, 0,1 y 0,2 mg de AgNPs; por cada mililitro de agua desionizada. Para cada hongo se preparó una muestra patrón

y dos muestras por cada tipo de concentración para un total de 6 muestras. Los resultados se evaluaron a las 24, 48 y 120 horas.

En el primer experimento los resultados no fueron muy satisfactorios, puesto que no se evidenció una alta inhibición para el *Fusarium solanis* y ninguna inhibición para el *Risophus stolonifer*. Por esta razón, se diseñó un segundo experimento, incrementando las concentraciones de las NPs de plata. En este experimento se trabajó con una muestra patrón por cada hongo y se elaboraron tres muestras para cada uno con concentraciones de 0,5 mg/ml y 1 mg/ml. En total se evaluaron 8 muestras en intervalos de tiempo de 24, 48, 72, 96 y 120.

A continuación, se describen los procedimientos para la reactivación de los fitopatógenos, la preparación de la muestra patrón y las muestras en las cuales se evaluó el comportamiento de los hongos expuestos a las AgNPs.

La reactivación de los hongos es un proceso conducente a la obtención de esporas. Este se realizó en Agar PDA (Potato Dextrosa Agar), que es el medio más utilizado para el crecimiento de hongos. El agar es un gel, que sirve principalmente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado, ya que esta es fundamental para el desarrollo de los hongos. La reactivación tuvo un periodo de 5 días a temperatura comprendida entre 25 a 30°C.

Para preparar la muestra patrón se utilizaron cajas Petri, las cuales fueron previamente desinfectadas y esterilizadas. En el centro del agar se generó un pozo de 6 mm de diámetro en el cual se inocularon los hongos.

Un procedimiento similar se llevó a cabo para preparar las muestras con las nanopartículas de plata. Se utilizaron cajas Petri, pero el Agar PDA se mezcló con 1ml de la solución de nanopartículas de plata, las cuales fueron preparadas en diferentes concentraciones: 0,1; 0,2; 0,5 y 1 mg/ml, se generó el pozo y allí se sembraron los hongos objeto de análisis.

Para cada hongo se preparó una muestra patrón. Para las concentraciones 0,1 y 0,2 mg/ml se prepararon dos muestras por cada hongo y para las concentraciones 0,5 y 1,0 mg/ml, se prepararon tres muestras para cada hongo.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Introducción

Es este apartado se presentan los resultados de aplicar las diferentes técnicas de caracterización a los productos obtenidos en el proceso de síntesis de las AgNPs. Su objetivo es demostrar o presentar evidencia de haber obtenido este tipo de materiales, así como, determinar algunas características de ellos. Igualmente se caracterizó el extracto de hojas de cilantro con el propósito de conocer aspectos de su composición. Los resultados se muestran básicamente en gráficas, se analizan a la luz de los fundamentos teóricos de cada técnica y se contrastan los resultados obtenidos con los publicados por investigadores.

3.2. Espectroscopia UV-vis

Con el fin de verificar la repetitividad y productividad de la metodología seleccionada para la obtención de NPs Ag, se realizó espectroscopia UV-vis a las muestras, teniendo presente que estas NPs muestran absorción en la región comprendida entre los 400 y 500nm, en donde la intensidad de absorción y variaciones de la longitud de onda del pico, se pueden atribuir al tamaño y forma de partícula, así como al medio en el cual están suspendidas (Ashokreddy et al., 2012; Baez Cruz, 2015; Morales et al., 2009; Ronquillo Pilozo & Paucar Banchón, 2019; Slistan-Grijalva et al., 2005).

En la figura 3.1 se muestra el plasmón de superficie del espectro de absorción de nanopartículas de plata en agua. Este espectro es una evidencia de que las nanopartículas medidas dan una fuerte banda de absorción por el plasmón superficial en la región visible, centrado en longitudes de onda entre 420 y 440 nm, rango típico para NPs de plata con tamaños entre los 40 y 60 nm de diámetro (Ashokreddy et al., 2012; Salguero Salas, 2016). Este pico de absorción en el UV-Vis, se genera ya que las NPs de plata debido a su característico enlace metálico, presentan confinados a ellas una nube de electrones que se desplazan alrededor de las mismas y que al verse expuestos a una radiación externa con determinada frecuencia (en este caso en longitudes de luz visible), entran en resonancia con dicha radiación provocando una oscilación colectiva de los electrones de la nube, lo

que se conoce como resonancia de plasmón superficial (Baez Cruz, 2015). La aparición de la resonancia de plasmón superficial implica una absorción de fotones por parte de las NPs, esta se da a energías características para cada material y por ende en longitudes de onda especificas, por lo que se puede utilizar como indicador inicial de esta técnica para verificar la obtención de NPs de plata (Ashokreddy et al., 2012; Morales et al., 2009).

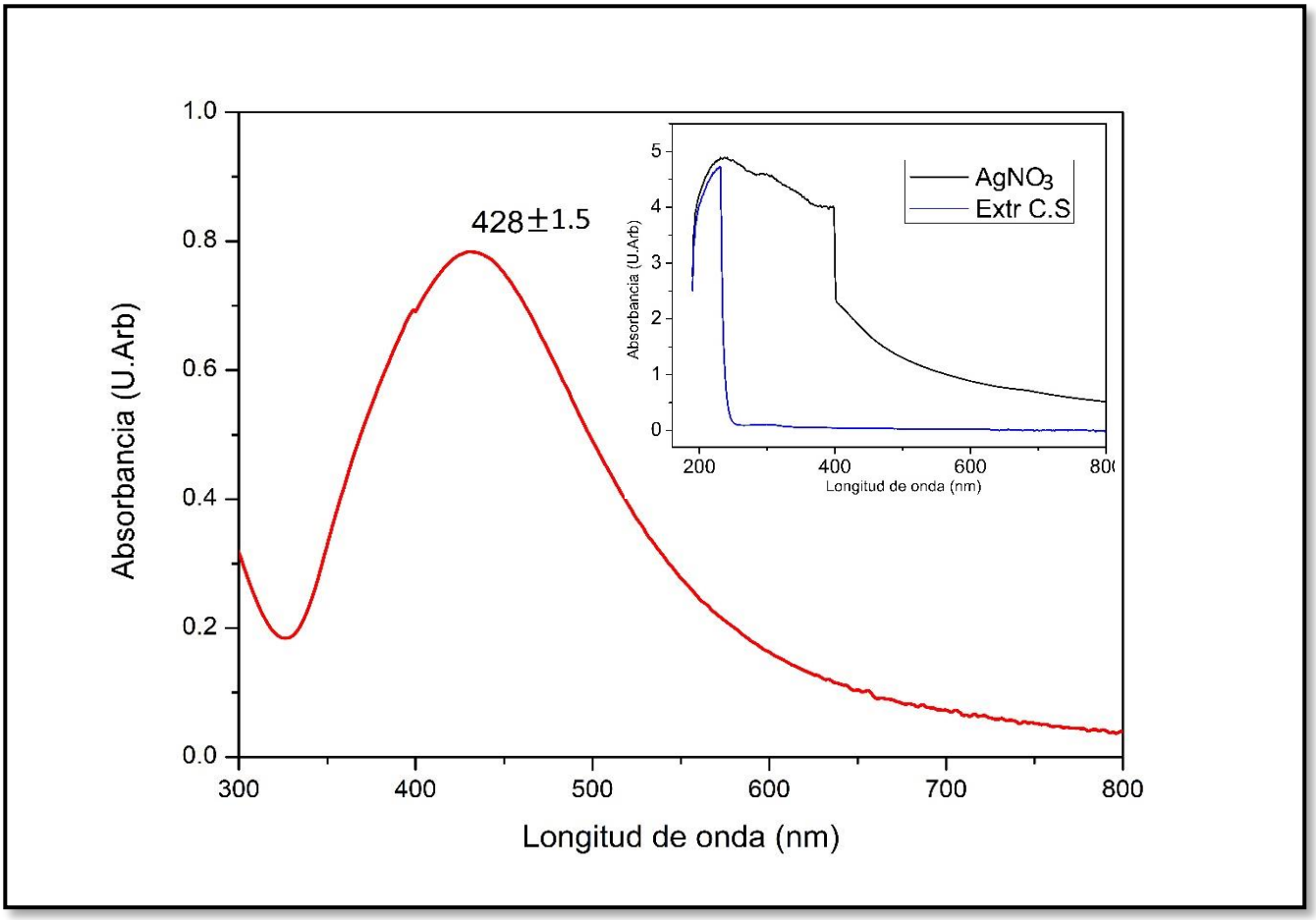


Figura 3.1 Espectros UV-vis en diferentes escalas de nanopartículas de plata y extracto de Coriandrum sativum espectro con $AgNo_3$.

La geometría y tamaño de las NPs alteran las características de la banda del plasmón superficial y el pico asociado a este en el UV-Vis, generando un corrimiento del pico a longitudes de onda mayores con el aumento del tamaño de la NP, debido principalmente a que estas características morfológicas modifican la densidad de electrones de las NPs y este es un parámetro que interviene directamente en las

condiciones energéticas de los electrones vibrantes que dan lugar al plasmón superficial (Morales et al., 2009; Salguero Salas, 2016; Slistan-Grijalva et al., 2005). Teniendo en cuenta lo anterior algunos autores se han dado a la tarea de hacer una aproximación de la relación entre el tamaño de partícula y el corrimiento del pico en la longitud de onda del espectro UV-Vis, de acuerdo con lo cual se puede concluir que las NPs de la figura 3.1, cuyo punto más intenso se encuentra en una longitud de onda de 428.8$\pm$1.5 tienen una mayor concentración en su distribución de tamaño en diámetros comprendidos entre 40 y 60nm (Morales et al., 2009; Salguero Salas, 2016). Sin embargo, también se puede observar en la figura 3.1 un ancho considerable en la banda de absorción que permite inferir una amplia distribución en el tamaño de las NPs, es decir, poca uniformidad en el diámetro de estas, lo cual está asociado a la técnica de obtención utilizada para el proceso de síntesis y es coherente con los resultados obtenidos en otras técnicas de caracterización aplicadas a las mismas (Baez Cruz, 2015; Morales et al., 2009).

3.3. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de determinar los componentes presentes en el extracto del cilantro (*Coriandrum sativum*) a través de sus grupos funcionales y en búsqueda de determinar cuáles de estos pueden tener un aporte en el proceso de síntesis verde de las NPs de plata, se desarrollaron pruebas de FTIR al extracto acuoso. El espectro resultante presenta similitudes con lo reportado por la literatura (Camacho Polo & Deschamps Mercado, 2013; Salguero Salas, 2016; Sathyavathi et al., 2010), en el cual, como se aprecia en la figura 3.2, se observan bandas de absorción entre los 3600 y 3300 cm^{-1} provocadas por la tensión del grupo OH- presente en el agua del extracto y entre 3300 y 3100 cm^{-1} debidas a vibraciones de estiramiento O-H para alcoholes y fenoles (Luna et al., 2016; M. Z. H. Khan et al., 2018; Salguero Salas, 2016). También se puede observar una banda en torno a los 1640 cm^{-1} que obedece al estiramiento de los grupos carbonilos C = O y una pequeña banda alrededor de 1400 cm^{-1} que está relacionada con los grupos ácidos carboxílicos (COOH), así como bandas inferiores a 1000 cm^{-1},entorno a 600 cm^{-1} asociadas a estiramientos del grupo C – Cl para compuestos halógenos (Camacho Polo &

Deschamps Mercado, 2013; Luna et al., 2016; M. Z. H. Khan et al., 2018; Salguero Salas, 2016).

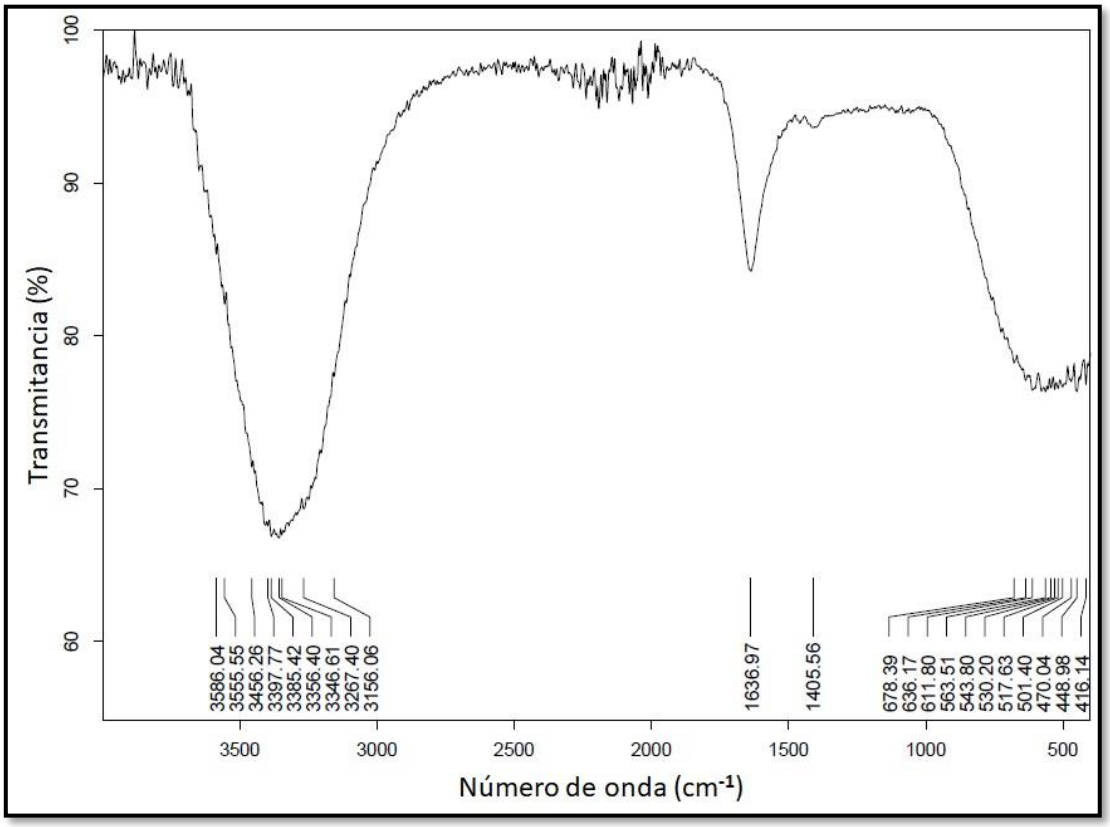


Figura 3.2 Espectro FTIR de extracto de cilantro (Coriandrum sativum).

A través del FTIR se pudieron asociar los componentes principales del cilantro como los ácidos linoleicos, oleico, flavonas y flavonoides, que de acuerdo al estudio presentado por Sathishkumar et al., (2016), donde se sintetizan NPs de plata a partir de un extracto de cilantro fraccionado y aislado para flavonoides por cromatografía, estos juegan un papel fundamental como agentes reductores y surfactantes a través de interacciones electrostáticas con la plata en el proceso de síntesis de las NPs, gracias a la afinidad que tienen sus grupos funcionales con la superficie de los metales (Camacho Polo & Deschamps Mercado, 2013; Yoosaf et al., 2007).

3.4. Difracción de Rayos X (XRD)

Esta técnica de caracterización se utilizó para determinar características estructurales de las NPs sintetizadas por química verde utilizando como precursor el $AgNO_3$ y como agente reductor y surfactante el extracto de *Coriandrum sativum*. Los datos obtenidos de la muestra, que relacionan su estructura cristalina, fueron analizados y comparados con la base de datos del equipo y con reportes presentados en la bibliografía.

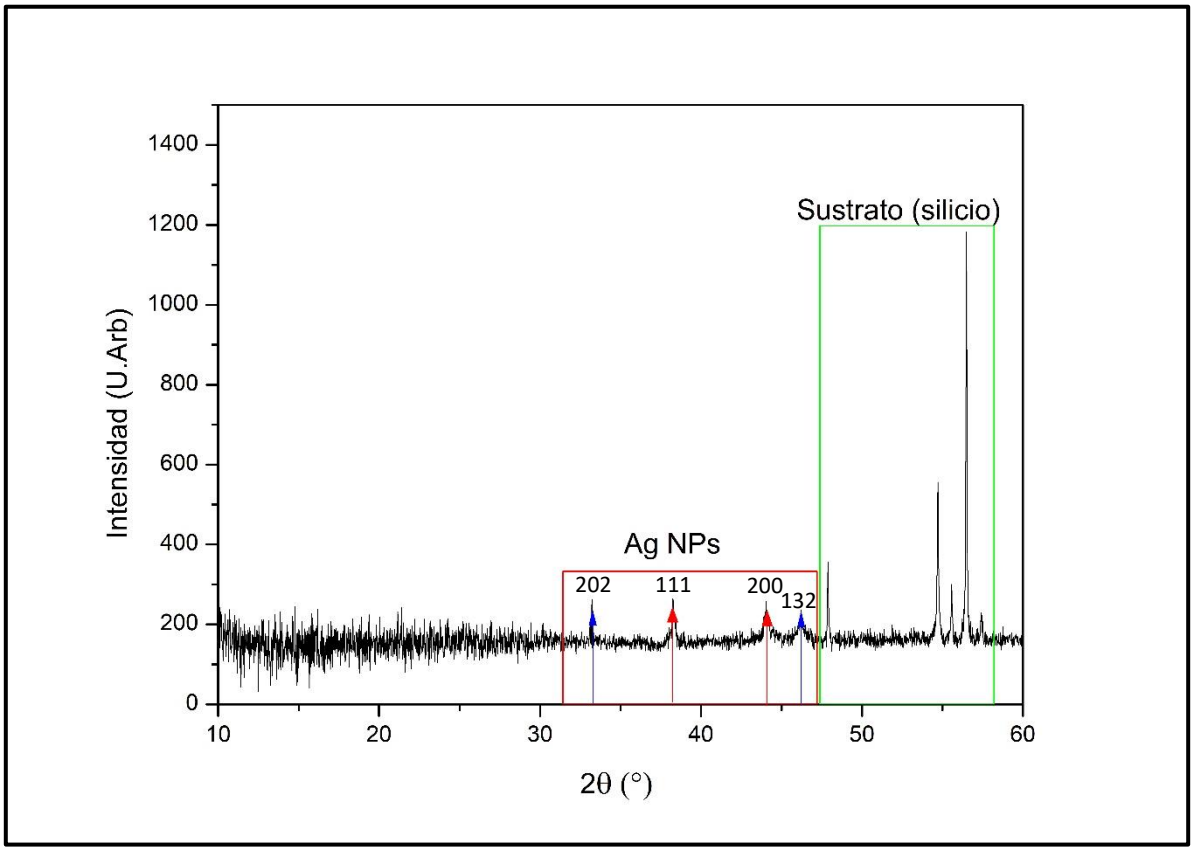


Figura 3.3 Difractograma XRD de nanopartículas de plata.

En la figura 3.3 se observa el difractograma de rayos X obtenido de las NPs de plata donde se evidencian picos de difracción en un rango de valores de 2 theta entre 30° y 48°, diferentes a los picos característicos del sustrato, por esta razón se repitió la medida en este rango y se obtuvo el difractograma que se muestra en la figura 3.4 en la que se pudieron observar picos en 2 theta igual a: 33.1°, 38.2°, 44.4° y una

pequeña protuberancia en 46.6°, que se podría confundir con el ruido aportado por el material particulado, pero que coincide con picos asociados a muestras de NPs de plata y oxido de plata (Gauri et al., 2016; Küünal et al., 2019; Sánchez Moreno, 2017).

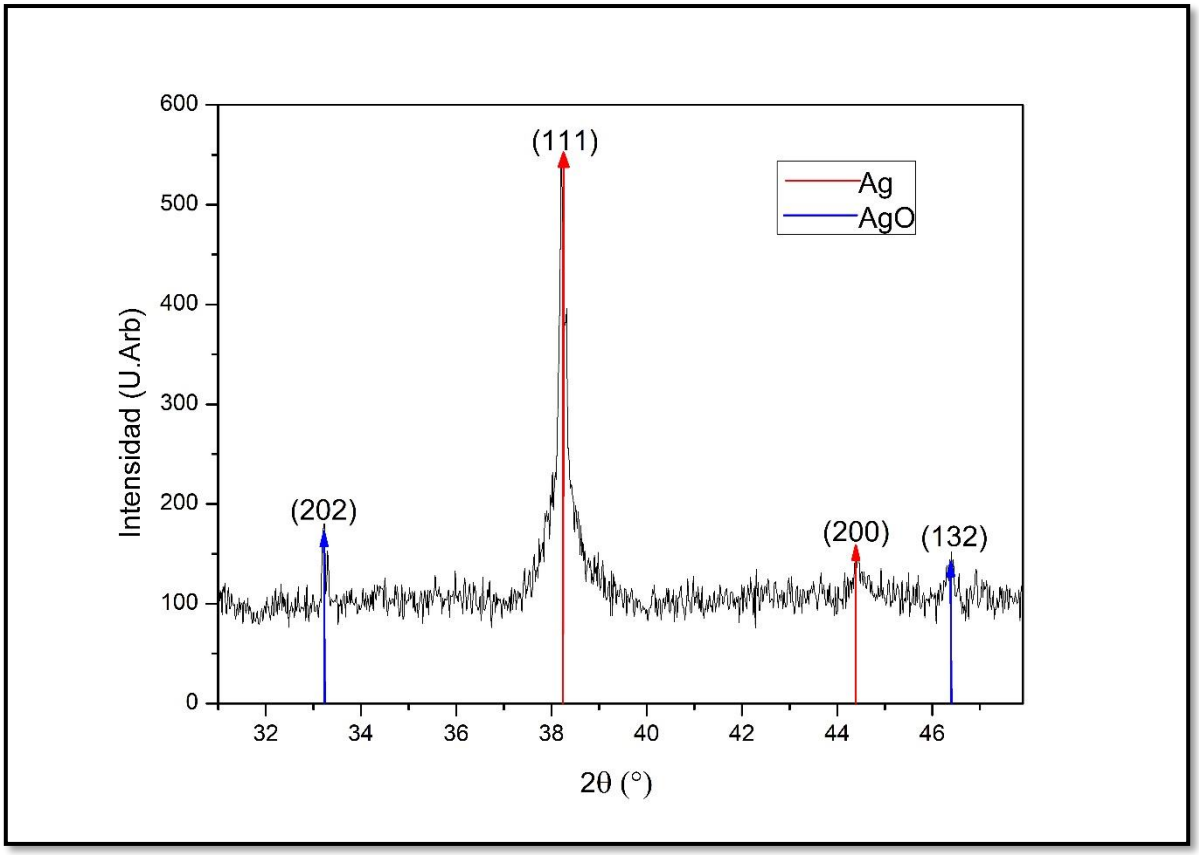


Figura 3.4 Difractograma XRD de nanopartículas de plata entre 2 theta =30°y 48°.

Los picos del difractograma ubicados en las posiciones angulares 2 theta igual a 38.2° y 44.4° corresponden respectivamente al plano (111) con una alta orientación preferencial y al plano (200) (Gauri et al., 2016; Küünal et al., 2019; Sánchez Moreno, 2017).

Mediante la ecuación de Debye-Scherer se calculó y promedió el tamaño de cristalito para los picos correspondientes a las AgNPs, con el fin de determinar la naturaleza cristalina de dichas nanopartículas:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

En esta ecuación se asignaron valores para las variables de la siguiente manera: para la constante de Scherrer (k) se tomó un valor de 0.9, como lo recomienda la literatura para este tipo de materiales; la longitud de onda de rayos X (λ) corresponde a 1,54 Ǻ coherente con la fuente de radiación del difractor; en cuanto al ancho medio de pico FWHM en radianes (β) se calculo mediante el programa OriginPro haciendo uso de un ajuste Voigt; por ultimo el ángulo de Bragg en radianes (θ) corresponde a la mitad del valor de la posición de los picos (Naveen Kumar, 2020). Como resultado de esta operación se obtuvo un tamaño promedio de cristalito de 29,24 nm, coherente con los resultados arrojados por el UV-Vis, permitiendo concluir que las AgNPs sintetizadas poseen una alta mono-cristalinidad.

A partir de la información que reporta este difractograma, se puede determinar el tipo de estructura del material presente y el parámetro de red, en caso de que se trate de una estructura cúbica. De acuerdo con Smith & Hashemi (2014), si la estructura cristalina de un metal cúbico es BCC, la relación entre los valores de $sen^2\theta$ que corresponden a los dos primeros planos de difracción, será de 0,5 y la estructura es FCC, si tal relación es de 0,75. Luego, con base en los resultados experimentales, se va a determinar el tipo de estructura siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

Primero se calculan los valores de $sen^2\theta$ a partir de los valores de 2θ de los ángulos de difracción, ver tabla 3.1

Plano	**2θ (grados)**	**θ (grados)**	**senθ**	**$sen^2\theta$**
(111)	38,2	19,1	0,3272	0,1071
(200)	44,4	22,2	0,3778	0,1427

Tabla 3.1 Cálculo de valores de sen2θ a partir de los datos de XRD

A continuación, se calcula la relación entre los valores de $sen^2\theta$, de los dos planos de difracción, es decir:

$$\frac{sen^2\theta}{sen^2\theta} = \frac{0{,}1071}{0{,}1427} = 0{,}75$$

Este resultado conduce a que la estructura cristalina es FCC (Cúbica Centrada en las caras), la misma estructura de la plata. Este resultado concuerda con la base de datos del equipo de difracción y con reportes hechos en la bibliografía (Ashraf et al., 2019; Gauri et al., 2016; Hernández Díaz, 2013; Küünal et al., 2019).

Partiendo de la ecuación [1], en la que **a** es el parámetro de red, **λ** es la longitud de onda de los rayos X incidentes (λ=0,154 nm), y hkl, son los índices de Miller, se puede calcular el parámetro de red de la celda cúbica (Smith and Hashemi, 2018).

$$sen^2\theta = \frac{\lambda^2(h^2 + k^2 + l^2)}{4a^2} \quad [1]$$

Despejando **a** en la ecuación [1] y reemplazando valores se tiene:

$$a = \frac{\lambda}{2}\sqrt{\frac{h^2 + k^2 + l^2}{sen^2\theta}}$$

$$a = \frac{0{,}154\ nm}{2}\sqrt{\frac{1^2 + 1^2 + 1^2}{0{,}1071}} = 0{,}4075\ nm$$

El parámetro de red de la plata reportado en algunas fuentes es 0,4086 nm (Askeland & Wright, 2017; Smith & Hashemi, 2014). Por tanto, el valor calculado es similar al reportado en las fuentes consultadas.

Así mismo los picos ubicados en las posiciones 2 theta de 33.1° y 46,6° corresponden plano cristalográficos (202) y (132), característicos de AgO con estructura cubica, coherentes con la base de datos del equipo y la bibliografía de referencia (JCPDS No. 84-1108), pero cuya intensidad es pequeña en comparación con los picos asociados a la plata, lo que indica una baja presencia este material en la suspensión (Ashraf et al., 2019; Gauri et al., 2016; Hernández Díaz, 2013).

3.5. DISPERSION DINAMICA DE LUZ

Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz, con el fin de determinar la distribución de tamaño hidrodinámico de las NPs de plata obtenidas mediante el

método de ruta verde a partir de la sal metálica $AgNO_3$. En la figura 3.5 se muestra el resultado de esta prueba para tres medidas realizadas a la misma suspensión de NPs de plata. Los picos de mayor intensidad en la gráfica determinan el diámetro en el cual se concentra la mayor cantidad de NPs medidas, siendo 106,40nm, 150,00nm y 148,40nm los diámetros hidrodinámicos que muestran mayor intensidad. Si bien dos de las medidas presentan un punto máximo similar, una de ellas presenta una distribución de tamaño bimodal, agrupando un pequeño porcentaje de NPs en diámetros alrededor de los 35,92 nm y la tercera medida tiene un corrimiento en su valor máximo hacia diámetros más pequeños, pero aun superiores a los 100 nm. Otro aspecto que se debe resaltar en estas medidas es el hecho de que el ancho de los picos es considerable en comparación con resultados obtenidos por otros autores, posiblemente por diferencias en el proceso de síntesis de las NPs (Deyá & Bellotti, 2015).

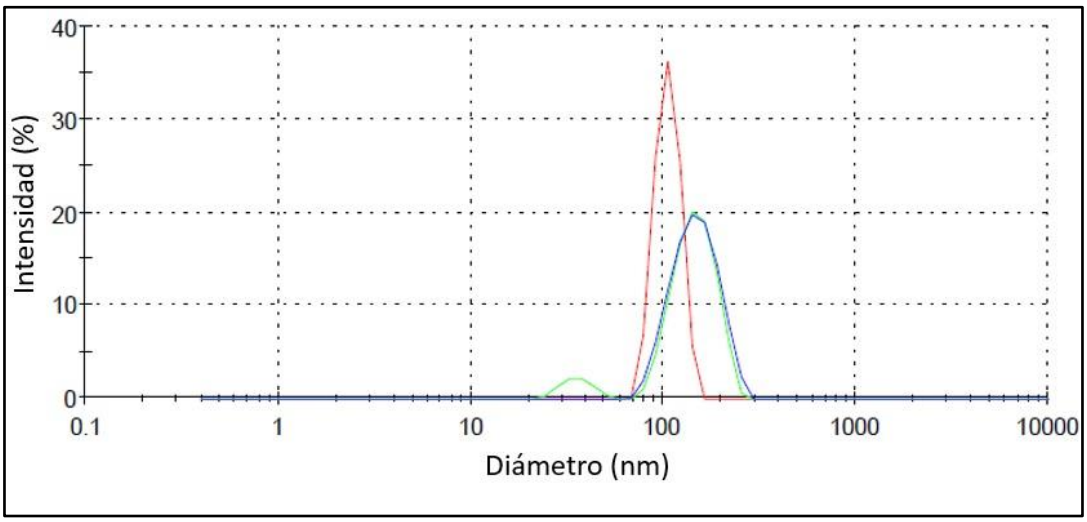


Figura 3.5 Distribución de tamaño de partícula por DLS

Todos los aspectos mencionados anteriormente llevan a la misma conclusión y es que existe una alta dispersión en cuanto al tamaño de las NPs de plata obtenidas, hecho atribuible al método de síntesis utilizado (Naveen Kumar, 2020). El resultado obtenido por dispersión dinámica de luz no coincide con la información obtenida a partir del espectro UV-Vis, donde se asocian tamaños más pequeños a las AgNPs sintetizadas por ruta verde. Como explicación al elevado tamaño de la AgNPs determinado mediante DLS, el autor Salguero Salas (2016) explica que l s

diámetros obtenidos mediante esta técnica son mayores, ya que en esta también se percibe la capa dieléctrica adherida a la superficie de las NPs y que influye en su movimiento Browniano en suspensión (Salguero Salas, 2016). En la figura 3.6 se puede observar una representación gráfica de lo expresado por el autor. Sin embargo, puede no ser la única razón por la cual varie de tal forma el diámetro hidrodinámico medido, y esto hace necesaria la caracterización de las AgNPs mediante una técnica como la microscopia electrónica de barrido SEM, que permita obtener una imagen de las mismas y descartar o confirmar la presencia de aglomerados o agregados en la suspensión.

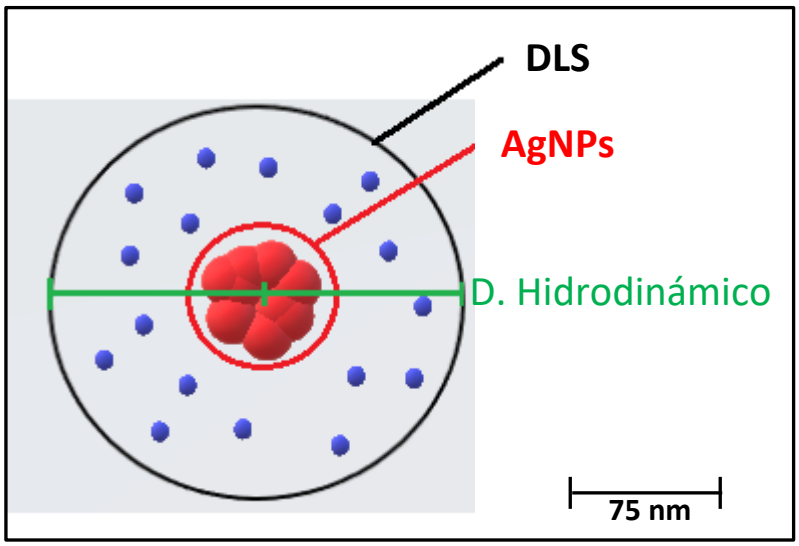


Figura 3.6 Esquema del diámetro hidrodinámico de AgNPs según Salguero Salas (2016)

3.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se llevó a cabo con el fin de determinar características morfológicas de las NPs de plata obtenidas, así como tener un punto de comparación con técnicas como DLS en cuanto a dimensiones de este material particulado. Se puede observar en la figura 3.7 la presencia de NPs que ya por otras técnicas se determinó que eran de plata principalmente y en una mucho menor cantidad de oxido de plata, estas presentan formas irregulares pero con tendencia a adoptar geometrías esféricas y con tamaños poco homogéneos pero dentro del rango de lo que se pueden considerar nanomateriales en la mayoría de los casos, a excepción de algunos aglomerados formados posiblemente por la falta de control en el pH de la

suspensión como lo reporta Camacho Polo & Deschamps Mercado (2013) en el cual afirma que un pH básico de por lo menos 10 ayuda a la estabilidad de las NPs, sin embargo, este parámetro no se controló en este proyecto en búsqueda de determinar la posibilidad de sintetizar NPs de plata utilizando como reactivos únicamente la sal metálica como agente precursor y el extracto vegetal como agente reductor y surfactante.

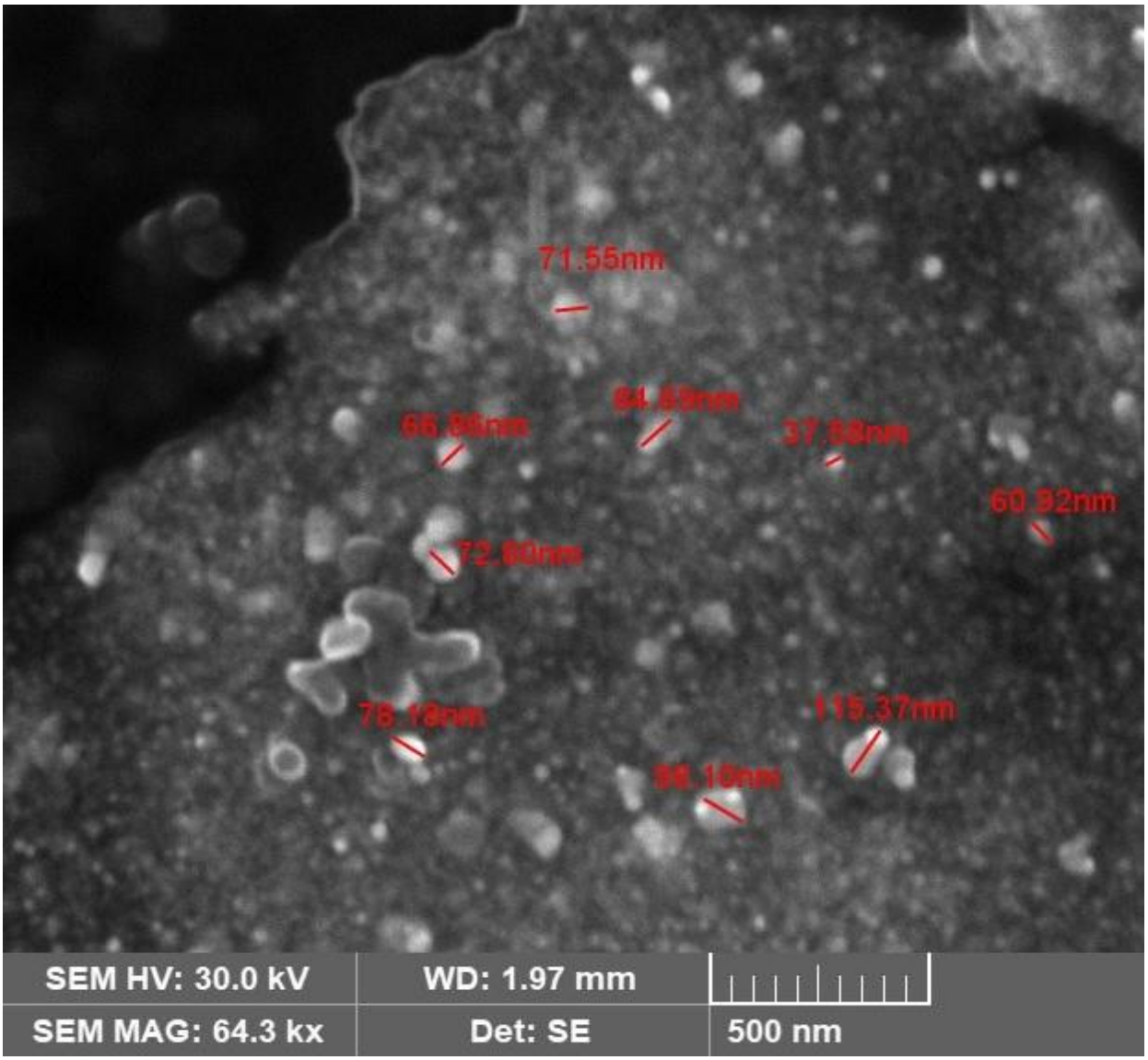


Figura 3.7 Imagen de microscopia electrónica de barrido de las NPs de plata SEM

Los resultados acá expuestos permiten sacar conclusiones y corroborar los datos obtenidos en UV-Vis, XRD y DLS. En este sentido se puede inferir la coincidencia entre los resultados en cuanto a tamaño de las NPs obtenidos por esta técnica con los resultados obtenidos por UV-Vis y XRD. Así mismo, esta técnica permitió interpretar de mejor manera los resultados obtenidos por DLS en donde además del aporte del recubrimiento orgánico en las AgNPs al diámetro hidrodinámico, también se debe tener en cuenta los aglomerados y agregados formados por las mismas y que son evidentes en las imágenes de SEM obtenidas (Diaz Soria, 2021).

3.7. Espectroscopia de absorción atómica

Esta técnica se aplicó a una fracción conocida del volumen de la suspensión de las NPs de plata con el fin de determinar la concentración másica por mililitro de plata en la suspensión y de esta manera poder calcular la cantidad de agua desionizada en la cual se debían resuspender las NPs para obtener las suspensiones con concentraciones de 0,1 mg/ml, 0,2mg/ml, 0,5mg/ml y 1mg/ml, que fueron utilizadas en las pruebas microbiológicas con los fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium solani*. Es fundamenta recalcar que estas concentraciones son aproximaciones, ya que los resultados obtenidos mediante esta técnica reportan la cantidad total de plata en la muestra, sin discriminar si es Ag pura o el AgO reportado en el XRD, sin embargo, de acuerdo a las intensidades relativas de los picos en el espectro, el AgO se encuentra en muy poca cantidad.

3.8. Pruebas microbiológicas (Difusión en agar)

El propósito de este experimento fue medir la capacidad inhibitoria de las NPs de plata sobre los fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium solani*, dos de los principales agentes microbianos que atacan el cultivo de aguacate.

En la figura 3.8 se observa el crecimiento en tiempos de 24, 48 y 120 horas, del hongo *Fusarium solani* cultivado en agar dopado con cuatro diferentes concentraciones de NPs de plata. Se puede observar cómo el dopaje del agar con NPs de plata, generó un retraso en el crecimiento del hongo para concentraciones de 0,1 a 0,5 mg/ml y una inhibición total para una concentración de 1mg/ml.

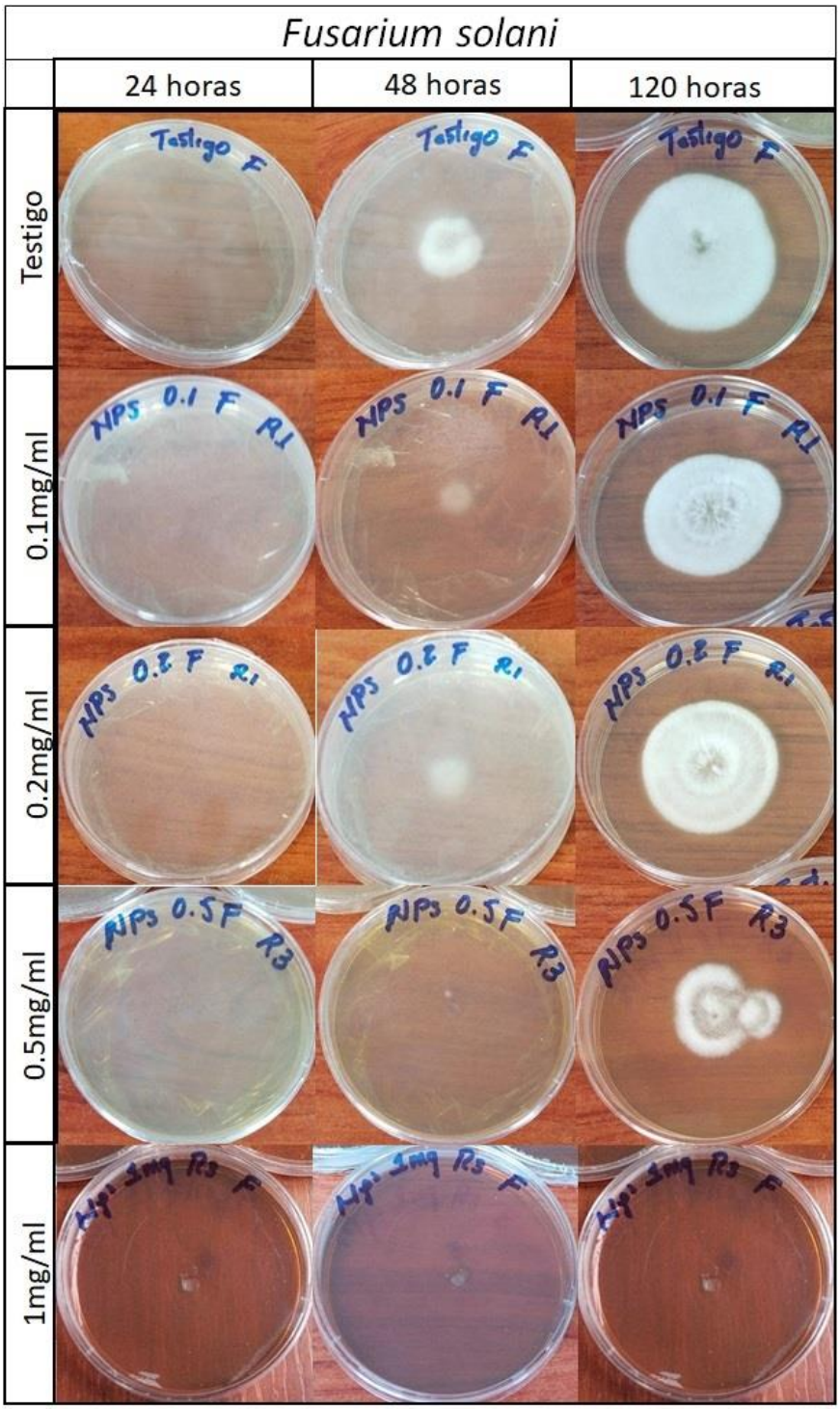


Figura 3.8 Registro fotográfico del crecimiento del hongo Fusarium solani

En la tabla 3.2 se registran los diámetros de crecimiento del hongo, con su respectiva desviación estándar, en función del tiempo y la concentración de las nanopartículas. Con base en esta información se determinó el porcentaje de inhibición en función de dichos parámetros, cuyo análisis se hace a continuación.

FUSARIUM			
Concentración (mg/ml)	Tiempo (horas)		
	24	48	120
Testigo	0	24.11	57.85
0.1	0	12,09±1,01	45,94±2,32
0.2	0	12,65±0,21	47,19±0,98
0.5	0	1,33±0,58	34,08±2,04
1	0	0	0

Tabla 3.2 Diámetro en milímetros con su desviación estándar de crecimiento del Fusarium solani en función del tiempo, para diferentes concentraciones de NPs de plata

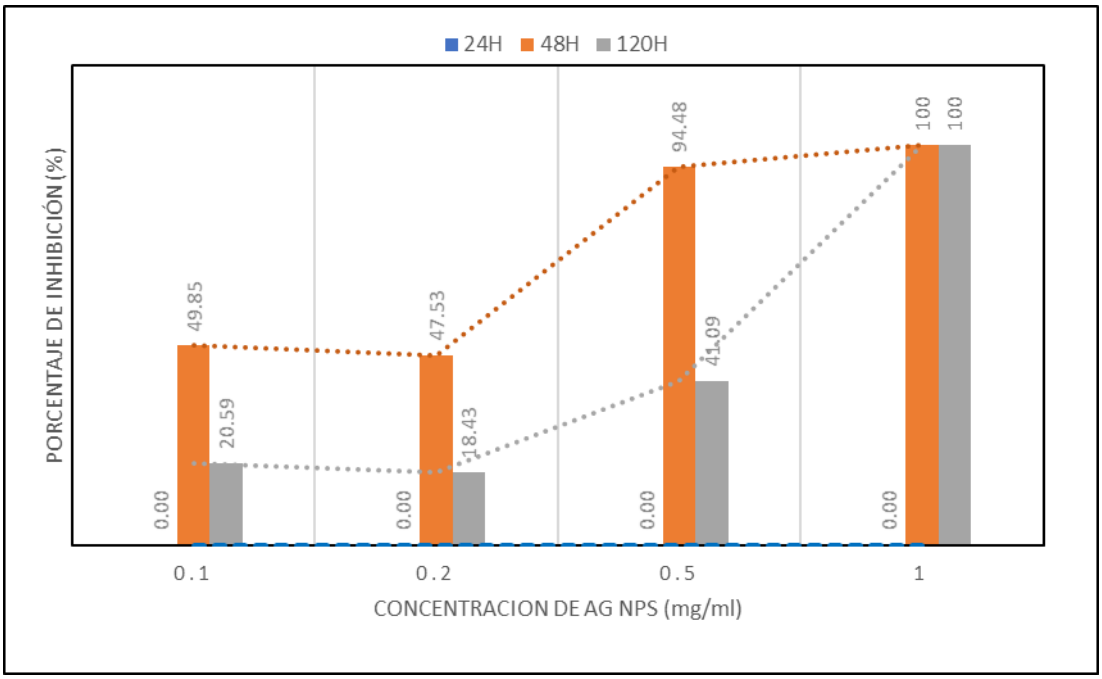


Figura 3.9 Porcentaje de inhibición para Fusarium en el tiempo

La figura 3.9 relaciona el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solani* en función del tiempo y de la concentración de nanopartículas con las que se dopó el agar. Para las 24 horas no se registra inhibición debido a que ni en la muestra patrón ni para ninguna de las concentraciones se observó crecimiento del

fitopatógeno. Para 48 y 120 horas, se observa una tendencia al incremento del porcentaje de inhibición a medida que aumenta la concentración, hasta alcanzar una inhibición del 100% para el hongo expuesto a una concentración de 1mg/ml de NPs de plata.

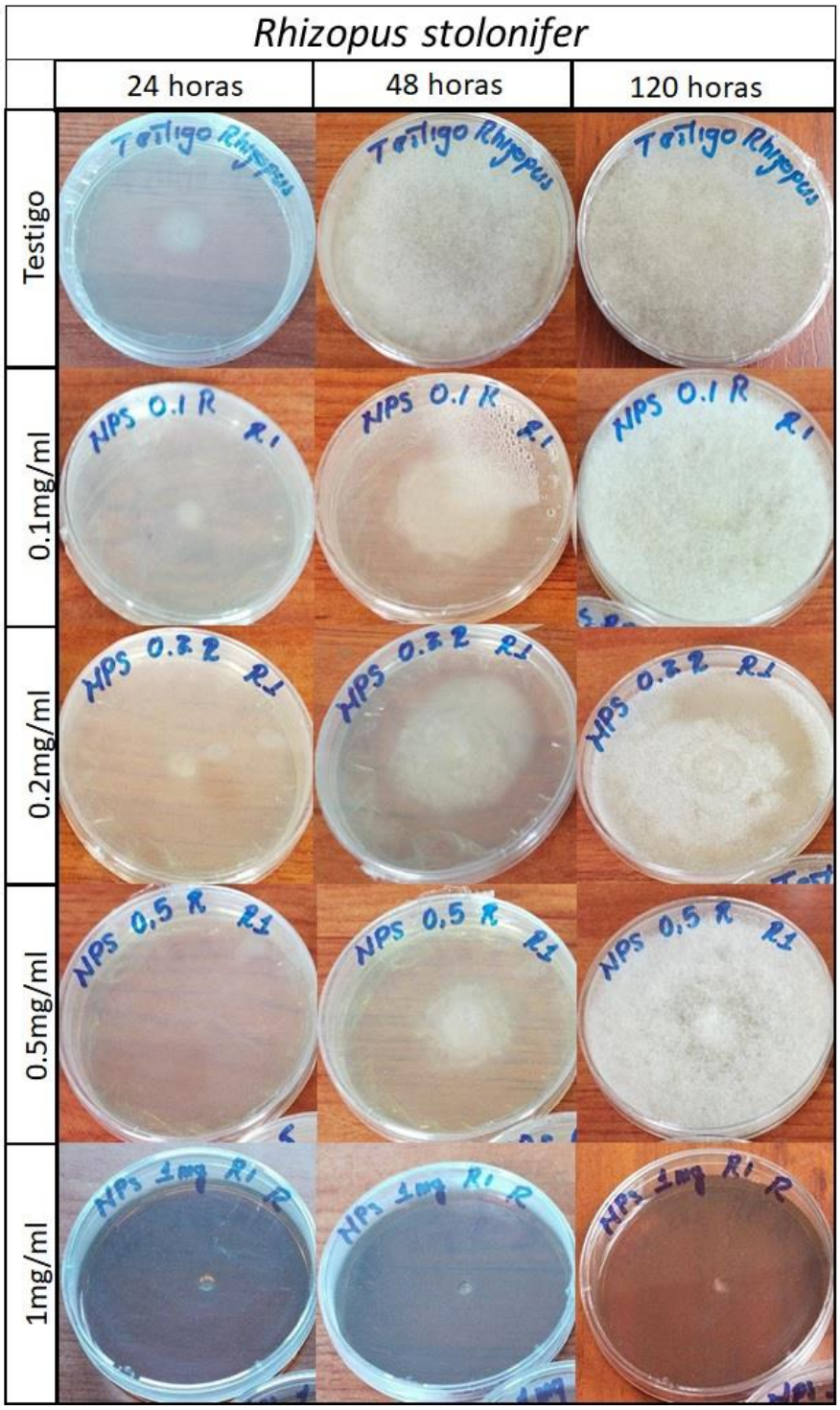


Figura 3.10 Registro fotográfico del crecimiento del hongo Rhizopus stolonifer

En la figura 3.10 se observa el registro fotográfico del crecimiento en tiempos de 24, 48 y 120 horas, del hongo *Rhizopus stolonifer* cultivado en agar dopado con cuatro diferentes concentraciones de NPs de plata. Al igual que con el *Fusarium solani*, se evidencia un retraso en el tiempo se crecimiento del fitopatógeno, no obstante, el comportamiento del *Rhizopus* fue algo diferente, comportándose con mayor agresividad y creciendo de manera más acelerada tanto en la muestra patrón como en las muestras tratadas, este comportamiento se puede explicar partiendo del hecho de que ambos fitopatógenos tienen formas diferentes de crecer y esparcirse en medios aptos. En la figura 3.10 también se puede percibir como aumenta la inhibición del crecimiento del hongo, al exponerse a concentraciones mayores de NPs, sin embargo se aprecia como la efectividad antifúngica de las NPs de plata es menor en este fitopatógeno, posiblemente por mecanismos internos del hongo relacionados con la permeabilidad de su membrana celular o la capacidad para desarrollar procesos de exocitosis y eliminación de cierto porcentaje de las NPs de plata que ingresan a la célula, como lo reporta Ashaani et al. (2009) en su investigación sobre actividad anti-proliferativa de NPs de plata.

RHIZOPUS			
Concentración (mg/ml)	Tiempo (horas)		
	24	48	120
Testigo	15.3	90	90
0.1	9,24±0,15	40,49±0,81	90
0.2	10,01±0,52	45,373±4,19	90
0.5	0	32,06±1,85	90
1	0	0	0

Tabla 3.3 Diámetro en milímetros con su desviación estándar del crecimiento del Rhizopus stolonifer en función del tiempo, para diferentes concentraciones de NPs de plata

La tabla 3.3 muestra los diámetros de crecimiento del hongo *Rhizopus stolonifer* con su desviación estándar, en función del tiempo y la concentración de NPs utilizada para dopar el agar. Esta tabla nos enseña de una forma explícita la agresividad que presento el fitopatógeno *Rhizopus*, en cuanto a su crecimiento y mayor resistencia

al tratamiento con las NPs que el *Fusarium*, se presenta crecimiento del hongo desde las 24 horas de cultivo en el testigo y las dos muestras con concentraciones más bajas de NPs, así mismo un crecimiento que abarca la totalidad de la caja Petri (90mm de diámetro) a las 48 horas en la muestra patrón y en 3 de las cuatro muestras dopadas con NPs a las 120 horas de cultivo, esto justificado posiblemente por las razones expuestas con anterioridad.

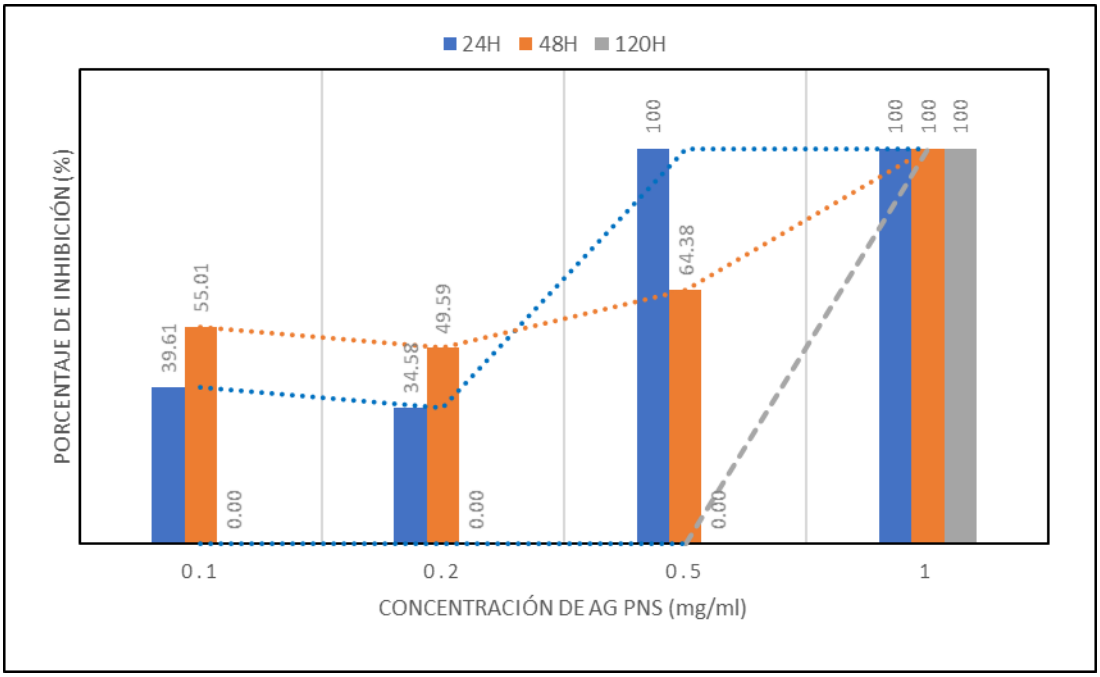


Figura 3.11 Porcentaje de inhibición para Rhizopus en el tiempo

La figura 3.11 relaciona el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo *Rhizopus stolonifer* en función del tiempo y de la concentración de nanopartículas con las que se dopó el agar. Se evidencia un retraso en el crecimiento del hongo en las medidas de 24 y 48 horas por efecto de las NPs, sin embargo, para las concentraciones de entre 0.1 y 0.5mg/ml, este efecto es meramente momentáneo ya que en la medida de las 120h el hongo había cubierto la totalidad de la caja Petri para las muestras expuestas a dichas concentraciones. Únicamente la muestra que fue dopada con una concentración alta de 1mg/ml de NPs de plata presento un 100% de inhibición del crecimiento fúngico en el agar, con lo que se puede concluir

que únicamente a esta concentración de NPs se tiene un comportamiento óptimo para tratar tanto el *Rhizopus stolonifer* como el *Fusarium solani*.

Este conjunto de resultados aportados por las pruebas microbiológicas realizadas permitió comprobar que efectivamente las NPs de plata tienen un efecto antifúngico sobre los fitopatógenos estudiados. Este efecto se debe a diferentes mecanismos mediante los cuales la NPs alteran la viabilidad celular de los hongos. Las NPs tienden a aglomerarse alrededor de la membrana celular generando especies reactivas de oxígeno que desactivan enzimas celulares responsables de los procesos de intercambio de sustancias a través de esta, ocasionando deshidratación celular y perdida de nutrientes (Herrero, 2018; Miura & Shinohara, 2009). Además se ha demostrado mediante estudios previos que otro mecanismo importante relacionado con las propiedades antifúngicas de estas NPs está ligado a la liberación de iones de plata ya que su citotoxicidad se ve menguada cuando se lleva a un entorno de pH alcalino (Jo et al., 2009; Sathishkumar et al., 2016b). Lo anterior es coherente con el hecho de que la mayoría de las células contienen azufre y fósforo, que son bases débiles que hacen parte del ácido ribonucleico y pueden verse alteradas por la acción de iones de plata liberados por las NPs, ocasionando un mal funcionamiento y conllevar la apoptosis celular (Castrillón Rivera & Palma Ramos, 2015).

CAPÍTULO 4
CONCLUSIONES

- Se logró la obtención o síntesis de nanopartículas de plata, y oxido de plata en menor medida, utilizando como agente reductor extracto de hojas de cilantro y partiendo de la sal metálica $AgNO_3$ como agente precursor. Esta afirmación se sustenta a partir del análisis por espectroscopia UV-Vis donde se evidenciaron picos de absorbancia en longitudes de onda alrededor de los 428nm, región característica de las NPs de palta y de las imágenes obtenidas por microscopia SEM.
- La reducción de iones de plata para obtener las nanopartículas se logró gracias a la presencia de ácidos linoleicos, oleicos, flavonas y flavonoides, identificados por sus grupos funcionales presentes en el extracto de hojas de cilantro mediante el análisis FTIR.
- Las partículas de plata obtenidas se organizan en una estructura cubica centrada en las caras, cuyo parámetro de red es muy similar a la plata en bulk, de acuerdo con el análisis realizado a través de XRD.
- Las nanopartículas obtenidas por el método utilizado muestran una alta distribución de tamaño, además de una forma esférica irregular, según lo confirman los análisis de DLS y SEM, así mismo se percibe la formación de aglomerados, entre las nanopartículas, cuyos diámetros son percibidos en las medidas de DLS.
- El experimento microbiológico por difusión en agar demostró que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium solani*, esta inhibición fue del 100% en ambos hongos para concentraciones de nanopartículas de 1mg/ml. Además, se determinó la existencia de una relación directamente proporcional entre la concentración y el porcentaje de inhibición.

CAPÍTULO 5

PERSPECTIVAS Y FUTUROS TRABAJOS

Se plantean como posibles trabajos futuros, estudios en los cuales se busquen métodos que permitan sintetizar nanopartículas de plata con una menor distribución de tamaños, así como un mayor control en el crecimiento de las mismas, con el fin de evaluar nuevamente sus propiedades antifúngicas y determinar si a menores tamaños la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de los fitopatógenos disminuye.

También se plantea la posibilidad de sintetizar nanopartículas de otros materiales metálicos, utilizando como agente reductor y surfactante el mismo extracto u otras alternativas.

Teniendo en cuenta los favorables resultados *in-vitro*, en cuanto a inhibición, presentados por el tratamiento de nanopartículas a una concentración de 1mg/ml, se plantea la posibilidad de escalar el experimento a pruebas *in-vivo* con cultivos de aguacate.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, S., Nasreen, S., Haroon, A., & Ashraf, M. A. (2020). Synhesis of Silver and Copper Nanoparticles from Plants and Application as Adsorbents for Naphthalene decontamination. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(4), 1016–1023. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.011

Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *28*(4), 313–318. https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00174-1

AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Valiyaveettil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials. *Technical Proceedings of the 2009 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2009*, *2*(2), 383–386.

Ashokreddy, A., Buergi, B. R., Chainani, A., Chakrabarti, J., Das, S. K., DasGupta, N., P. A. Joy, M. A. H. Muhammed, G. U. Kulkarni, K. Manzoor, R. Mukhopadhyay, A. S. Nair, T. Pal, S. K. Pati, G. V. P. Kumar, V. K. Pillai, E. Prasad, R. Philip, V. R. R. Kumar, P. R. Sajanlal, A. K. Samal, E. S. Shibu, T. S. Sreeprasad, C. V., & Tata. (2012). *Nanoscience and Nanotechnology* (Science, T). Tata McGraw Hill Education Private Limited.

Ashraf, A., Zafar, S., Zahid, K., Salahuddin Shah, M., Al-Ghanim, K. A., Al-Misned, F., & Mahboob, S. (2019). Synthesis, characterization, and antibacterial potential of silver nanoparticles synthesized from Coriandrum sativum L. *Journal of Infection and Public Health*, *12*(2), 275–281. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.11.002

Askeland, D. R., & Wright, W. J. (2017). La Ciencia E Ingenieria De Materiales 7th. En *Ciencia e ingeniería de los materiales*.

Avasare, V., Zhang, Z., Avasare, D., Khan4, I., & Qurashi, A. (2015). Application of graphene and graphene-based materials in clean energy-related devices Minghui. *International journal of energy research*, *39*, 1714–1719. https://doi.org/10.1002/er.1598

Baez Cruz, R. E. (2015). *Estudio por espectroscopia SERS de ADN genómico en interacción con nanoparticulas de Au y Ag a través de plasmones localizados.* Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

Calderón-Jiménez, B., Johnson, M. E., Montoro Bustos, A. R., Murphy, K. E., Winchester, M. R., & Baudrit, J. R. V. (2017). Silver nanoparticles: Technological advances, societal impacts, and metrological challenges. *Frontiers in Chemistry*, *5*(Feb), 1–26. https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00006

Camacho Polo, J. D., & Deschamps Mercado, L. A. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial. *Integration of Climate Protection and Cultural Heritage: Aspects in Policy and Development Plans. Free and Hanseatic City of Hamburg*, *26*(4), 1–37.

Cardoso, P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)*, *58*(260), 19–28. http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanopartículas-de-plata.pdf

Castrillón Rivera, L. E., & Palma Ramos, A. (2015). Actividad antimicótica de nanopartículas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, *7*(12). https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2014.12.49099

Cornejo, L. (2015). *Clasificacion nano materiales*. https://nuevastecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/

Deyá, C., & Bellotti, N. (2015). *Extractos vegetales para la síntesis de nanopartículas metálicas y su aplicación en pinturas como aditivos antifúngicos*. 368–375.

Díaz del Castillo Rodríguez, F. (2012). Introducción a Los Nanomateriales. *Lecturas de ingeniería. Fes-Cuautitlán Departamento De Ingeniería*, *20*, 79.

Diaz Soria, P. L. (2021). Efecto bactericida de nanoparticulas de Hierro, cobre, zinc y plata en el tratamiento y desinfección de aguas residuales. *Naturaleza y Tecnología*, 1–16. http://www.naturalezaytecnologia.com/index.php/nyt/article/view/384/pdf

Escobar Falconí, V. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM) Disertación*.

Gallegos, W., Vega, M., & Noriega, P. (2012). Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. *La Granja*, *15*(1), 19. https://doi.org/10.17163/lgr.n15.2012.02

Gauri, B., Vidya, K., Sharada, D., & Shobha, W. (2016). Synthesis and characterization of Ag/AgO nanoparticles as alcohol sensor. *Research Journal of Chemistry and Environment*, *20*(10), 1–5. https://www.researchgate.net/publication/319502481%0ASynthesis

Gutierrez Vazquez, J. ., & Oñoro, J. (2008). *Espumas de aluminio. Fabricación, propiedades y aplicaciones. 44*(5), 457–476.

Hernández Díaz, M. P. (2013). *Síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con Opuntia Sp. y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas* [Centro de Investigación en Quimica Aplicada]. https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/64/1/Tesis de maestria Marco Polo Hernadez.pdf

Herrero, L. P. (2018). *Evaluación de la acción fungicida de nanopartículas de plata, oligómeros de quitosano y propóleo frente a la pudrición blanca (Trametes versicolor (L.) Lloyd), sobre madera de Populus sp. tratada mediante autoclave*.

Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., Hong, J., & Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf. *Nanotechnology*, *18*(10). https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). (2015). Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales. *Blamey y otros*, *2*(2), 36–59. http://publicacionesoficiales.boe.eshttp//www.insht.es/catalogopublicaciones/

Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, *13*(10), 2638–2650. https://doi.org/10.1039/c1gc15386b

Jain, P. K., ElSayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*, *2*(1), 18–29. https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70016-6

Jana, D., Unser, S., Bruzas, I., & Sagle, L. (2016). *Noble Metal Nanoparticles to Probe and Alter Biological Phenomena*. 103–149. https://doi.org/10.1142/9789813202504_0004

Jo, Y. K., Kim, B. H., & Jung, G. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, *93*(10), 1037–1043. https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1037

Kamarthi, A., & Shanigarapu, S. (2018). Green Synthesis of Nickel Nanoparticles from Extract of Coriandrum Sativum Leaves along with Comparative Analysis using Chemical Reduction Method. *International Journal of Research in Advent Technology*, *6*, 2279–2286.

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(7), 908–931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011

Kulkarni, V., Kale, N., Kute, N., & Kulkarni, P. (2015). *Coriander leaf extract is efficient biocatalyst for synthesis of copper nanoparticles*. *8*(2), 127–132. https://www.researchgate.net/publication/274718215_Coriander_leaf_extract_is_efficient_biocatalyst_for_synthesis_of_copper_nanoparticles

Kumar K, H., Nagasamy, V., & Bhowmik, H. (2018). Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, *4*(2), 3765–3775. https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.04.0001011

Küünal, S., Visnapuu, M., Volubujeva, O., Soares Rosario, M., Rauwel, P., & Rauwel, E. (2019). Optimisation of plant mediated synthesis of silver nanoparticles by common weed Plantago major and their antimicrobial properties. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *613*. https://doi.org/10.1088/1757-899X/613/1/012003

Luna, C., Barriga-Castro, E. D., Gómez-Treviño, A., Núñez, N. O., & Mendoza-Reséndez, R. (2016). Microstructural, spectroscopic, and antibacterial properties of silver-based hybrid nanostructures biosynthesized using extracts of coriander leaves and seeds. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 4787–4798. https://doi.org/10.2147/IJN.S105166

M. Z. H. Khan, TAREQ, F. K., HOSSEN, M. A., & ROKI, M. N. A. M. (2018). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Coriandrum sativum leaf extract. *Journal of Engineering Science and Technology Vol. 13, No. 1 (2018) 158 - 166 © School of Engineering, Taylor's University GREEN*, *13*(January).

Marimon Bolivar, W. (2018). *Ingeniería de nanopartículas magnéticas para la remoción de metales pesados en aguas. Interciencia*. Pontificia Universidad Javeriana.

Martínez, M. R. (2020). Análisis Instrumental. Espectrometría de Absorción Atómica (EAA). *Universidad Politécnica de Valencia*, 1–10. https://riunet.upv.es:443/handle/10251/138418

Medina Hernández, P., & Mejía Silva, M. T. (2015). *Monografía de la plata (Ag)*.

https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/pdfs/Monografia PLATA.pdf

Miura, N., & Shinohara, Y. (2009). Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*(3), 733–737. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.039

Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta Sol-Gel a partir de nitrato de plata. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *75*(2), 177–184.

Naveen Kumar, R. B. (2020). *New bio-nanomaterials for environmental remediation* [Universidad Autónoma del estado de Morelos]. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30330.93122

Ortega-Liébana, S. (2018). Nanocrystals, new materials with unique properties and applications. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*, *26*(3), 306–314. https://www.raco.cat/index.php/ECT/article/download/343169/434315

Ramírez, J., Vianey, T., Villavicencio, F., Liss, L., Nikte, G. O., Mónica, C., Molina, P., Luis, J., Sanjuana, S. R., Gustavo, C. J., Castro, V., César, J., Gil, V. C., Domínguez, C., & Pedro, J. (2017). Susceptibilidad in vitro de pestalotiopsis spp . a nanoparticulas de cobre. *Jovenes en la ciencia*, *3*, 362–367. http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/3500

Restrepo Salazar, J. C., & López Sánchez, R. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass*. http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/245180/245180.pdf%0Ahttps://hdl.handle.net/20.500.12380/245180%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.gr.2017.08.001%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2014.12

Ronquillo Pilozo, R. E., & Paucar Banchón, C. J. (2019). *Obtención de nanopartículas de ag a partir del aceite extraído de las semillas de zanahoria (Daucus carota) para potenciar la actividad fúngica bactericida.* Universidad de Guayaquil.

Salguero Salas, M. A. (2016). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductores extractos de menta (Origanum vulgare) y cilantro (Coriandrum sativum), y como funcionalizante el látex de sangre de drago (Croton lechleri)*. Pontificia Universidad Católicadel Ecuador.

Sánchez Moreno, M. (2017). Nanopartículas De Plata: Preparación, Caracterización Y Propiedades Con Aplicación En Inocuidad De Los Alimentos. *Journal of Chromatography A*, *1040*(2), 15–16. http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Msanchez/Sanchez_Moreno_Minerva_TFM.pdf

Sathishkumar, P., Preethi, J., Vijayan, R., Mohd Yusoff, A. R., Ameen, F., Suresh, S., Balagurunathan, R., & Palvannan, T. (2016). Anti-acne, anti-dandruff and anti-breast cancer efficacy of green synthesised silver nanoparticles using Coriandrum sativum leaf extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *163*, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.005

Sathyavathi, R., Krishna, M. B., Rao, S. V., Saritha, R., & Narayana Rao, D. (2010). Biosynthesis of silver Nanoparticles using Coriandrum Sativum leaf extract and their application in nonlinear optics. *Advanced Science Letters*, *3*(2), 138–143.

https://doi.org/10.1166/asl.2010.1099

Shafey, A. M. El. (2020). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. *Green Processing and Synthesis*, *9*(1), 304–339. https://doi.org/10.1515/gps-2020-0031

Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5

Silvia Bustos, M. F., & Hernandez Castiblanco, A. M. (2017). Caracterización socioeconómica de la producción de aguacate de la variedad hass en el departamento de cundinamarca con fines de internacionalización. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, *6*(1), 51–66. http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://fiskal.kemenkeu.go.id/ejournal%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006%0Ahttps://doi.org/10.1

Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). “Green” synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1), 1–24. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4

Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Ávalos-Borja, M., Barraza, Castillon, F. F., & Posada-Amarillas, A. (2005). *Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol*. *27*, 104–112. https://doi.org/10.1016/j.physe.2004.10.014

Smith, W., & Hashemi, J. (2014). *Fundamentos Ciencia e Ingenieria Materiales*. https://chirinossilvaroger.files.wordpress.com/2012/05/fundamentos-de-la-ciencia-e-ingenieria-de-materiales-4ta-edicic3b3n-william-f-smith-javad-hashemi.pdf

Tamayo Molano, P. J. (2007). Enfermedades del Aguacate. *Revista Politénica*, *3*(4), 51–70. https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/62

Trapiella Alfonso, L. (2013). *Síntesis y evaluación de nanomateriales metálicos fluorescentes como marcadores en el desarrollo de inmunoensayos*. https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=84549

Vasudeo, K., & Pramod, K. (2016). Biosynthesis of Nickel Nanoparticles Using Leaf Extract of Coriander. *BioTechnology: An Indian Journal*, *12*(7), 1–6.

Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, A., Santoshi Kumari, A., Veerabhadram, G., & Girija Mangatayaru, K. (2014). A Novel Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Gum Karaya: Characterization, Antimicrobial and Catalytic Activity Studies. *Journal of Cluster Science*, *25*(2), 409–422. https://doi.org/10.1007/s10876-013-0620-1

Ventura, J. F. (2006). *Desarrollo de métodos analíticos medioambientales sostenible por espectrofotometría FTIR* [Universidad de Valencia]. https://doi.org/10.1080/00102208008946937

Yoosaf, K., Ipe, B. I., Suresh, C. H., & Thomas, K. G. (2007). *In Situ Synthesis of Metal*

Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. 12839–12847. https://doi.org/10.1021/jp073923q