



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**BETALAÍNAS: COLORANTE NATURAL EN LA
QUÍMICA VERDE Y SU CARACTERIZACIÓN
RAMAN
TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
ITZEL CASTILLO HERNANDEZ**



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Hugo Rubén Carreño Ortiz**

VOCAL: **Profesor: Juan Raúl Álvarez Idaboy**

SECRETARIO: **Profesor: Roberto Ysacc Sato Berrú**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Luis Alejandro Díaz Flores**

2° SUPLENTE: **Profesora: Claudia Inés Rivera Cárdenas**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA (ICAT)

ASESOR DEL TEMA:

ROBERTO YSACC SATO BERRÚ

SUSTENTANTE:

ITZEL CASTILLO HERNÁNDEZ

Agradecimientos

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN102917

Al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) en especial al personal del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE):

Dr. José Ocotlán Flores Flores

M. en C. Selene Rubí Islas Sánchez

Dr. Roberto Sato Berrú

M. en C. José Guadalupe Bañuelos Muñetón.

Al Dr. Francisco Paraguay Delgado por su apoyo en la toma de imágenes TEM del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua.

Índice

RESUMEN.....	1
OBJETIVOS	3
GENERAL	3
ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO 1. BETALAÍNAS.....	4
COLORANTES NATURALES.....	4
BETALAÍNAS.....	6
<i>Estructura</i>	7
<i>Estabilidad de betalaínas</i>	16
FUENTES DE BETALAÍNAS	20
<i>Bugambilia</i>	24
<i>Betabel</i>	25
USOS Y PROPIEDADES DE LAS BETALAÍNAS	26
<i>Antioxidante</i>	27
<i>Anticancerígeno</i>	28
<i>Hipolipemiente</i>	28
<i>Antibacteriano</i>	30
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	30
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS	32
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	32
MÉTODOS DE SÍNTESIS	33
<i>Síntesis verde de nanopartículas</i>	35
CAPÍTULO 3. ESPECTROSCOPIA RAMAN	38
ESPECTROSCOPIA RAMAN	38
ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFICIE	41
APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	44
APLICACIÓN DEL EFECTO SERS	46
CAPÍTULO 4. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	47
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE	47
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INFRARROJA	50
TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	54
<i>Espectroscopia de absorción UV-visible</i>	54

<i>Microscopia electrónica de transmisión</i>	56
QUÍMICA COMPUTACIONAL	58
<i>Métodos computacionales</i>	58
<i>Programas de cálculo</i>	61
<i>Usos de la química computacional</i>	63
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	65
<i>Materia prima</i>	65
<i>Reactivos</i>	65
<i>Equipos de laboratorio</i>	65
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	69
CONCLUSIONES	98
ANEXO I	100
ANEXO II	102
BIBLIOGRAFÍA	104

Índice de figuras y gráficas

Figura 1. Estructuras generales de las betalaínas.....	8
Figura 2. Estructuras representativas de betacianinas	9
Figura 3. Estructuras principales del Grupo betanina	10
Figura 4. Estructuras principales del grupo Bougainvillein	11
Figura 5. Estructuras principales del grupo amarantina.....	12
Figura 6. Estructuras principales del grupo gomfrenina.....	12
Figura 7. Estructuras de principales betaxantinas	15
Figura 8. Diagrama energético de la dispersión de luz.	39
Figura 9. Tipos de vibraciones moleculares	52
Figura 10. Brácteas de bugambilia de diferentes colores.....	69
Figura 11. Espectros de absorción UV-vis de betalaínas	70
Figura 12. Espectros de absorción UV-vis de betalaínas	71
Figura 13. Color de los extractos de bugambilia morada al modificar el pH.....	72
Figura 14. Cambio de color de los extractos de brácteas naranja al modificar el pH.....	73
Figura 15. AgNPs sintetizadas con extracto de brácteas moradas.....	75
Figura 16. Micrografías TEM representativas de AgNPs.	76
Figura 17. Extracto de brácteas moradas a T_{amb} en el tiempo.....	76
Figura 18. AgNPs sintetizadas con extracto de brácteas naranjas.....	78
Figura 19. Micrografías TEM representativas de AgNPs.	78
Figura 20. Extracto de brácteas naranjas a T_{amb} en el tiempo.....	79
Figura 21. AgNPs sintetizadas con extracto de betabel	81
Figura 22. Micrografías representativas TEM de NPs.....	81
Figura 23. Extracto de betabel a T_{amb} en el tiempo.....	81
Figura 24. Molécula mayoritaria en brácteas moradas.	82
Figura 25. Molécula mayoritaria en brácteas naranjas.	88
Figura 26. Moléculas mayoritarias en betabel	93
Gráfica 1. Espectro UV-vis del extracto de brácteas moradas a diferentes pH.	72
Gráfica 2. Espectro UV-vis del extracto de brácteas naranjas a diferentes pH.....	73
Gráfica 3. Espectros UV-vis de AgNPs obtenidas con extracto de brácteas moradas.....	75

Gráfica 4. Espectros UV-vis de AgNPs obtenidas con extracto de brácteas naranjas.....	77
Gráfica 5. Espectros UV-vis de AgNPs obtenidas con extracto de betabel.	80
Gráfica 6. Espectro infrarrojo del extracto de brácteas moradas.	83
Gráfica 7. Espectro Raman del extracto de brácteas moradas.....	84
Gráfica 8. Espectro experimental (a) y calculado (b, c) de vibraciones Raman.	85
Gráfica 10. Espectro infrarrojo del extracto de brácteas naranjas.....	89
Gráfica 11. Espectro Raman del extracto de brácteas naranjas.	89
Gráfica 12. Espectro experimental SERS (a) y calculado de vibraciones Raman (b).	90
Gráfica 13. Espectro infrarrojo del extracto de betabel	94
Gráfica 14. Espectro Raman del extracto de betabel.....	94
Gráfica 15. Espectro experimental SERS (a) y espectros calculados de vibraciones Raman (b, c).....	95

Índice de tablas

Tabla 1. Principales colorantes sintéticos usados en México.....	5
Tabla 2. Lista de algunas Betacianinas identificadas	10
Tabla 3. Lista de betaxantinas estructuralmente identificados	14
Tabla 4. Contenido de betalainas en otras plantas	21
Tabla 5. Frecuencias de grupos funcionales orgánicos comunes	53
Tabla 6. Asignación de bandas de las señales características observadas en los espectros teóricos y experimentales	87
Tabla 7. Asignación de bandas de las señales características observadas en el espectro teórico y experimental.	92
Tabla 8. Asignación de bandas de las señales características observadas en los espectros teóricos y experimentales.	97

Abreviaturas usadas

NP: nanopartícula

TEM: Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución

SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy): Espectroscopia Raman aumentada en superficie.

SPR: resonancias de plasmón superficial

λ : longitud de onda

nm: nanómetro

UV-Vis: ultravioleta- visible

IR: infrarrojo

CD: ciclo DOPA

AB: ácido betalámico

Bn: betanina

Bdn: betanidina

DFT: Teoría del funcional de densidad

Resumen

Para este trabajo se busca extraer las betalaínas que son un grupo de moléculas orgánicas hidrosolubles utilizadas como colorante natural, estas moléculas son conocidas por su capacidad antioxidante. En una primera etapa se exploró y desarrolló una técnica de extracción utilizando brácteas de bugambilia (*Bougainvillea*) y betabel (*Beta vulgaris*); para ello se empleó como disolvente una mezcla de agua y metanol (80:20), luego se dejó en contacto el material vegetal y disolvente a temperatura ambiente durante 24 horas. La caracterización inicial del extracto fue realizada por espectroscopia de absorción UV-Vis con bandas características en 476 nm para las brácteas de color naranja por la presencia de betaxantinas y en 549 nm para las brácteas de color morado debido a las betacianinas. El extracto de betabel presentó dos bandas de absorbancia en 481 nm y 535 nm; debido a que el extracto contiene ambas moléculas, betaxantinas y betacianinas.

En una segunda etapa se exploró la síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNPs) en coloide usando los extractos de betalaínas como agentes reductores. Para ello se mezcló el extracto (5%) con nitrato de plata (10^{-4} M), luego fueron colocados por 24 horas en condiciones de oscuridad y bajo una fuente de luz blanca donde se observa que en ambos hay un cambio de color que demuestra que la síntesis de nanopartículas es positiva. Así tanto la extracción como la síntesis de nanopartículas cumplen con los principios de la química verde al no utilizar reactivos agresivos.

La formación de NPs se monitoreo mediante espectroscopia UV-Vis dando resonancias de plasmón superficial (SPR) entre 417 - 449 nm y las imágenes TEM confirman NPs de forma semiesférica.

La tercera etapa consistió en la caracterización vibracional de las moléculas presentes en los extractos por espectroscopia infrarroja y Raman; en los extractos de la primera etapa la espectroscopia Raman presentó un problema con las moléculas orgánicas: la fluorescencia, lo cual oculta la señal. Con la preparación de AgNPs en coloide su aplicación en la Espectroscopia Raman de Superficie Aumentada por sus siglas en inglés (SERS) se mejora la intensidad de la señal por moléculas adsorbidas sobre la superficie metálica; esto permite la detección de vibraciones moleculares y además la fluorescencia puede ser disminuida por esta interacción.

La asignación en los espectros SERS se realizó por comparación con los espectros IR, así como con los espectros Raman calculados teóricamente mediante el software Gaussian 09; donde se obtuvo el cálculo teórico de frecuencias de vibración por el método DFT (Teoría del funcional de densidad).

Objetivos

General

Identificar las moléculas de betalaínas presentes en los extractos de betabel y brácteas de bugambilia mediante espectroscopia Raman y el efecto SERS.

Específicos

Extracción de betalaínas de bugambilia (*Bougainvillea*) y betabel (*Beta vulgaris*) con una mezcla de agua con metanol.

Estudiar las betalaínas por espectroscopia UV-Vis e identificar estructuralmente estas moléculas mediante el análisis vibracional por espectroscopia infrarroja, espectroscopia Raman y el efecto SERS.

Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) en una suspensión coloidal aplicando la química verde mediante reducción de nitrato de plata (AgNO_3) se observó el efecto de una reacción química y fotoreducción.

Caracterizar las nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Visible y microscopia electrónica de transmisión (TEM).

Obtener las vibraciones moleculares de las principales moléculas de betalaínas presentes en los extractos realizando cálculos en el software Gaussian 09.

Capítulo 1. Betalaínas

Colorantes naturales

El color es una propiedad de la materia relacionada con el espectro de luz, el ojo humano solo puede percibir la energía correspondiente a longitudes de onda entre 380 y 780nm. Una **definición de color es** “la parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo”.

Los colorantes son moléculas que, por su estructura química absorben luz a cierta longitud de onda y reflejan el resto que define el color que percibe el ojo humano. El cromóforo es la parte de la molécula responsable del color por la cadena de dobles enlaces conjugados que generan un sistema resonante.

La mayoría de los alimentos presentan su color debido a las sustancias colorantes que contienen o se añaden. En muchos casos, los colorantes además tienen una función biológica como la clorofila que participa en la fotosíntesis y de la mioglobina en el almacenamiento de oxígeno en el músculo, entre otros.

Los colorantes alimenticios son sustancias adicionadas de manera intencional en cantidades limitadas a los alimentos con el propósito de mantener el color y la apariencia. El color es la principal cualidad organoléptica para atraer al consumidor, ya que se relaciona con la aceptación o rechazo de un producto además del sabor, olor y textura.

Los colorantes se pueden clasificar en naturales que son obtenidos de microorganismos, una fuente vegetal, animal o mineral presentes en la naturaleza y los sintéticos que son sintetizados con sustancias químicas con alto grado de pureza; de estos se han estudiado bastante por

posibles efectos sobre la salud, por lo que se ha reducido el uso en alimentos y se prefiere utilizar mayoritariamente los naturales aunque depende de la legislación dentro de cada país si aprueba o no el uso de cierto colorante. (Badui , 2006)

En la tabla 1 se muestran los principales colorantes sintéticos que se emplean en la actualidad en México.

Tabla 1. Principales colorantes sintéticos usados en México

Colorante	Otro nombre
Tartrazina	Amarillo 5
Amarillo ocaso	Amarillo 6
Azorrubina	carmoisina
Ponceau 4R	Rojo cochinilla
Rojo allura	Rojo 40
Verde FCF	Verde 3
Eritrosina	Rojo 3
Azul brillante	Azul 1
Indigotina	Azul 2

Referencia: ACUERDO por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.

Los pigmentos sintéticos tienen las siguientes ventajas:

- Firmeza de color
- Amplio intervalo de tinte
- Bajo costo
- Alta efectividad
- No presenta aromas o sabores

Los colorantes naturales difieren en su estructura química y su origen. Los más comunes en alimentos pueden clasificarse en:

-carotenoides

-clorofilas

-pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos

-betalaínas

-hemopigmentos

Las betalaínas se obtienen de las raíces de remolacha (*Beta vulgaris* L. var rubra) como jugo prensado o por extracción acuosa compuesto principalmente por betacianinas (rojas) de las cuales la betanina representa el 75-95%; cantidades menores de betaxantinas (amarillo) y productos de degradación pueden estar presentes. Además de los colorantes, el jugo o extracto consiste en azúcares, sales y /o proteínas que se encuentran naturalmente en la remolacha.

Las betalaínas son uno de los pigmentos autorizados en México como aditivos por la COFEPRIS que pueden ser utilizados de acuerdo con Buenas Prácticas de Fabricación; se comercializa en presentaciones líquidas o en polvo de betabel hidrosoluble con el nombre rojo betabel o rojo remolacha.

Betalaínas

El termino betalaína (del latín: beta= remolacha, betabel) fue acuñado en 1968 por Mabry y Dreiding para los pigmentos N-heterocíclicos rojo y amarillo de betabel y tuna, que hasta entonces habían sido llamados flavocianinas (betaxantinas, griego: xanthos= amarillo) y antocianinas nitrogenadas (betacianinas, griego: kyaneos= azul) respectivamente. (Stintzing & Carle, 2007)

Son un grupo de aproximadamente 70 pigmentos naturales que se dividen en dos clases: los rojos o betacianinas y los amarillos o betaxantinas y su color no se ve afectado por el pH, contrariamente a las antocianinas. Son hidrosolubles con peso molecular entre 400 y 500 y existen como sales internas (zwitteriones) en las vacuolas de las células vegetales que las sintetizan, sobre todo en tejido epidermal y subepidermal

Estos producen la coloración púrpura en frutos de cactáceas (tunas, pitaya, garambullo, jiotilla) y en raíces de betabel. También se encuentran en brácteas de bugambilia que posee una amplia gama de colores y en las semillas de amaranto.

Se ha aislado una betacianina violeta: la muscapurpurina y siete betaxantinas amarillas: muscaurinas, del hongo venenoso *Amanita muscaria*.

Estructura

La fórmula general de las betalaínas (Figura 1.a) representa la condensación de una amina o ciclo DOPA con el ácido betalámico (Figura 1.b) y la estructura del cromóforo de las betalaínas es un derivado del sistema 1,7-diazaheptametina protonado (figura 1.c). **Cuando R' no** amplía la conjugación del sistema, el compuesto exhibe un máximo de absorción de luz a unos 480 nm característico de las betaxantinas. Si la conjugación se amplía **a R' el** máximo de absorción se desplaza aproximadamente a 540 nm produciendo el color rojo en betacianinas. (Fennema, 1995)

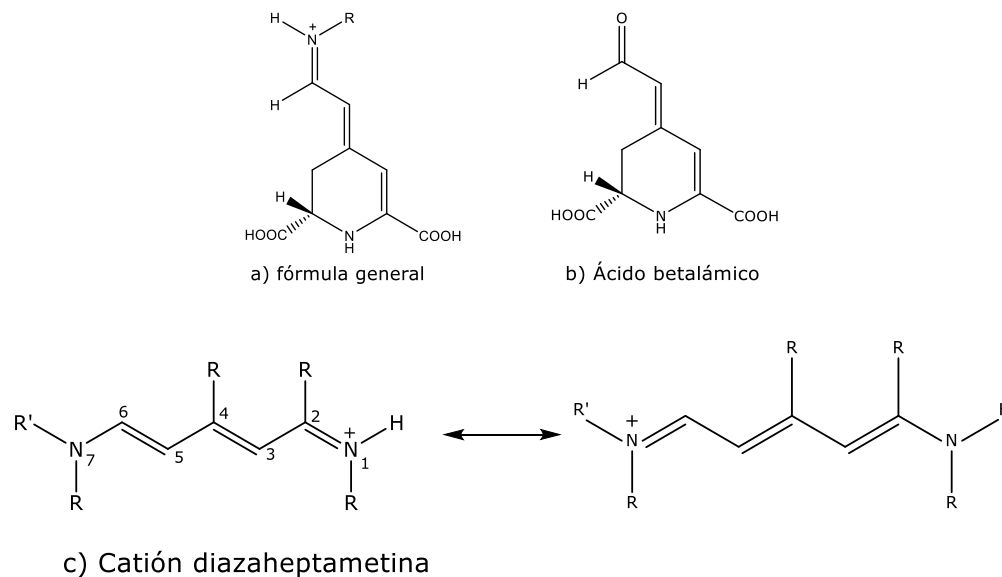


Figura 1. Estructuras generales de las betalainas

Betacianinas

Las betacianinas son producto de condensaci3n de 3cido betal3mico con ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo DOPA) y muestra variaciones en colores rojo y violeta producidos por diferentes patrones de sustituci3n de azúcares y ácidos a trav3s de uno de los grupos hidroxilo situados en la posici3n C₅ y C₆ en el anillo arom3tico. Los azúcares esterificados m3s comunes son la glucosa, soforosa y ramnosa. Pueden estar aciladas con grupos sulfuro, mal3nico, cítrico, 3-hidroxi-3-metilglutarico (HMG), *p*-cum3rico, ferúlico, cafeico y sinapico entre otros, sin embargo se pueden hidrolizar con ácidos o enzimas y formar la aglicona llamada betanidina y el azúcar respectivo.

Las betacianinas son ópticamente activas porque tienen 2 carbonos quirales C₂ y C₁₅. Es una mol3cula polar por los tres grupos carboxilos, adem3s del grupo fen3lico

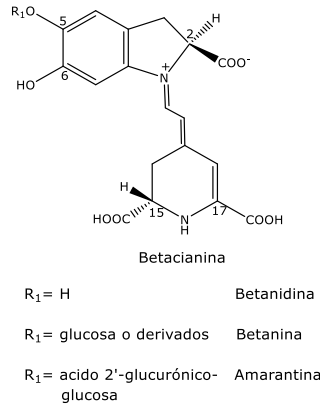


Figura 2. Estructuras representativas de betacianinas

Las betacianinas de las plantas de *Bougainvillea glabra* son responsables de los espectaculares colores de sus brácteas. Así Wyler y Dreiding aislaron cuatro betacianinas de una variedad violeta de *B. glabra* y dos de una variedad roja de *B. spectabilis* todas ellas cromatográficamente y electroforéticamente diferentes de otras betacianinas conocidas en ese momento es decir: betanina, amarantina y gromfrenina. Posteriormente Piatelli e Imperato identificaron por medios químicos varios derivados hidroxicinámicos de betanidina 5-O- β -soforosidos (Bougainvillein-r en pigmentos rojo-violeta) y de manera similar aciladas en 6-O- β -soforosidos (Bougainvillein-V en pigmentos violeta-rojo).

Las diferentes sustituciones de la Bougainvillein-V en el hidroxilo C₆ de la betanidina y la complejidad de la conjugación llevo a identificar compuestos mediante técnicas espectroscópicas; en un estudio se muestran el aislamiento de 9 componentes acilados de una mezcla compleja de betacianinas en brácteas de *B. glabra Choisy*. (Heuer, y otros, 1994)

Para simplificar, en base a sus grupos unidos, las betacianinas se han clasificado en grupos como: betanina, amarantina, buganvilleina y

gomfrenina, como se muestran algunas estructuras identificadas hasta la fecha en la Tabla 2. La betacianina más abundante en betabel es la betanina (betanidina-5-*O*- β -glucósido) de la figura 3.2 y la más abundante en bugambilia morada es 6',6''-di-*O*-(*E*)-*p*-coumaroil-bougainvillein-*v* de la figura 4.12. (Heuer, y otros, 1994) (Kugler, Stintzing, & Carle, 2007)

A continuación se muestra en la tabla 2 la clasificación de betacianinas de sus principales fuentes.

Tabla 2. Lista de algunas Betacianinas identificadas

Grupo betanina		
Betacianina	Fuente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Betanidina (1)	<i>Beta vulgaris</i>	541
Betanina (2)		537
2-descarboxi-betanina (3)		532
6'- <i>O</i> -Malonil-2-descarboxi-betanina (4)		535
Neobetanina (5)		267,306,470

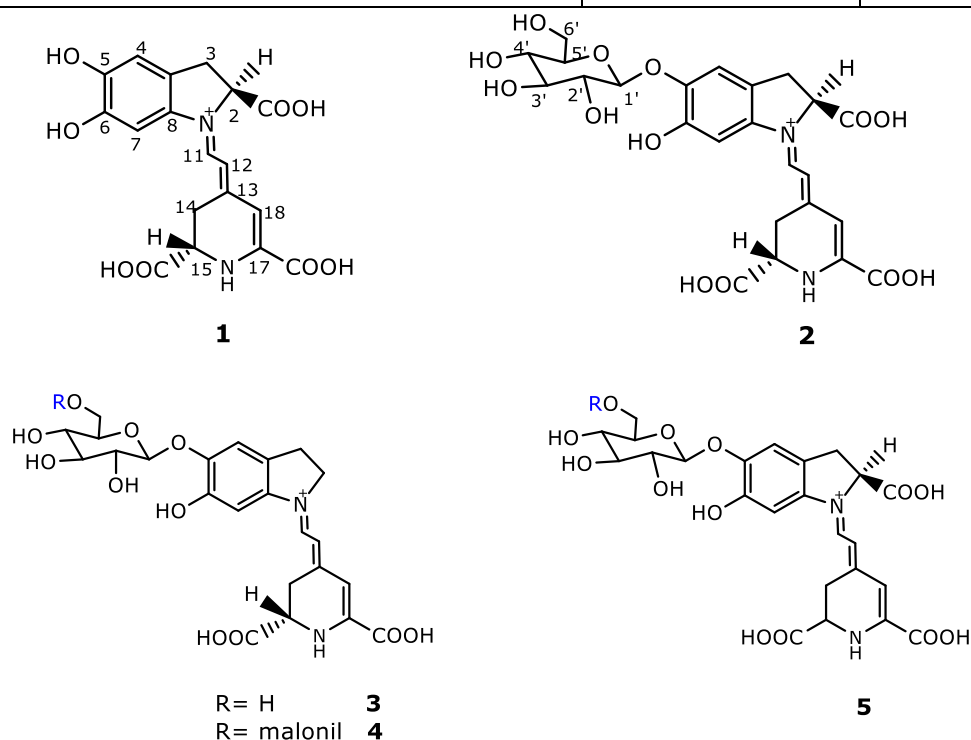


Figura 3. Estructuras principales del Grupo betanina

Grupo buganvilleina		
Betacianina	Fuente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Bougainvillein-r I (6)	<i>Bougainvillea</i>	538
Bougainvillein-r III (7)	<i>glabra</i>	540
Bougainvillein-v (8)	<i>B. glabra</i> var. <i>sanderiana</i>	540
6'-O-(E) cafeoil Bougainvillein-v (9)	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	316, 545
6'-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil Bougainvillein-v (10)		306, 540
6''-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil Bougainvillein-v (11)		306, 540
6',6''-di-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil -bougainvillein-v (12)		307, 548
2''-O{[6'-O-(E)-cafeoil]-[6''-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil]}-glucosil-bougainvillein-v (13)		312, 547
2''O[6',6''-di-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil]-Glucosil-bougainvillein-v (14)		307, 548
2''-O{[6'-O-(E)-cafeoil]-[6''-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil]}-soforosil-bougainvillein-v (15)		312, 549

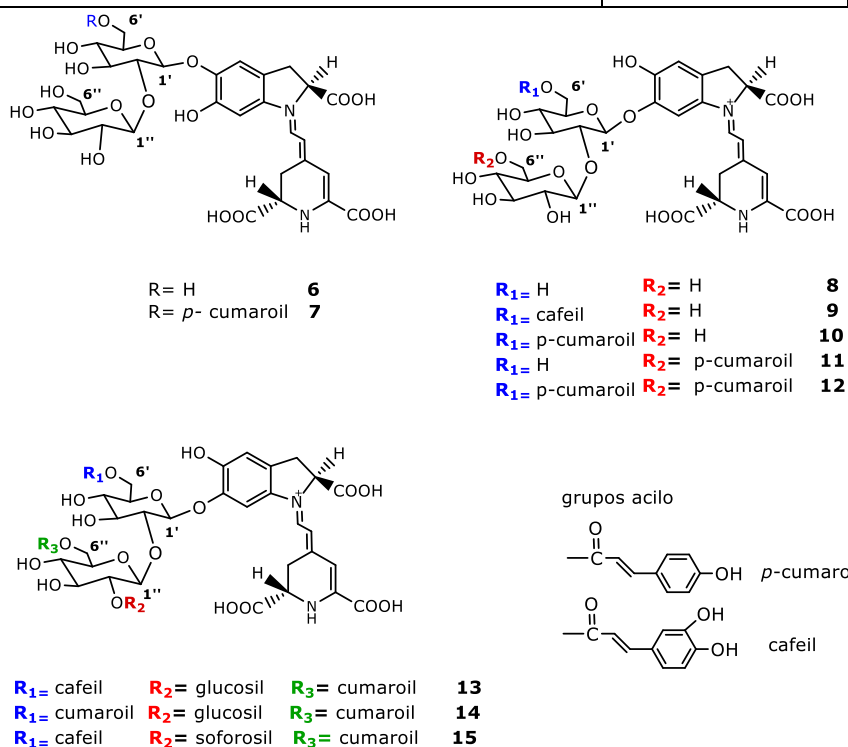


Figura 4. Estructuras principales del grupo Bougainvillein

Grupo amarantina	Fuente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Amarantina (16)	<i>Amaranthus cruentus</i>	536
Iresina I (17)	<i>Iresine herbstii Hook.</i>	298,540

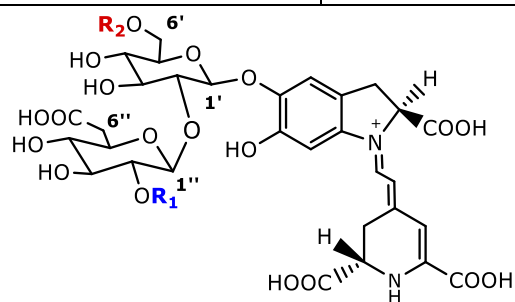


Figura 5. Estructuras principales del grupo amarantina

Grupo gomfrenina	Fuente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Gomphrenin I (18)	<i>Gomphrena globosa L.</i>	543
Gomphrenin II (19)		550
Gomphrenin III (20)		550

(Khan & Giridhar, 2015)

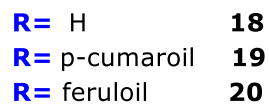
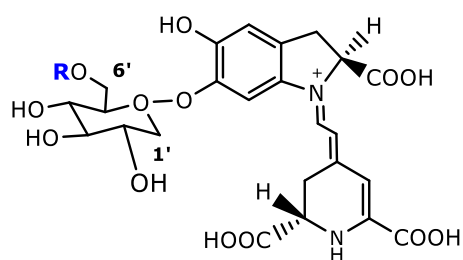


Figura 6. Estructuras principales del grupo gomfrenina

Betaxantinas

Las betaxantinas son pigmentos amarillos que absorben a una longitud de onda entre 460 y 480 nm. En su estructura el anillo ciclo Dopa es desplazado por un grupo amino o un aminoácido. En los frutos de cactus (*Opuntia ssp.*) la principal betaxantina es la Indicaxantina que contiene prolina. En el betabel se encuentran Vulgaxantina I y II que contienen glutamina y ácido glutámico respectivamente. (Herbich, Stintzing, & Carle, 2006)

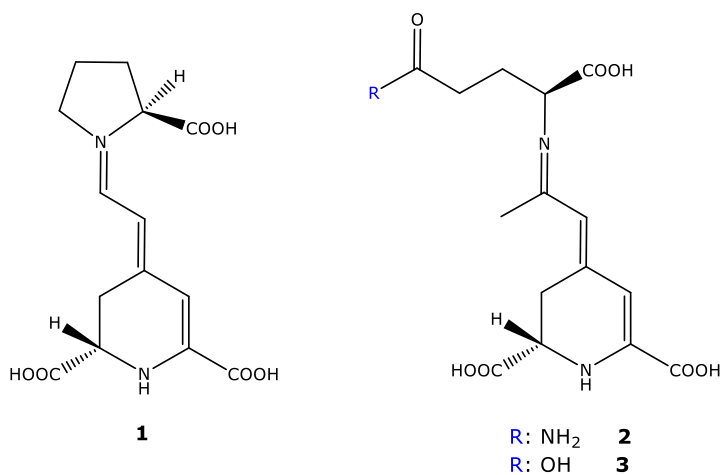
La miraxantina se encontró en las flores de *Mirabilis jalapa*, y la portulaxantina ha sido aislada de los pétalos de *Portulaca grandiflora*

En bugambilia Dopa-betaxantina fue el principal pigmento seguido de putrescina-bx según el reporte de (Kugler, Stintzing, & Carle, 2007).

Además de poseer color, las betaxantinas presentan fluorescencia: absorben luz en el rango visible del espectro electromagnético correspondiente al color azul y emiten radiación de una longitud de onda superior al incidente, en este caso para las betaxantinas emiten fluorescencia verde. (García Carmona, Gandía Herrero, & Escribano, 2011)

Tabla 3. Lista de betaxantinas estructuralmente identificados

Betaxantina	Fuente	Residuo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Indicaxantina 1	<i>Opuntia ficus indica</i>	Triptófano	260, 305, 485
Vulgaxantina I 2	<i>Beta vulgaris</i>	Glutamina	470
Vulgaxantina II 3		Ac. glutámico	469
Vulgaxantina III 4		Asparagina	470
5		Valina	470
6		Isoleucina	470
7		Fenilalanina	472
8		Alanina	468
9		<i>Bougainvillea sp.</i>	Putrescina
10	Lisina		458
11	Dopaxantina		472
12	Histidina		472



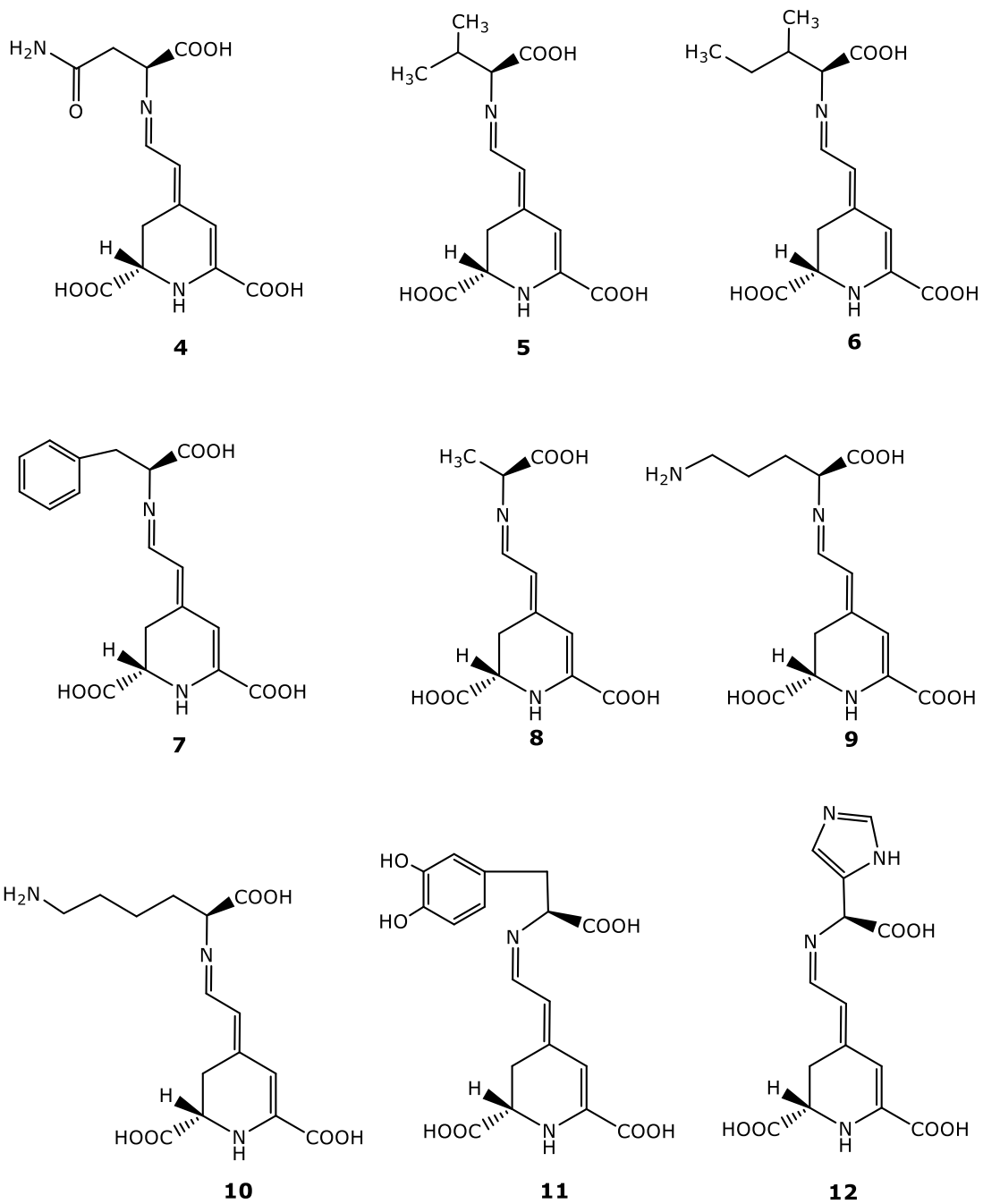


Figura 7. Estructuras de principales betaxantinas

Estabilidad de betalaínas

Las betalaínas como algunos otros colorantes naturales son afectadas por factores ambientales como el pH, temperatura, luz, actividad acuosa y oxígeno.

Varios estudios han reportado que las betaxantinas se degradan con mayor rapidez que las betacianinas a temperatura ambiente y al tratamiento térmico. Por ejemplo la vida media de la betanina tratada térmicamente fue 11 veces mayor que la Vulgaxantina I.

Comparando la estabilidad de diferentes betacianinas, las estructuras glucosiladas son más estables que agliconas. La aglicona (betanidina) es más susceptible a la degradación por oxígeno molecular. (Stintzing & Carle, 2004)

pH

Las betalaínas presentan una estabilidad en el rango de pH 3- 7 con un color rojo de las soluciones de betanina. El pH óptimo para la máxima estabilidad de betanina ha sido reportado entre pH 5- 6 (von Elbe J. , 1974). Además en presencia de oxígeno la betanina es más estable entre 5.5 y 5.8 y bajo condiciones anaerobias a valores de pH 4 - 5 son favorables. (Huang & Von Elbe, 1987).

Las betaxantinas presentan estabilidad a valores de pH ligeramente altos de 4 – 7 y la mayor estabilidad corresponde a pH 5.5 (Cai, Sun, Schliemann, & Corke, 2001)

Por debajo de pH 3.5, el máximo de absorción se desplaza hacia longitudes de onda inferior, y por encima de pH 7 el color de las soluciones de betanina se vuelve más azul, debido a un cambio de la absorción máxima hacia una longitud de onda superior; fuera del rango de pH 3.5 - 7 la intensidad de los espectros visibles disminuye. (Stintzing & Carle, 2004) Por encima de pH 10 disminuye la intensidad

del máximo de absorción de 540-550nm que va acompañado de un aumento en la absorción de 400-460 debido a la liberación del ácido betalámico, que es amarillo.

Las condiciones alcalinas provocan la hidrólisis del enlace aldimina generando ácido betalámico de color amarillo brillante y el ciclo-Dopa-5-O-glucósido incoloro; mientras que la acidificación induce una recondensación de ácido betalámico con el grupo amino o ciclo Dopa. La acilación con ácidos aromáticos o alifáticos puede proteger al enlace aldimina de la hidrólisis. Sin embargo los mecanismos de degradación de las betalaínas en medio ácido aun no son muy claros. (Herbch, Stintzing, & Carle , 2006)

A valores de pH bajos ocurre la isomerización del C₁₅ de betanina y betanidina en isobetanina e isobetanidina respectivamente y la deshidrogenación. (Azeredo, 2009). La isobetanina exhibe propiedades cromáticas idénticas a la betanina, por lo que no se observa cambio de color.

Temperatura

La temperatura se considera un factor importante para la estabilidad en el procesado y almacenamiento de las betalaínas.

Algunos estudios demuestran que el aumento de la temperatura y el periodo de calentamiento aumenta la velocidad de degradación de la betalaína y se informa que sigue una cinética de reacción de primer orden en un rango de pH de 3- 7 en condiciones aerobias, pero se desvía la cinética de primer orden en condiciones anaerobias. (Saguy, Kopelman, & Mizrahi, 1978)

La estabilidad térmica de las betalaínas es mayor entre pH 5 y 6 en presencia de oxígeno y en ausencia entre pH 4 y 5. (Jackman & Smith, 1996)

Durante el tratamiento térmico la betanina puede degradarse por isomerización, descarboxilación o escisión (por calor o ácidos) teniendo como resultado una disminución del color rojo y finalmente la aparición de un color marrón claro. (Azeredo, 2009)

Las betacianinas mantienen su color en la isomerización o descarboxilación en C₂ o C₁₅, esto puede resultar ser ventajoso, la descarboxilación en C₁₇ provoca un desplazamiento hipsocrómico del pico de absorción de 538 a 505 nm, dando un color rojo anaranjado. (Herbach, Stintzing, & Carle, 2004) (Schwartz & von Elbe, 1983)

La deshidrogenación forma neobetanina que es un producto de degradación térmica en el jugo de betabel rojo en condiciones aerobias, provocando un cambio de color amarillo. (Herbach, Stintzing, & Carle, 2004)

Oxígeno

Otro factor que contribuye a la degradación de las betalaínas es la presencia de oxígeno. Los bajos niveles de oxígeno en el almacenamiento de soluciones de betanina disminuyen la degradación del pigmento; en un estudio se almacenaron soluciones de betanina a pH 7 en atmósfera de aire y nitrógeno durante 6 días a 15 °C y se observó que la degradación del color aumenta hasta un 15% debido a las condiciones del aire. (Huang & Von Elbe, 1987).

La degradación térmica de la betanina en presencia de oxígeno sigue una cinética de primer orden, pero en ausencia la cinética es diferente. La estabilidad se ha visto mejorada por la adición de antioxidantes, controlando pH, tratamiento térmico mínimo o por una atmósfera de nitrógeno (Azeredo, 2009).

Luz

La degradación fotoquímica de estos pigmentos implica oxígeno molecular y sigue una cinética de primer orden. La foto-oxidación de las betalaínas de remolacha roja depende del pH con una mayor degradación a pH 3 que a pH 5. La exposición de las soluciones de betanina a la luz UV-visible aumenta la degradación hasta un 15%. Se explica que probablemente la absorción de la luz en el rango UV o **visible excita los electrones n del** cromóforo de las betalaínas a un estado más energético, esto provoca una mayor reactividad. (Jackman & Smith, 1996) (Sapers & Hornstein, 1979)

En un estudio se determinó la sensibilidad de la betanina a la degradación por aire y luz, almacenando soluciones de betanina en nitrógeno o aire a pH 7 durante 6 días a 15°C. La presencia de aire aumento la velocidad de degradación en 14.6% y a la luz de 15.6%. El aumento de la degradación causada por exposición a aire y luz fue de 28.6% que indicó ser dependiente de ambos factores. (von Elbe J. , 1974)

Actividad de agua (Aw)

Es un factor para determinar la susceptibilidad del pigmento a la hidrólisis del enlace aldimina. La mayor estabilidad del pigmento fue encontrada en alimentos o sistema modelo con bajo contenido de humedad y de aw. Debajo de 0.63 mejora la estabilidad de betanina puede ser debido a la baja movilidad del reactivo o la solubilidad limitada de oxígeno. (Simon, Drdák, & Cruz, 1993). Se encontró un aumento de aproximadamente un orden de magnitud en la degradación de betalaínas cuando aumentó el aw de 0.32 a 0.75. (Cohen & Saguy, 1983)

Fuentes de betalaínas

Betalaínas y antocianinas no se han hallado juntas en la misma planta. Las plantas que contienen betalaínas se limita a 10 familias del orden Centrospermae. Se ha encontrado que las betalaínas se acumulan en hojas, tallos, raíz, frutas, inflorescencias, brácteas y granos. La tabla 4 contiene una lista de algunas plantas que contienen betalaínas. Son pocas las fuentes comestibles conocidas: betabel rojo y amarillo, el grano o la hoja de amaranto (*Amaranthus sp.*) y los frutos de cactus del genero *Opuntia* como la tuna e *Hylocereus* como la pitahaya.

También se han encontrado una betacianina violeta de origen fúngico: muscapurpurina del hongo venenoso *Amanita muscaria* y siete betaxantinas amarillas.

Tabla 4. Contenido de betalainas en otras plantas

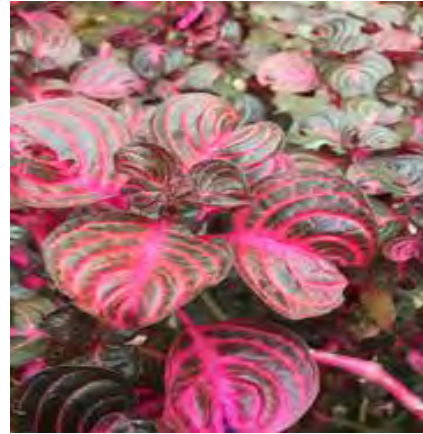
Familia	Especie	Nombre común/parte pigmentada	Contenido de betalainas (mg/100 g)
Aizoaceae	<i>Erepsia spp.</i>	Planta de Rocío /pétalo	0.8-31
	<i>Lampranthus productus</i>	Planta de Rocío purpura/flor	6-417
Amaranthaceae	<i>Celosia spp.</i>	Cresta de gallo / Inflorescencias	31-117
	<i>Iresine herbstii Hook. F.</i>	Hojas de sangre/ hoja	75
	<i>Gomphrena globosa L.</i>	Amaranto globoso/ inflorescencia	7.6-55.7
Basellaceae	<i>Basella alba L.</i>	Espinaca de Malabar/ fruto	36.1
	<i>Ullucus tuberosus</i>	Olluco, papa lisa/tubérculo	7
Cactaceae	<i>Hylocereus sp.</i>	Pitahaya/ fruta	31-41
	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Garambullo/fruta	214
	<i>Opuntia matudae cv. Cuaresmeno</i>	Xoconostle/fruta	10-20.2
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Betabel, remolacha/ raíz	40- 200
	<i>Chenopodium rubrum L.</i>	Pata de gallo rojo/flor	NA
	<i>C quinoa Willd</i>	Quinoa/ grano	NA
	<i>Spinacia oleraea</i>	Espinaca/hoja	NA

Didiereaceae	<i>Didieria madagascariensis.</i>	Árbol de pulpo	NA
Nyctaginaceae	<i>Mirabilis jalapa</i>	dondiego de noche, maravilla del Perú	6.5
	<i>Boerhavia erecta</i>	Hierba blanca	185.5
	<i>Bougainvillea sp.</i>	Bugambilia/bráctea	259-551
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana L.</i>	Cola de caballo/ fruta	0.18
	<i>Rivina humilis L.</i>	Coralillo, colorines /fruta	350
Portulacaceae	<i>Portulaca grandiflora</i>	verdolaga de flor	12.5-17.8
	<i>P. oleracea L.</i>	Verdolaga/petalo, tallos	NA
Talinaceae	<i>Talinum triangulare</i>	Hoja de agua/ flor, hoja	109.7–499.3

Referencia (Khan & Giridhar, 2015)



Portulaca grandiflora (2017)



Iresine herbstii. (2015).



Pitahaya *Hylocereus* (2015).



Xoconostle *Opuntia matudae*.
(2018).



Mirabilis jalapa. (2014)



Cola de caballo *Phytolacca americana*. (2017).

Imágenes recuperadas de www.inaturalist.org

Bugambilia

Bougainvillea glabra

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

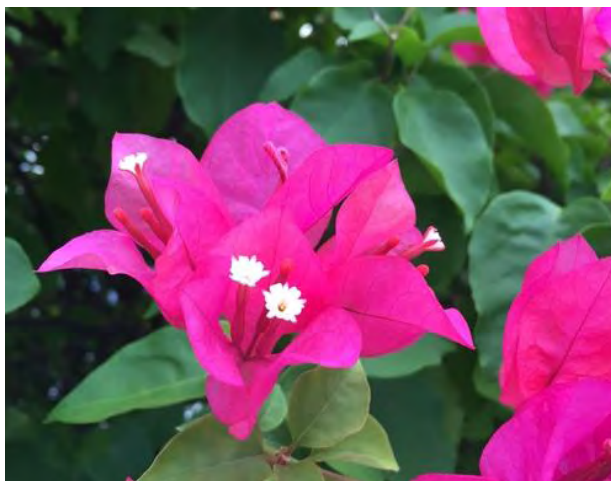
Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Nyctaginaceae*

Género: *Bougainvillea*

Especie: *Bougainvillea glabra*



recuperado de <http://www.naturalista.mx/observations/3849483>

Nombres comunes: Bugambilia, Bombilla, Camelina, Carolina.

Es un género de plantas que pertenece a la familia *Nyctaginaceae* originaria de Brasil, su nombre proviene de Louis Antoine de Bougainvillea que era un navegante francés y militar que fue la primera persona en tomar nota de esta planta en 1768.

Este género tiene alrededor de 27 especies de las cuales 3 son de importancia hortícola *Bougainvillea spectabilis Willd*, *Bougainvillea Glabra Choisy* y *Bougainvillea peruviana*. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco, muy seco y templado.

Las bugambilias son arbustos trepadores, los tallos leñosos pueden ser lisos o pubescentes, con o sin espinas dependiendo de la especie. Las hojas son alternas, ovaladas a elípticas lanceoladas de 4 a 10 cm de color verde. Tiene 3 flores blancas pequeñas que están cubiertas por brácteas (hojas modificadas), llamativas de color rojo, rosa, morada, anaranjada o blanca. De uso ornamental cultivada en huertos familiares, jardines, bardas, y en zonas urbanas.

B. spectabilis presenta espinas y pelo en tallos y hojas. Arbustos extendidos o trepadores, con espinas fuertes y generalmente rectas. Las hojas son más largas que anchas. Informes indican que las hojas de *B. glabra* tienen actividad insecticida, anti-inflamatoria, antidiarreica, antimicrobiana, anti ulcera.

Betabel

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Subfamilia: Chenopodioideae

Género: Beta

Especie: Beta vulgaris



Nombres comunes: betabel, remolacha, betarraga, acelga.

Se trata de un tallo engrosado bulboso comestible, es un alimento nutritivo y muy usado en ensaladas y jugos. El jugo tiene importantes cantidades de vitamina B, hierro, magnesio y potasio.

Existen variedades de esta especie, es una planta que dura un año o dos, con las raíces carnosas y gruesas, tienen un color rojo-púrpura. Las hojas cerca del suelo están arregladas como los pétalos de las rosas de hasta 20 cm de largo son de color verde intenso y los peciolos, es decir, los tallos de las hojas con de color rojo o púrpura. Las flores son amarillas de unos 5mm de longitud. Los frutos tienen las semillas exteriores. Los betabeles se cosechan cuando el bulbo alcanza un

diámetro de ocho a diez centímetros. También puede saberse el momento adecuado para la recolección cuando han pasado de dos a tres meses desde la siembra.

Las otras variedades tiene otras utilidades como la acelga (*Beta vulgaris var. Cicla*) una subespecie, la diferencia es que se aprovechan las hojas en lugar de raíces. El azúcar se extrae de algunas variedades de *Beta vulgaris*.

Usos y propiedades de las betalaínas

Las betalaínas de betabel han sido las más estudiadas y utilizadas como aditivos en alimentos con clasificación de colorante natural. Su uso se restringe a alimentos como gelatinas, yogurt, productos lácteos, jaleas, mermeladas y en confitería.

Cuando los pigmentos están en flores o frutos pueden tener un papel como atrayentes para los vectores (insectos o aves) en el proceso de polinización y dispersadores de semillas, se ha sugerido la acumulación de betalaínas en betabel como almacenamiento de carbohidratos. (Delgado Vargas, Jiménez , & Paredes Lopez, 2010)

El uso más común de la bugambilia en México es contra la tos y otros padecimientos respiratorios como en ronquido, gripa y bronquitis usando las brácteas en infusión mezcladas con miel.

Además de ser relevantes como colorantes varios trabajos han confirmado que juegan un papel importante en la salud humana por elevada actividad antioxidante, anticancerígena, hipolipemiente y antimicrobiano, se sabe también que participan en la eliminación del ácido hipocloroso, producto de la enzima mieloperoxidasa implicado en la respuesta inflamatoria. Se informó que el consumo de la cáscara del fruto de *xoconostle* puede ser útil en el control de glucosa sérica en

individuos con diabetes mellitus tipo 2 y en personas sanas puede prevenir la hiperglucemia, niveles altos de colesterol y triglicéridos que se pueden relacionar con el síndrome metabólico. (Pimienta Barrios, Méndez Morán, Ramírez Hernández, García de Alba, & Domínguez Arias, 2008)

Antioxidante

Los antioxidantes son compuestos químicos que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres; que son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células producen la oxidación de diferentes partes, alteran el ADN que provocan enfermedades degenerativas y muerte en las células. En diversos estudios se sugiere que los colorantes poseen actividad antioxidante y que su presencia en la dieta contribuye a reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

De acuerdo a reportes de Escribano *et al.*, 1998, la actividad antirradical *in vitro* de las betacianinas fue mayor que la de las betaxantinas. La relación estructura-actividad de betalaínas con su capacidad de eliminación de radicales libre fue estudiado por (Cai *et al.* 2003, 2005) donde encontraron que la actividad de eliminación de radicales libres aumenta con el número de grupos hidroxilo e imino, además dependía de la posición de grupos hidroxilo y la glucosilación de agliconas en las moléculas de betalaínas. En betacianinas una mayor glucosilación reduce la actividad mientras que la acilación mejora la actividad antioxidante. Además las betacianinas 6-O-glicosiladas exhiben una actividad antioxidante mayor que las 5-O-glicosiladas. La posición C₅ del hidroxilo sobre la aglicona mejora la actividad antioxidante. (Cai, Sun, & Corke, 2003)

(Vaillant, Perez, Davila, & Dornier , 2005) Observaron que la capacidad antioxidante in vitro de la pulpa de pitahaya es tan alta como del betabel. (Wu, y otros, 2006) Reportan que la cáscara de pitahaya contiene mayores niveles de betacianinas que la pulpa, presentó una mayor actividad antioxidante y fue inhibidor in vitro de la proliferación de células de melanoma.

Anticancerígeno

Un estudio demuestra la eficacia de la betanina administrada por vía oral para la supresión local a largo plazo de los tumores cutáneos y hepáticos inducidos por diferentes carcinógenos químicos en ratones. (Kapadi, Azuine, Sridhar, & et al, 2003)

Se encontró que las betalaínas presentes en el extracto de tuna inhiben el crecimiento de células de cáncer cervical, de ovario y vejiga en un estudio *in vitro* en ratones. Sin embargo el mecanismo del efecto anticancerígeno aún no está completamente claro. (Zou, Brewer, García, & et al., 2005)

Se encontró que los frutos de *Basella rubra* (espinaca india o malabar) eran ricos en compuestos bioquímicos como flavonoides, compuestos fenólicos y betalaínas. Los extractos presentaron actividad antioxidante y anticancerígena contra células de cáncer cervical humano, por lo que puede agregar un valor al uso de la fruta además de colorante natural como nutracéutico. (Kumar, Manoj, & Giridhar, 2015)

Hipolipemiante

Las dislipidemias son alteraciones en la concentración de algunas grasas en la sangre, principalmente colesterol y triglicéridos. La causa puede deberse a factores hereditarios, alimentación inadecuada y la inactividad física.

Recientemente se sugiere el uso de extractos de plantas como betalaínas para tratar o regular las condiciones de lipidemia por no presentar efectos secundarios ni toxicidad en comparación con los medicamentos sintéticos.

La administración de extracto de *Amaranthus tricolor* en dosis de 200 mg/kg y 400mg/kg de peso corporal a ratas diabéticas redujo significativamente los niveles de colesterol en sangre, triglicéridos y LDL e incremento los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) parece ser una fuente natural de ingredientes para el tratamiento en diabetes e hiperlipemia. (Clemente & Desai, 2011)

La alimentación con betabel tipo chips en ratas dislipidémicas disminuyó significativamente el nivel de glucosa en suero, niveles de colesterol sérico, triacilglicéridos y el peso corporal. (Wroblewska, Juszkiewicz, & Wiczkowski, 2011)

Experimentos in vivo en individuos obesos mostraron que las betalaínas en jugo de betabel y chips inhibían el metabolismo oxidativo de neutrófilos, lo que sugiere su aplicación en el tratamiento de hiperlipidemia. (Zielinbska-Przyjemska, Olejnik, & Dobrowolska-Zachwieja, 2009)

Ratas con hipercolesterolemia fueron tratadas con 300 mg/kg p.c. de cáscara y pulpa del fruto de pitahaya roja con lo que el colesterol total se redujo en un 51.36% y 43.53 respectivamente. El nivel de triglicéridos mostró una reducción del 42.98% en el grupo tratado con la cáscara y 38% en las ratas tratadas con el extracto de la pulpa. Esto podría deberse a un mayor contenido de antioxidantes en la cáscara. (Sani, Baharoom, Ahmad, & Ismail , 2009)

Antibacteriano

La actividad antimicrobiana de las betalaínas puede deberse a sus efectos sobre la estructura, función y permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos, lo que provoca la muerte celular (Gengatharan & Dykes, 2015)

El extracto de betabel inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhimurium*.

Los extractos ricos en betalaínas de pitahaya roja inhiben un amplio espectro antimicrobiano de bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia faecalis*, *Listeria monocytogenes*) a una concentración de 7.8 µg/mL, se inhiben las bacterias Gram negativas como (E. coli, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, P. Aeruginosa, *Salmonella typhi* Ty2, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumonia*, E. cloacae y E. aerogenes) a concentraciones de 15.6-62.5 µg/mL, levaduras (*Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*) a 125-250 µg / mL y hongos (*Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*) a 500 µg / ml. (Gengatharan & Dykes, 2015)

Extractos de *Bougainvillea glabra* fueron activos contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* por el método de difusión en agar con un halo de inhibición de 8-13mm (Enciso-Díaz, Méndez-Gutierrez, Hernández , & Sharma, 2012).

Métodos de extracción

Las betalaínas se obtienen principalmente a través de extracciones sólido-líquido los materiales generalmente se maceran o son molidos. Se puede extraer los colorantes con agua fría o a temperatura ambiente, aunque en muchos casos se requiere el uso de metanol o etanol en proporciones como: 60:40, 50:50 u 80:20 para una extracción

completa. Se ha informado que la acidificación del disolvente mejora la extracción de betacianinas y evita oxidación por polifenoloxidasas. (Azeredo, 2009)

Se ha informado la necesidad de una fermentación aerobia del jugo (por ejemplo; *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*) para reducir los azúcares libres y aumentar el contenido de betacianinas. Podría ser deseable la inactivación de enzimas degradativas mediante un tratamiento térmico corto a 70°C durante 2 min aunque esto puede degradar los pigmentos. La degradación de las betalaínas puede ocurrir muy rápidamente por tal motivo, la extracción se puede llevar a cabo con agua fría y en condiciones de oscuridad. (Delgado- Vargas et al., 2000)

En laboratorio las betalaínas se pueden extraer mediante diversos métodos como extracción por difusión, extracción sólido-líquido, osmosis inversa y ultrafiltración. Estos procesos son más eficientes para el betabel en comparación con técnicas hidráulicas pero más costosas. (Azeredo, 2009)

En un estudio se encontró que las condiciones óptimas para el proceso de extracción de betalaínas en brácteas florales era una masa de 3 g, 6 horas de tiempo de contacto y temperatura ambiente. En este estudio se usaron estas condiciones. (Kumar, Ritesh, Sharmila , & Muthukumaran, 2013)

Capítulo 2. Síntesis verde de nanopartículas

Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas (NPs) son partículas que tienen un tamaño menor de los 100 nanómetros (millonésima parte de un milímetro). Un nanómetro (nm) es 10^{-9} metros. Así surge la Nanociencia que estudia los fenómenos y manipulación de esos materiales a escala atómica, molecular y escala macromolecular. Mientras que la nanotecnología se encarga del diseño, producción y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala.

Estos materiales nanométricos poseen propiedades físicas, químicas, electrónicas, mecánicas, magnéticas, térmicas, ópticas y biológicas a diferencia de otros materiales de mayor escala. Y esas propiedades dependen principalmente de sus características físico-químicas; el tamaño, forma, estructura cristalina o no, carga superficial, solubilidad, etc. (Gaillet & Rouanet, 2015)

Las nanopartículas pueden tener formas diferentes tales como esferas, barras, cubos, etc. Además las nanoestructuras pueden ser producidas como tubos, alambres o películas. Por las propiedades que poseen las nanopartículas han sido bastante estudiadas y los metales como el oro, plata, paladio y cobre han sido los más usados para la síntesis de coloides estables de nanopartículas que son útiles en diversas áreas.

Actualmente las NPs son incluidas en muchos procesos industriales e involucrados en la composición de diversos productos de uso diario (alimentos, bebidas, filtros solares, textiles, etc). Los nanomateriales se

encuentran en diferentes áreas como salud, electrónica, computadoras, embalajes, automóviles, químicos, energía y medio ambiente. Además de sus beneficios (propiedades antibióticas, antimicóticas y antivirales) (Wijnhoven, y otros, 2009)

Métodos de síntesis

Existen dos métodos de fabricación o de enfoque:

-top-down, "reducción del tamaño" "de arriba hacia abajo"

consiste en la división de sólidos grandes en porciones más pequeñas hasta la nanoescala. Entre los métodos más representativos se encuentran:

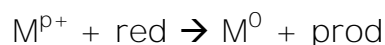
- 1) La evaporación térmica
- 2) El depósito químico en fase vapor (CDV)
- 3) Preparación de clusters gaseosos utilizando un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos, acarreados por un gas inerte y depositados en un óxido cristalino
- 4) Implantación de iones
- 5) Molienda

-bottom-up "auto ensamblado" "de abajo hacia arriba". Se parte de átomos hasta compuestos a escala molecular.

- 1) el método coloidal
- 2) reducción fotoquímica y radioquímica
- 3) irradiación con microondas
- 4) utilización de dendrímeros
- 5) método sol -gel. (Zanella, 2012)

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas mediante una gran variedad de métodos, sin embargo la reducción química ha sido de los métodos más utilizados.

La reacción de reducción que sigue es el siguiente:



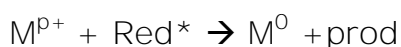
Una vez que se forma el átomo de metal, se da el proceso de crecimiento de nanopartículas que aún no se conoce a detalle. De acuerdo a cálculos teóricos sugiere que se forman agrupaciones oligoméricas (clusters) que con el tiempo se agregan para dar nanopartículas de carácter metálico.

Los reductores más empleados son borohidruro es el más poderoso, por lo que la reacción es necesario llevarla a cabo en frío y citrato de sodio es un reductor débil y necesita temperatura por tiempo prolongado para reducir al metal. Otros reductores usados son la hidracina, hidroxilamina o ácido fórmico. (Sánchez- Cortez, 2004)

Estos métodos tienen limitaciones ya que son costosos y/ o agresivos con el medio ambiente ya que requieren alta energía y presión.

Reducción fotoquímica

La reducción de Ag se puede inducir mediante irradiación luminosa de la disolución del ion metálico con la presencia del reductor químico, el cual es previamente activado con luz como la de un láser.



Síntesis verde de nanopartículas

Además de los métodos mencionados anteriormente por ser costosas y emplear sustancias peligrosas tales como disolvente orgánicos y agentes reductores tóxicos como borohidruro de sodio (NaBH_4) y N,N dimetilformamida. Por tanto la química verde debe incorporarse al desarrollo de procesos confiables y ecológicos como un aspecto importante en la nanotecnología (Bhattacharya & Gupta , 2005)

Recientemente se ha descubierto un método alternativo para la síntesis verde de nanopartículas metálicas utilizando fuentes biológicas. La producción biológica se está convirtiendo en un campo muy importante en la química, la biología y la ciencia de los materiales.

Los procedimientos biosintéticos implican organismos vivos como bacterias, hongos y plantas. Los extractos de plantas tienen como ventaja su disponibilidad, el manejo seguro, ya que es amigable con el medio ambiente, fácilmente ampliable para síntesis a gran escala y no hay necesidad de utilizar alta presión, energía, temperatura o productos químicos peligrosos. (Singh, Jain , Upadhyay, & Khandelwal, 2010)

La reducción biológica de metales se conoce desde principios del siglo XX, se ha mostrado que la síntesis de nanopartículas con productos naturales produce resultados similares a los métodos físicos o químicos. Sin embargo los productos de reducción no han sido estudiados completamente.

Se han tenido reportes de la biosíntesis de nanopartículas metálicas usando extractos de hojas de cilantro (*Coriandrum sativum*), Aloe vera, hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), mango (*Mangifera indica*), Rosa de China (*Hibiscus rosa-sinensis*), té verde (*Camellia sinensis*), hojas de neem y almidón.

Estudios han informado en muchas especies vegetales la presencia de metabolitos secundario como compuestos fenólicos que tienen diferentes estructuras antioxidantes (reductores) como flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, xantonas, antroquinonas, terpenoides. (Rai & Posten, 2013).

La preparación de coloides de plata por reducción química es un método universalmente utilizado para aplicaciones SERS. Por lo general se realiza mediante la reducción de los cationes Ag^+ proporcionado por el nitrato de plata. El catión se reduce por medio de un agente reductor. Las AgNPs tienen un tamaño variable dependiendo del método (generalmente entre 10 y 80 nm). Sin embargo se muestran algunas desventajas como la presencia de impurezas resultantes de las especies residuales de oxidación y los contraiones de las sales empleadas así como su pobre estabilidad en suspensión. (Cañamares, García Ramos, Gómez- Varga, Domingo , & Sanchez- Cortes, 2007).

Entre los diferentes métodos de síntesis verde para preparación de AgNPs, la ruta foto inducida utilizando el extracto de plantas o bacterias ha demostrado ser más rápido, económico y respetuoso con el medio ambiente donde la velocidad de síntesis aumenta con la luz visible y luz ultravioleta. Así la radiación solar es efectiva para la síntesis de nanopartículas de oro y plata. (Amaladhas, Usha, & Naveen, 2013) (Luchez, y otros, 2014)

En el caso de la síntesis de nanopartículas de plata y de oro el 5% del extracto de plantas es responsable del 100% de conversión de los respectivos iones. Por lo general, la concentración óptima que se utiliza para síntesis de nanopartículas es de 1mM de nitrato de plata. Sin embargo en un estudio la concentración de nitrato de plata 1.5- 1.8mM también resultó adecuada para la síntesis máxima de AgNPs ya que se

observó un incremento de la concentración de nanopartículas con poca diferencia de absorbancia del plasmón superficial (Birla, Gaikwad, Gade, & Rai, 2013)

Se han propuesto mecanismos para la síntesis de nanopartículas considerando la presencia de flavonoides:

El primer paso consiste en la foto-activación de la molécula presente en cada extracto. En cuanto se expone a la luz la molécula absorbe los fotones de energía y se excita. El segundo paso involucra la donación de electrones por eliminación del grupo $-OH$ de las moléculas excitadas para la reducción de Ag^+ a Ag^0 .

La tercera etapa implica la nucleación de los átomos Ag^0 para formar nanoclusters y la cuarta etapa implica el crecimiento simultáneo de nanopartículas en la que; los nanoclusters nuclearon para formar nanopartículas. (Kumar, y otros, 2016)

Capítulo 3. Espectroscopia

Raman

Espectroscopia Raman

Lo que llamamos hoy dispersión Raman es un efecto descubierto por Chandrasekhara Venkata Raman en 1928 en India. El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática sobre una muestra y examinar la luz dispersada por dicha muestra. Tal interacción induce oscilaciones periódicas en los electrones del compuesto; por lo tanto produce momentos eléctricos oscilantes. Existen dos tipos de dispersión:

- Dispersión Elástica: la luz incidente mantiene la misma frecuencia (longitud de onda) que la luz dispersada y se conoce como dispersión Rayleigh.
- Dispersión inelástica: hay cambio en la frecuencia de la luz incidente y la dispersada, se conoce como dispersión Raman. Por lo tanto existen dos tipos:
 - dispersión Raman Stokes en que la luz dispersada tiene menor energía que la luz incidente (la que tiene menor frecuencia) y
 - dispersión Raman anti-Stokes donde la luz dispersada tiene mayor energía que la luz incidente, es decir mayor frecuencia.

La dispersión Rayleigh es la más común y los objetos se pueden ver debido a este efecto. La dispersión Raman es menos común en la vida diaria; sin embargo es de gran importancia para quien este interesado en los estados vibracionales y rotacionales de la moléculas.

En el proceso Raman intervienen dos fotones de diferentes energías. Esta diferencia de energía es debida a un cambio de estado rotacional o vibracional de la molécula, causado por la interacción con los fotones.

La intensidad de la luz dispersada depende de los siguientes factores:

1. El tamaño de la partícula o molécula
2. La posición de observación
3. La frecuencia de la luz incidente
4. La intensidad de la luz incidente

Dispersión Raman

El efecto de dispersión Raman surge a partir de la interacción de la luz incidente con los electrones de una molécula iluminada. Para que una molécula exhiba el efecto Raman, la luz incidente debe inducir un cambio en el momento dipolar o un cambio en la polarizabilidad molecular. La polarizabilidad es una medida de la facilidad con la cual pueden distorsionarse las nubes de electrones que están alrededor de los átomos en la molécula.

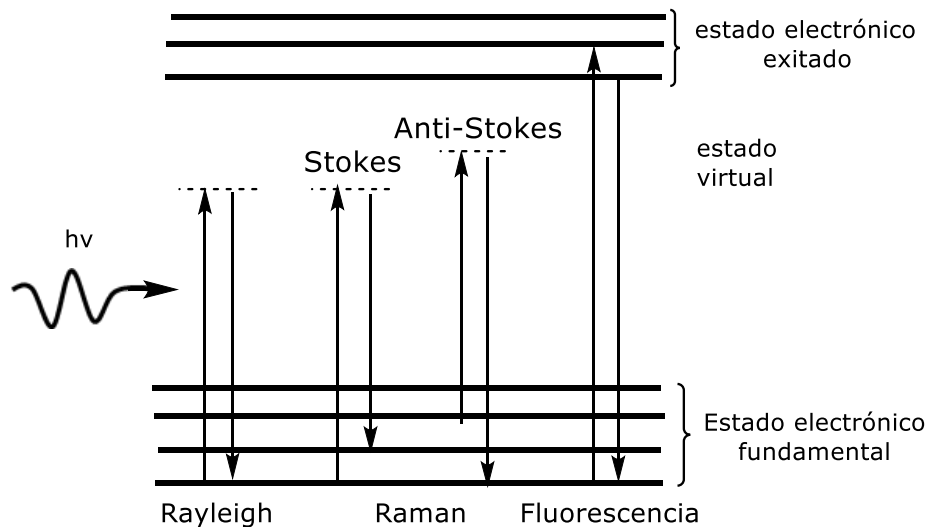


Figura 8. Diagrama energético de la dispersión de luz.

En la figura 8 se representan las formas de dispersión en un diagrama de energía donde cada estado de energía se representa por una línea horizontal, vemos en la dispersión Rayleigh no hay cambio en la energía de la luz incidente y la luz dispersada, en la dispersión Raman la molécula alcanza, momentáneamente un nivel de energía más alto (estado virtual), pero nunca llega a un estado electrónico excitado. Se produce el efecto Raman Stokes: cuando el fotón cede energía a la molécula, la energía de la luz dispersada es menor que la radiación incidente. Si la molécula se encontraba inicialmente en un estado rotacional o vibracional excitado, es posible que la luz dispersada tenga mayor energía que la incidente (efecto Raman anti-Stokes), siempre y cuando el sistema decaiga a un estado de menor energía que la del estado inicial. Como normalmente la población de los estados excitados es mucho menor que la del estado básico, la dispersión Raman Stokes es mucho más intensa que la dispersión anti-Stokes.

En ocasiones por la naturaleza química del material que se analiza se produce un problema como la fluorescencia que se puede presentar si al incidir un fotón sobre una molécula, este es absorbido y la molécula pasa a un estado electrónico excitado donde permanece unas decenas de nanosegundos, para saltar a otro estado excitado pero de menor energía, liberando un fotón de frecuencia más baja que el incidente. En el espectro Raman suele presentarse la fluorescencia como una curvatura de la línea base que puede llegar a enmascarar las bandas Raman

De esta forma, un Espectro Raman consiste en la representación gráfica de la radiación Raman (o intensidad, en unidades arbitrarias, (u.a)) en función del desplazamiento Raman (o número de onda, en cm^{-1}) relativo a la frecuencia de la luz incidente. (Pérez, Murillo, & Gómez)

Espectroscopia Raman intensificada por superficie

El efecto SERS (Surface-enhanced Raman Scattering) fue descubierto por Fleischmann y col. y representó un gran avance en los años setenta en el campo de la espectroscopia Raman ya que las señales Raman pueden aumentarse en seis o más ordenes de magnitud.

La amplificación de las señales en SERS viene a través de la interacción electromagnética de la luz con los metales, que produce grandes amplificaciones del campo laser a través de excitaciones conocidas como resonancia de plasmón. Para que esto ocurra las moléculas deben adsorberse típicamente en la superficie del metal o por lo menos estar muy cerca de ella (10 nm máximo), que provoca una disminución de la fluorescencia. (Le Ru & Etchegoin, 2009)

Las mejoras de SERS surgen de una respuesta resonante del sustrato, típicamente son fuertemente dependientes de la longitud de onda, es decir, varían con la longitud de onda de excitación. La mayoría de los sustratos SERS están diseñados para operar con excitación visible / infrarroja cercana (400 -1000 nm).

Una implementación exitosa de la técnica surge de:

- estructuras hechas de oro o plata; los dos metales más utilizados para SERS y plasmones en general. Por sus excelentes propiedades ópticas
- objetos (o estructuras) con dimensiones en el rango de longitud de onda menores de 100 nm. No existe un límite sobre qué tan pequeños deberían ser los objetos metálicos que constituyen un sustrato SERS.

Se han propuesto métodos diferentes para la preparación de sustratos metálicos nano-estructurados válidos para SERS, los coloides metálicos

se han convertido en las nanoestructuras más utilizadas para SERS. (Aroca , Alvarez-Puebla, Pieczonka, & Sanchez-Cortez, 2005)

La técnica SERS implica un aumento en la sensibilidad así como de la selectividad, lo que hace del Raman una técnica con diversas aplicaciones. Las señales de SERS producidos en la nanoestructura esta relacionados con el tamaño, forma, estado de agregación y tipo de nanoestructuras.

Una característica de este efecto es la dependencia de la intensidad observada con la naturaleza del metal empleado, su forma, la naturaleza de la molécula y un gran número de variables experimentales (concentración, longitud de onda de excitación, etc.) además la intensificación no es uniforme en todas las bandas del espectro Raman.

A continuación se mencionan algunas características importantes de las señales SERS (espectros e intensidades)

- Espectro SERS vs espectro Raman: la mayoría de las moléculas exhiben un espectro SERS que es muy similar a su espectro Raman normal (a la misma longitud de onda de excitación), y la mayoría de los picos Raman de huellas dactilares en particular son fácilmente identificable. Sin embargo, pueden surgir algunas diferencias menores, y deben tenerse en cuenta porque a veces son indicadores de características importantes del proceso de SERS. Para empezar, el espectro de Raman en condiciones de SERS puede verse afectado por el hecho de que las resonancias de plasmón (que producen la mejora) son típicamente dependientes de la longitud de onda. Como consecuencia, las diferentes partes del espectro se pueden amplificar en diferentes cantidades, dependiendo de la dispersión de la resonancia subyacente que produce la mejora.

Incluso efectos más sutiles (y en general secundarios) pueden surgir a partir de la orientación de la molécula en la superficie y la simetría específica del modo Raman. Ambos efectos pueden dar lugar a diferentes intensidades relativas de los picos Raman en condiciones de SERS. En casos más extremos, los modos Raman que son fácilmente visibles en la molécula desnuda pueden desaparecer al interactuar con la superficie. De la misma manera, otros modos se pueden "activar" e incluso pueden surgir nuevos modos. Las intensidades Raman intrínsecas (secciones transversales) también se pueden modificar con la adsorción. (Le Ru & Etchegoin, 2009)

- efectos de polarización: las señales SERS también pueden diferir de las señales de Raman en sus propiedades de polarización. Esto es el resultado de la dependencia de la polarización de las resonancias de plasmones.

- Fluctuaciones de señal: las señales SERS también pueden mostrar fluctuaciones bruscas de intensidad que no están presentes en las condiciones Raman convencionales. Estos pueden estar vinculados a cambios en las configuraciones de sustrato SERS (por ejemplo movimiento browniano de los coloides), fotoblanqueo o condiciones de sensibilidad de la molécula.

Instrumentación en espectroscopia Raman

El desarrollo de la espectroscopia Raman ha sido posible gracias a los progresos realizados en la instrumentación. C. V. Raman hizo mediciones con herramientas ópticas muy rudimentarias y en sustancias altamente concentradas pero fue capaz de ver el efecto a simple vista. Muchas aplicaciones se retrasaron hasta que el descubrimiento del láser junto con el desarrollo de sistemas de detección más eficientes mejoró sustancialmente la sensibilidad y el alcance de la espectroscopia Raman. Implementaciones modernas han reemplazado la luz solar por láser (con las ventajas no solo de intensidades, sino también de monocromía, dos características extremadamente importantes para la detección de señales Raman) y sofisticados sistemas de detección con combinaciones de filtros, monocromadores de alto rendimiento, fotomultiplicadores y / o dispositivos acoplados a carga multicanal (CCD) como detectores. (Le Ru & Etchegoin, 2009)

Un sistema de espectroscopia de Raman consiste típicamente en:

- Fuente de radiación (laser)
- Dispositivo colector, detector
- Espectrógrafo

Aplicación de nanopartículas

Las nanopartículas tienen propiedades biológicas que son importantes en productos de consumo, tecnología de alimentos (equipos de procesamiento, almacenamiento de alimentos), textiles (ropa antimicrobiana) y aplicaciones médicas (productos para el cuidado de heridas). Además de sus propiedades ópticas y físicas que no están

presentes en la plata con gran potencial para aplicaciones (por ejemplo, diagnóstico, suministro de fármacos y obtención de imágenes). (Wijnhoven, y otros, 2009)

Antimicrobiano

Las nanopartículas de plata muestran propiedades antimicrobianas eficaces, debido a su superficie extremadamente grande, lo que proporciona un mayor contacto con los microorganismos. Las AgNPs se unen a las proteínas de la membrana celular que contienen azufre así como también interactúan con compuestos que tienen fósforo como el ADN. Las NPs atacan la cadena respiratoria, lo que conduce finalmente a la muerte celular. (Rai, Yadav, & Gade, 2009)

Productos médicos

Las NPs se depositan, impregnan o recubren los dispositivos médicos o tejidos para controlar las infecciones. En la actualidad, las AgNPs se utilizan en el tratamiento de heridas, especialmente en dispositivos médicos para el tratamiento de quemaduras, heridas crónicas, úlceras asociadas con artritis reumatoide, úlceras diabéticas, úlceras venosas, etc. (Wijnhoven, y otros, 2009)

Alimentos

Los principales desarrollos hasta la fecha se han dirigido a la alteración de la textura de los componentes de los alimentos, encapsular los ingredientes o aditivos alimentarios, desarrollar nuevos sabores y sensaciones, controlar la liberación de sabores y/o aumentar la biodisponibilidad de los componentes nutricionales.

Para aplicaciones de envasado de alimentos, estos desarrollos han dado lugar a materiales con propiedades metálicas, de barrera y antimicrobianas. Estas aplicaciones se pueden clasificar en las siguientes categorías:

-Donde los ingredientes de los alimentos han sido formulados para formar nanoestructuras.

-Donde se han incorporado nanomateriales para desarrollar materiales **mejorados, "activos" o "inteligentes" para envasado.**

-Donde se han utilizado dispositivos y materiales basados en nanotecnología por ejemplo para nano filtración, tratamiento de agua, nanosensores para seguridad alimentaria y trazabilidad. (Chaudhry, Scotter , Blackburn, & Ross , 2008)

Aplicación del efecto SERS

El aumento en la intensidad Raman proporcionada por SERS puede simplemente aumentar la sensibilidad o el límite de detección de la técnica. Esto podría mejorar las aplicaciones Raman existentes, e incluso permitir su aplicación a sistemas que no podrían contemplarse con Raman convencional. Esto se emplea a la mayoría de las aplicaciones potenciales de SERS a la química analítica y la bioquímica, las ciencias forenses, etc. y en particular al análisis de trazas (detección, identificación y cuantificación) de medicamentos, drogas, explosivos o en concentraciones más altas como fluidos biológicos (por ejemplo detección o control de glucosa). Otro ejemplo es la detección e identificación de colorantes de obras de arte antiguas y manuscritos medievales utilizando SERS. (Le Ru & Etchegoin, 2009)

Capítulo 4. Técnicas de caracterización

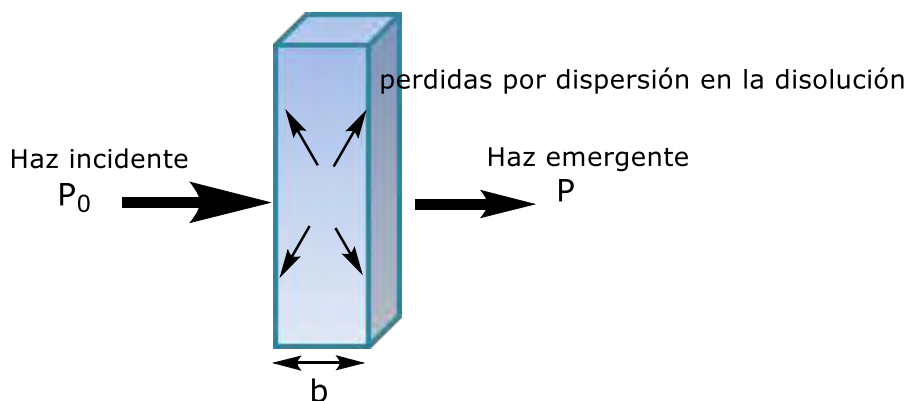
Espectroscopia de absorción UV-Visible

La espectrofotometría es una rama de la química analítica que permite identificar y cuantificar analitos mediante fenómenos de interacción de la luz con la materia. Al realizar esta interacción una fracción de la luz se refleja, una parte entra en el medio, se propaga y una última será transmitida.

Espectroscopia UV-Vis está basada en el proceso de absorción ultravioleta (180-380 nm) y visible (380-780 nm) en donde intervienen transiciones electrónicas del sistema en estudio, esto significa que cuando un sistema recibe energía de la luz incidente se excita hasta alcanzar un nivel electrónico de mayor energía. Se obtiene información del analito al medir la radiación electromagnética emitida conforme regresa al estado fundamental o al cuantificar la radiación electromagnética que absorbe como resultado de la excitación. Se mide la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda, que proporciona información cuantitativa y cualitativa sobre la muestra.

La ley de absorción, también llamada ley de Beer-Lambert cuando la luz atraviesa un medio que contiene un analito absorbente, disminuye su intensidad como consecuencia de la excitación del analito. Cuanto más largo sea el medio por el que pasa la luz (longitud del trayecto de la luz) en el caso de una solución del analito de concentración dada, existirán más moléculas o átomos absorbentes en el trayecto y por lo tanto mayor será la atenuación. Se requiere dos medidas de potencia: una

antes de que el haz haya pasado a través del medio que contiene el analito (P_0), y a otra después (P).



Se define por la ecuación

$$A = \log P_0/P$$

La transmitancia T de la solución es la fracción de radiación incidente que se transmite en la solución. Es frecuente que se exprese como porcentaje, denominado porcentaje de transmitancia.

$$T = P/P_0$$

La ley de Beer

La absorbancia es directamente proporcional a la longitud de trayecto b del medio de absorción y la concentración c de la especie absorbente.

$$A = \log \left(\frac{P_0}{P} \right) = abc$$

Donde a es una constante de proporcionalidad denominada absortividad. Con frecuencia para disoluciones b se da en centímetros y c en gramos por litro. Las unidades de absortividad en ese caso son $L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Cuando la concentración se expresa en moles por litro y la longitud de la cubeta en centímetros, la absorptividad se denomina absorptividad molar y se representa con el símbolo ϵ .

Un espectro de absorción es una gráfica de la absorbancia frente a la longitud de onda. El color de la solución se relaciona con su espectro de absorción.

Absorción de compuestos orgánicos

La absorción de radiación por moléculas orgánicas en la región de longitud de onda entre 180 y 780 nm resulta de la interacción de los fotones y electrones que están presentes en la formación de enlaces. La longitud de onda a la que absorbe una molécula orgánica depende de la fortaleza de los enlaces de sus electrones.

Los electrones de dobles y triples enlaces de moléculas orgánicas se sujetan con menos fuerza y, por tanto, se excitan con mayor facilidad. Los grupos funcionales orgánicos no saturados que absorben en la región ultravioleta o visible se llaman cromóforos. La intensidad del pico y posición puede servir como guía para identificación de la molécula. Ya que se ven afectados por el disolvente y otros detalles estructurales. (Skoog & Leary, 1994)

Análisis de betalaínas

Durante los primeros años de la elucidación de la estructura de las betalaínas el principal determinante de la naturaleza química fue el espectro de absorbancia. Todas las betalaínas exhiben máximos de absorción tanto en la región UV como visible debido a la naturaleza fenólica del ácido betalámico y los dienos conjugados de la subestructura 1,7 diazaheptametino.

Las betacianinas muestran dos máximos de absorción uno en el rango UV (270-280nm) debido al ciclo DOPA y una segunda en el intervalo visible (535-540 nm). Se encontró que la glucosilación en C₆ produce un mayor efecto batocrómico que la glucosilación C₅, mientras un segundo resto de azúcar unido al primero no afecta en gran medida el color. La acilación con ácidos hidroxicinámicos produce un tercer máximo de absorción aproximadamente a 300 – 330 nm. (Azeredo, 2009)

Espectroscopia de Absorción infrarroja

La espectroscopia infrarroja, también conocida como FTIR (Fourier Transform Infra-red) o simplemente como IR. Estudia los fenómenos de interacción entre la radiación de origen infrarrojo y la materia. La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm⁻¹, que corresponden a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm. Este se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. La región más utilizada es la región del infrarrojo medio que se extiende entre aproximadamente 670 y 4000 cm⁻¹. En esta región, para los análisis cualitativos y cuantitativos, se emplean los espectros de absorción, reflexión y emisión.

Principales aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo medio.

Tipo de medida	Tipo de análisis	Tipo de muestras
Absorción	Cualitativa	Compuestos sólidos, líquidos o gaseosos puros.
	Cuantitativa	Mezclas complejas de gases , líquidos o sólidos
Reflectancia	Cualitativa	Compuestos sólidos o líquidos
Emisión	Cuantitativa	Muestras atmosféricas

Es una herramienta poderosa para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos, cada especie molecular tiene un espectro de absorción infrarroja característico. La radiación infrarroja carece de energía suficiente para causar transiciones electrónicas, si bien puede inducir transiciones de los estados vibratorio y rotacional relacionados con el estudio electrónico fundamental de la molécula.

Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Solo en estas circunstancias el campo eléctrico alterno de la radiación puede interaccionar con la molécula y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos.

Un espectro de absorción infrarroja incluso de compuestos relativamente sencillos, contiene un gran número de bandas bien definidas. Las bandas de absorción útiles para la identificación de grupos funcionales se localizan en la región de longitud de onda más corta del infrarrojo (entre 2.5 y 8.5 μm), donde las posiciones de los máximos de absorción se ven poco afectadas por la estructura de carbono a la que están unidos los grupos. (Skoog & Leary, 1994)

Tipos de vibraciones

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de una multitud de tipos de vibraciones y rotaciones diferentes alrededor de los enlaces en la molécula.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo

entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereó, de balanceo, de aleteo y de torsión. Los diferentes tipos de vibraciones se representan en la figura 9.

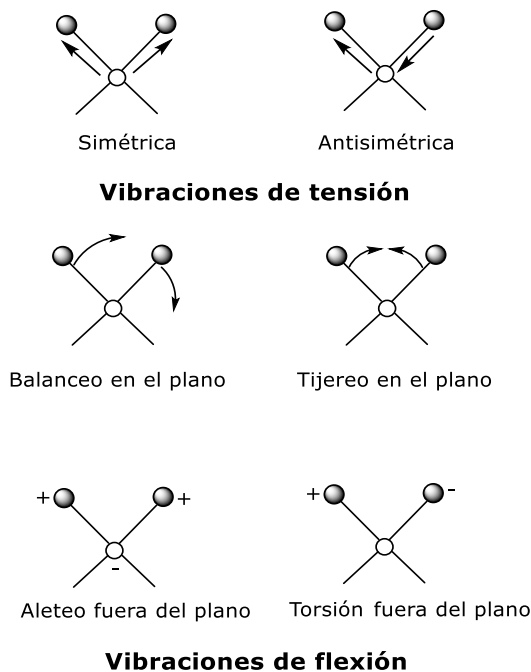


Figura 9. Tipos de vibraciones moleculares

La frecuencia aproximada (o el número de onda) a la que un grupo funcional absorbe radiación en el infrarrojo, se puede calcular a partir de las masas de los átomos y de la constante de fuerza del enlace entre ellos. Estas frecuencias denominadas frecuencias de grupo, rara vez permanecen invariables, debido a las interacciones con otras vibraciones asociadas a uno o a los átomos que forman el grupo. Los efectos de dichas interacciones suelen ser pequeños; como consecuencia de ello se puede asignar un intervalo de frecuencias dentro del cual es más probable encontrar el pico de absorción para un grupo funcional determinado. (Skoog , Holler , & Nieman, 1992)

Tabla 5. Frecuencias de grupos funcionales orgánicos comunes

Enlace	Intervalo de frecuencias cm^{-1}	Intensidad
ν O-H	3000 - 3650	Fuerte
ν N-H	3300 - 3500	Media
$\nu \equiv \text{C-H}$	3300	Fuerte
ν C-H	2800 - 3000	Fuerte
ν C=O	1680 - 1820	Fuerte
ν C=C	1500 - 1900	Muy débil
ν C=N	1610 - 1680	Medio
δ CH ₃ , δ CH ₂	1400 - 1470	Medio
ν CC aromáticos	1580 - 1600 1450 - 1500 1000	Medio- fuerte Medio- fuerte Débil
ν C-O-C asim	1150 - 1060	fuerte
ν C-O-C sim	970 - 800	0 - Débil

ν vibración de estiramiento , δ vibración de flexión. Fuente (Schrader, 1995)

Los espectros de las vibraciones normales infrarrojas y Raman dependen si la muestra está en estado líquido, gaseoso o cristalino. Sin embargo las características principales que se necesitan para identificar una molécula o elucidar su estructura son claramente visibles en los espectros de cualquier estado.

Los espectros de muestras en estado líquido están dados por moléculas que pueden tener cualquier orientación con respecto al haz del espectrómetro. Algunas bandas son amplias, ya que son la suma de espectros debido a diferentes complejos de moléculas que interactúan. (Schrader, 1995)

Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas

La caracterización de nanopartículas metálicas puede hacerse por métodos espectroscópicos (absorción electrónica en la región UV-Visible, Raman, FTIR) o microscópicos (HRTEM, SEM, AFM) y difracción de rayos X (XRD). A continuación se mencionarán los métodos utilizados en este trabajo para la caracterización de nanopartículas.

Espectroscopia de absorción UV-visible

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas de plata pueden ser investigadas con técnicas de espectroscopia UV-Visible ya que absorbe fuertemente en la región visible debido a la resonancia de plasmón superficial (SPR). Los plasmones de superficie son especialmente útiles puesto que su campo eléctrico oscilante amplifica mucho algunos fenómenos ópticos, como por ejemplo la dispersión Raman. (Cruz , Rodriguez, Lopez , & Creus, 2012)

Se conoce como plasmón de superficie localizado a las oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Para que esto ocurra, la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente. El campo eléctrico oscilante de la luz incidente desplaza una parte de los electrones deslocalizados por lo que induce un dipolo eléctrico en la partícula en una dirección lejos del resto de la partícula metálica, generando una carga neta negativa en un lado de la partícula. (Murray & Barnes , 2007).

Metales como Au, Ag, Cu y los metales alcalinos que poseen electrones libres muestran plasmón de resonancia en el espectro visible, dando colores no vistos en los mismos materiales a escala macrométrica. Por ejemplo, un pico de absorción alrededor de 420 nm es resultado de la resonancia de plasmón superficial de las nanopartículas de plata

esféricas y el tamaño de partícula es aproximadamente de 20nm. (Kappor , 1998).

En el rango de 520-530 nm se tiene la banda de plasmón para NPs de oro. En diversos estudios se encuentran una variedad de espectros SPR de NPs de plata en la región visible y las coloraciones de estos coloides van desde el amarillo al azul. (Martinez, Zuñiga, & Sanchez, 2013)

La interacción de la luz con partículas esféricas esta descrito por la teoría de Mie basada en la solución de las ecuaciones de Maxwell. Esta teoría predice que fracción de luz será absorbida y cual será dispersada. La suma de ambas fracciones es la extinción de la luz debido a partículas lo que da lugar al efecto de coloración en los coloides. (Cruz D.A, Rodriguez, Herrera, Orive, & Creus, 2012)

El desplazamiento de la banda SPR depende del tamaño de partícula, del entorno químico, de las especies adsorbidas en la superficie y de la constante dieléctrica. Una característica de las partículas sintetizadas es que un cambio en la absorbancia o la longitud de onda dan una medida del tamaño de las partículas, forma y propiedades entre partículas. (Sharma , Yngard, & Lin , 2009)

En los diversos estudios de síntesis verde de nanopartículas por foto-reducción con el transcurso del tiempo el color de la mezcla de reacción se hacía más oscuro y la intensidad de la banda SPR también, lo que indica el grado de avance de la reacción; mayor reducción de Ag^+ a Ag^0 con subsiguiente incremento en el número de partículas. Al monitorear la síntesis en el transcurso del tiempo usando espectroscopia UV-Vis ningún cambio en la intensidad de la banda SPR confirmó la finalización del proceso de síntesis (Kumar, y otros, 2016).

Durante el proceso de síntesis de AgNPs, también se observó un desplazamiento hacia el azul en bandas SPR con el transcurso del tiempo. Este cambio hacia el azul indicó que el tamaño de las AgNPs biosintetizados disminuyó a medida que aumentaba el tiempo de reacción.

Con el aumento del tamaño de partícula, las resonancias de plasmón superficial (SPR) se desplazan hacia longitudes de onda más largas (corrimiento al rojo). Un pequeño cambio hacia el azul o rojo en la longitud de onda del pico de absorbancia podría estar relacionado con la obtención de NPs en diferentes formas y tamaños. (Birla, Gaikwad, Gade, & Rai, 2013)

Como el color del coloide está relacionado con el tamaño de las NPs. Los colores más oscuros en la mezcla de reacción dan bandas SPR más amplias con desplazamiento hacia el **rojo en $\lambda_{m\acute{a}x}$** , indicaron la síntesis de nanopartículas más grandes. (Kumar, y otros, 2016)

Microscopia electrónica de transmisión

Los microscopios electrónicos son muy útiles porque permiten ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos. Esto se debe a que tienen mayor poder de resolución. El poder de resolución es una característica numérica o parámetro de un sistema óptico (de luz o de electrones) que define su capacidad de dar imagen de detalles muy pequeños del objeto.

El poder de resolución fue definido por Ernst Abbe, el siglo pasado como

$$R = K \frac{L}{n \text{ sen } \alpha}$$

Donde K es una constante que depende, en parte a características del objeto y que para el microscopio óptico es de 0.61; L es la longitud de

onda de la radiación iluminante con la que se forma la imagen; n representa al índice de refracción del medio situado entre el objeto y la lente objetiva, y α es el seno del ángulo que subtiende el radio de la lente objetiva con vértice en el objeto.

Para aumentar en forma importante la resolución, consiste en cambiar totalmente la radiación que se utiliza para formar la imagen por otra con mucha menor longitud de onda. El MET utiliza un haz de electrones acelerados, los electrones se aceleran empleando diferencias de potencial que varían generalmente entre 50 000 y 120 000 voltios.

Las principales partes del microscopio que lo constituyen son:

- A) **La óptica electrónica generalmente llamada "la columna" por ser** habitualmente cilíndrica y vertical. Está formada por el dispositivo productor de electrones o cañón electrónico seguido por una o más lentes condensadoras que concentran el haz electrónico sobre el objeto de estudio.
- B) El sistema de vacío que mantiene una presión muy baja en el interior de la columna.
- C) Sistemas de enfriamiento.
- D) Corrientes de alimentación y sus controles.
- E) Dispositivos de registro de la imagen.

(Vázquez & Echeverría, 2000)

Química computacional

La química computacional es una disciplina relativamente nueva, fue hasta inicios de 1960 cuando las computadoras ya estaban disponibles para la comunidad científica a partir de ahí la química teórica evolucionó al ámbito computacional de ahí el nombre de química computacional, que trata de resolver los problemas clásicos de la química teórica mediante el uso de un ordenador y un software.

La química computacional es una parte de la ciencia que comprende las áreas de química, biología y física además de la aplicación de las computadoras que permite el análisis de átomos, moléculas y macromoléculas. El objetivo principal de la química computacional es predecir todo tipo de propiedades moleculares de sistemas químicos utilizando la mecánica cuántica y la mecánica estadística así como la fisicoquímica, física molecular y la física cuántica.

Métodos computacionales

La clasificación de los métodos no es fácil, debido a la gran variedad de métodos existentes. La clasificación de los métodos matemáticos puede dividirse en dos grandes categorías:

- Mecánica molecular: se basa en el modelado matemático de una molécula compuesta por átomos que se mantienen unidos por enlaces. El método construye una expresión de la energía potencial que es la unión de las posiciones atómicas. La ventaja es la rapidez de los cálculos
- Mecánica cuántica: describe las moléculas en términos de interacciones explícitas entre núcleos y electrones, se basa en la ecuación de Schrödinger para describir una molécula y se subdivide de acuerdo al tratamiento realizado, métodos semiempíricos y

métodos ab initio (“desde el principio”). (Valles-Sanchez, Rosales-Marines , & Serrato-Villegas, 2014)

Métodos Ab initio estos métodos resuelven de modo aproximado la ecuación de Schrödinger para obtener la energía y la función de onda electrónicas del sistema de interés. El tipo más común de cálculo se denomina Hartree Fock (HF). En estos cálculos se emplean constantes fundamentales de la física como la carga y la masa del electrón, velocidad de la luz, constante de Planck, etc. Estos predicen con mayor exactitud desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo, pero el costo computacional aumenta.

Los **métodos semiempíricos** son métodos químico cuánticos, es decir obtienen la energía y orbitales moleculares, pero utilizan parámetros experimentales para simplificar el cálculo computacional. Estos resuelven de forma aproximada la ecuación de Schrödinger que depende de parámetros apropiados al tipo de sistema. Estos tienen un bajo costo computacional y proveen una descripción cualitativa, pero la exactitud en la predicción cuantitativa de la energía y las estructuras moleculares depende mucho de que tan buenos sean los conjuntos de parámetros, tamaño del sistema y tipo de átomos. (Diez & Vera)

Métodos de la Teoría del Funcional de Densidad (DFT)

Es el método más utilizado en la química computacional, no intenta calcular la función de onda molecular como los métodos anteriores sino que calcula la densidad de probabilidad electrónica molecular y la energía electrónica molecular a partir de ella. Es similar a los métodos ab-initio ya que requiere fuentes similares de cálculo y el costo computacional también es bastante cercano. (Suárez, 2012)

Existe un amplio número de métodos DFT, que están disponibles en los programas de cálculo esto se debe a que el funcional $E[\rho]$ incluye un componente denominado funcional de correlación-intercambio, $E_{xc}[\rho]$, por eso existen tantos funcionales DFT.

En primer lugar se tienen los funcionales de intercambio local y funcionales de correlación que solo involucran los valores de las densidad de spin electrón. En segundo lugar se tiene el funcional gradiente corregido, los cuales involucran los valores de las densidades de spin electrón y sus gradientes; los más conocidos son: Becke, el más popular propuesto por Lee, Yang y Parr (LYP). Por último se presentan una variedad de funcionales híbridos, los cuales se definen como una combinación lineal de términos de intercambio HF, local y gradiente-correcto. La mejor combinación conocida es la formulación de tres parámetros de Becke (conocidos en Gaussian como B3LYP y B3PW91)

Conjuntos base

Un conjunto de bases es un conjunto de funciones utilizadas para describir la forma de los orbitales en un átomo. Los orbitales moleculares y las funciones de onda completas se crean tomando combinaciones lineales de funciones de base y funciones angulares. La mayoría de los métodos semi-empíricos utilizan un conjunto de bases predefinidas. Cuando se realizan cálculos de teoría ab initio o de densidad funcional, se debe especificar un conjunto de bases. El tipo de cálculo realizado y el conjunto de bases escogidos son los dos factores más importantes para determinar la exactitud de los resultados.

Programas de cálculo

Gaussian es un conjunto de programas (paquetes) para química teórica al cual está integrado el programa Gauss View que ayuda a construir la molécula, Gaussian incluye los métodos de la mecánica molecular que puede realizar varios tipos de cálculos entre los cuales se encuentra la optimización de geometría, cálculo de frecuencias vibracionales, propiedades termodinámicas, análisis de población, etc. John Pople es denominado el padre de la química computacional, desarrolló el programa para efectuar cálculos ab initio llamado Gaussian 70. (Cuevas , 2005)

Gaussian 94 puede calcular energías y propiedades relacionadas para sistemas que contienen una docena de átomos pesados en pocos minutos, y puede manejar sistemas de algunos pocos cientos de átomos. (Diez & Vera)

En este programa están implementados los métodos siguientes

- **Mecánica molecular**

UFF, Dreiding, Amber

- **Mecánica cuántica**

Métodos semiempíricos

AM1

Métodos ab initio

HF, B3LYP, B3PW91, MP2, QCISD (quadratic, configuration interaction)

Clases de bases (basis set) Con los métodos anteriores se pueden usar las siguientes bases: STO-3G, 3-21G, 6-31G, 6-311G, cc-pvQZ,

LANL2DZ Y SDD. (Figüero-Nazuno, Rentería- Agualimpia, & Bustillo-Hernández, 2008)

El procedimiento general en la química computacional consta de 4 principales pasos:

- Diseño molecular se dibuja la molécula en estudio enlazando los átomos dando una molécula "inexacta" en su geometría.
- Elección del método de cálculo se ingresa en la computadora (DFT, HF, etc.) para determinar la geometría de la molécula y se realiza el cálculo químico-cuántico. El tiempo dependerá del tamaño de la molécula, método y la función base elegida.
- Resultados de cálculo se obtienen de una molécula con geometría correcta para la cual tiene una función de onda resuelta. Los valores se conocen como parámetros optimizados a la geometría en estado fundamental.
- Cálculo de propiedades electrónicas con los valores de la geometría optimizada. (Cjuno & Arroyo , 2003)

Optimización geométrica

La optimización de geometría se utiliza para localizar un mínimo de energía en la superficie de energía potencial y conseguir la conformación más estable de un sistema molecular. Depende de la primera derivada de la energía con respecto a las posiciones de los núcleos. Esto se debe realizar antes de hacer cualquier análisis o cálculo de la molécula.

Cálculos de frecuencia vibracionales

Son el resultado del movimiento interatómico en la molécula. Dependen de la segunda derivada de la energía con respecto a las posiciones de los núcleos, con ellos se puede predecir espectros moleculares de IR y Raman (frecuencias e intensidades).

Los mejores resultados son los métodos de la teoría funcional híbrida (DFT) con el ajuste de Lee-Yang-Parr para la correlación funcional (B3-LYP) y el intercambio de tres parámetros de Becke funcional con Perdew y la correlación funcional de Wang (B3-PW91), con conjuntos base de 631G. (Halls, Velkovski, & Schlegel, 2001)

Así la optimización de geometría y el cálculo de las frecuencias deben hacerse con el mismo método y misma base para que los resultados tengan validez.

Un trabajo de Halls ha demostrado que DFT predice frecuencias armónicas en excelente acuerdo con los fundamentos observados, teniendo factores de escala empírica cercanos a la unidad. Las frecuencias químicas calculadas son a escala, y los números de onda escaladas concuerdan mejor con los espectros observados. Se utiliza el mismo factor para todo el espectro, igual a 0.9614 para el método DFT (B3LYP). (Aroca R. , 2006)

Usos de la química computacional

El principal uso es poder comprender la química en sistemas de difícil estudio. Con esto se logra que las investigaciones tengan el respaldo matemático que lleva a poder explicarlo de forma más precisa.

Con el uso de la química computacional no se evita la parte práctica de la química, ya que la forma de comprobar que los modelos son adecuados o que las propiedades calculadas de manera teórica son cercanas a lo que sucede en realidad es con el trabajo de forma experimental. Cada técnica permite obtener resultados que no se pueden obtener por la otra. (Cuevas , 2005)

A través de la espectroscopia Raman e infrarroja se pueden determinar las estructuras moleculares para obtener esta información útil es

necesario determinar qué movimiento vibracional corresponde a cada pico en el espectro. Esta asignación puede ser bastante difícil debido al gran número de picos. Con la finalidad de facilitar esta asignación se utiliza la química computacional para calcular las frecuencias vibracionales de las moléculas.

Como regla general, los estiramientos de enlace son las vibraciones de energía más altas. Las curvas de enlace son vibraciones de energía algo más bajas y los movimientos de torsión son aún más bajos. Las frecuencias más bajas suelen ser torsiones entre partes sustanciales de moléculas grandes y modos respiratorios en moléculas muy grandes. (Young, 2001)

Capítulo 5. Materiales y métodos.

Materia prima

Las brácteas de bugambilia se recolectaron en el mes de septiembre en la zona de Ciudad Universitaria, Ciudad de México donde existe gran variedad de colores se utilizó el color morado, naranja, rojo y rosa considerando sus características visuales como el color uniforme y tamaños.

El betabel fue obtenido en un mercado fresco, firme con color característico homogéneo.

Reactivos

- Metanol CH₃OH marca Sigma Aldrich
- Agua desionizada Reactivos química Meyer
- Nitrato de plata AgNO₃, Sigma-Aldrich 209139-100G
- Ácido clorhídrico HCl marca Sigma Aldrich

Equipos de laboratorio

Balanza analítica Ohaus Discovery Modelo DV114C

Centrifuga Hermle Labortechnik Z36 HK

Lámpara luz blanca Philips 13.5 W, 6000 K

Medidor de pH y conductividad Hanna HI 991300

Espectrofotómetro UV-Vis-NIR. Modelo Varian CARY 5000 de doble haz de Rango Espectral 185-3300nm

Espectrómetro Infrarrojo, Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR

Microscopio confocal Raman acoplado a Microscopio de Fuerza Atómica Alpha 300 AR-WITec. Equipado con una fuente laser Nd:YVO4: 532nm de longitud de onda, con una potencia de 8mW

Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución Nanotech TEM JEOL JEM 2200FS+CS

Diagrama de flujo para la extracción de betalainas



Procedimiento experimental

Método de extracción.

Bugambilia. Se emplearon únicamente las brácteas se les retiro las hojas y las flores que se encuentran al centro. Se lavaron las brácteas con agua desionizada para eliminar la suciedad, se dejaron secar con corriente de aire para posteriormente pesar 3 gramos.

Betabel. Fue necesario lavar el betabel se removió la cáscara y fue cortado en rebanadas para poder pesar 3 gramos.

Se macero por 24 horas el tejido vegetal de bugambilia y betabel en una mezcla de agua con metanol (80:20) acidificado a un pH 5 con HCl,

posteriormente el extracto se centrifugó a 20 000 rpm por 10 minutos todo esto a temperatura ambiente.

La degradación de la betalaínas puede ocurrir por eso se trabajó a temperatura ambiente y las muestras protegidas de la luz cubriendo con papel aluminio.

Método de síntesis de nanopartículas

Se tomaron 10 mL de extracto diluido al 5% v/v en agua desionizada, en un vaso de precipitado y con agitación continua se agregó el nitrato de plata AgNO_3 concentración 10^{-4} M durante 10 minutos se mantuvo en agitación a temperatura ambiente (estas condiciones se mantienen constantes).

En dos viales se dejó en reposo la disolución de extracto con AgNO_3 donde interviene una variable: la exposición a luz blanca. En un vial se llevó a cabo la foto reducción durante 24 horas expuesto a luz blanca y el otro vial con la solución se dejó reposar en oscuridad cubierto con aluminio.

Métodos de caracterización espectroscópica.

Caracterización UV-vis



Se midieron absorbancias de los extractos diluidos adecuadamente con agua desionizada y los coloides de AgNPs sin dilución en el espectrofotómetro UV-VIS-NIR Cary 5000 utilizando celdas de cuarzo para medir en un intervalo de 200 a 800nm.

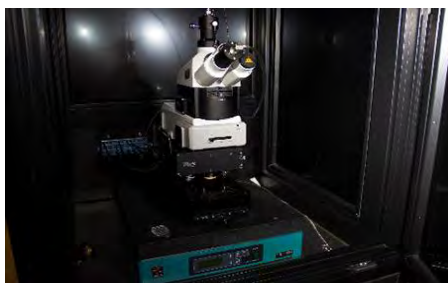
Infrarrojo

Se colocó el extracto líquido en la celda, se dejó reposar unos minutos a temperatura ambiente para evaporar el agua y dejar el residuo sólido en la celda. Las condiciones de operación del espectrofotómetro fueron las siguientes: 100 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} en un intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} .



Espectrómetro Infrarrojo,
Thermo Nicolet Nexus

Raman y efecto SERS



Microscopio acoplado a
espectroscopia Raman

En un portaobjetos se fijó papel aluminio limpio y sobre este se colocó una gota pequeña de la solución, se evaporó y el residuo sobre el aluminio se colocó en el microscopio Raman Witec. Se empleó un láser de longitud de onda de 532 nm .

Método del Análisis computacional

Se dibujaron las moléculas en el programa Gauss View 5.0.8 para después optimizar las estructuras moleculares de las betalainas usando el método DFT B3LYP/631G en el programa GAUSSIAN 09 las geometrías optimizadas resultantes se muestran en el anexo I. Posteriormente se realizó el cálculo de frecuencias Raman usando el mismo método ya mencionado, para que sean válidos los valores se escalan con el factor 0.9614 .

Capítulo 6. Resultados y análisis.

Primera etapa. Extracción y caracterización

A continuación se muestran los resultados de la primera etapa: la extracción y caracterización de betalainas. En la figura 10 se tienen imágenes de las brácteas de Bugambilia de diferentes colores que se utilizaron para la extracción; sin sus hojas y sin flores que se encuentran al centro.

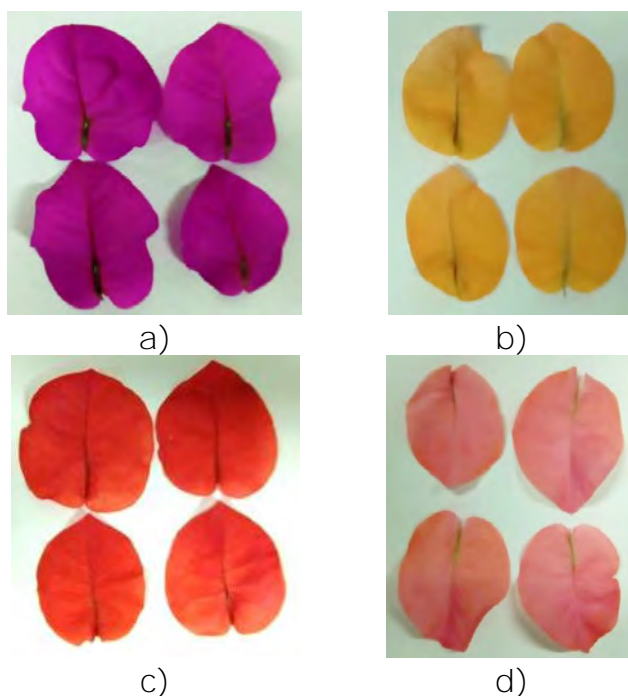


Figura 10. Brácteas de bugambilia de diferentes colores.

a) morado, b) naranja, c) rojo y d)rosa.

En las siguientes gráficas se muestran los espectros de absorción UV-vis de los extractos de diferentes colores de brácteas diluidos al 5% a pH 7, se observan los máximos de absorción característicos para brácteas moradas a 549 nm debido a las betacianinas y en brácteas naranjas se

observan 2 máximos de absorción en 462 y 476 nm debido a las betaxantinas.

Figura 11. Espectros de absorción UV-vis de betalaínas

Todos los colores de brácteas presentan un pico entre 265-272 nm debido al ciclo DOPA (CD) solo varia la intensidad en cada una. Aunque en literatura se ha reportado que la banda entre 260-268 también puede deberse a la presencia de proteínas o aminoácidos. (Cai, Sun, Wu, Huang, & Corke, 1998). La acilación con 4-cumaroil absorbe en 307 nm y se muestra un pico de absorción entre 309 - 311 nm. (Heuer, y otros, 1994)

En la figura 12 se muestran los espectros UV-vis de las brácteas rosas y rojas donde aparecen 2 picos de absorción en 479 y 536 nm, solo varían en su intensidad. Se puede concluir que estos dos colores poseen mayor cantidad de betaxantinas que de betacianinas y la amplia gama de colores en las brácteas se debe a esta proporción.

Figura 12. Espectros de absorción UV-vis de betalaínas

Posteriormente se decidió trabajar únicamente con brácteas naranjas, moradas y betabel. Se hizo una evaluación por espectroscopia UV-Vis de los extractos de brácteas al modificar su pH. Los resultados en brácteas moradas se muestran en la gráfica 1 donde se encontró que en el intervalo de pH 5 a 9 la banda de absorción en 549 nm no modifica la intensidad. La banda en 265-266 nm solo se ve modificada en su intensidad.

A pH 3 ocurre el desplazamiento de la banda hacia menor longitud de onda (-2nm) y disminuye su intensidad que de acuerdo a la literatura esto puede ocurrir debido a la isomerización sin que haya un cambio de color. Además desaparece la banda en 266 nm. A pH 11 la banda de absorción disminuye la intensidad y tiene un desplazamiento batocrómico a 552 nm y la aparición de bandas en 271, 293 y 349nm pueden ser debido a la hidrólisis.

Gráfica 1. Espectro UV-vis del extracto de brácteas moradas a diferentes pH.

En la Figura 13 se observa el color de los extractos al modificar el pH, desde pH 3 a 7 los extractos son similares de color púrpura, ya que a pH 3 al ocurrir una isomerización o deshidrogenación no hay cambio aparente en el color. A pH 9 se percibe un ligero cambio a púrpura más rojizo. Y a pH 11 ya hay cambio en la estructura de la molécula por hidrólisis y se puede ver el cambio a color violeta.

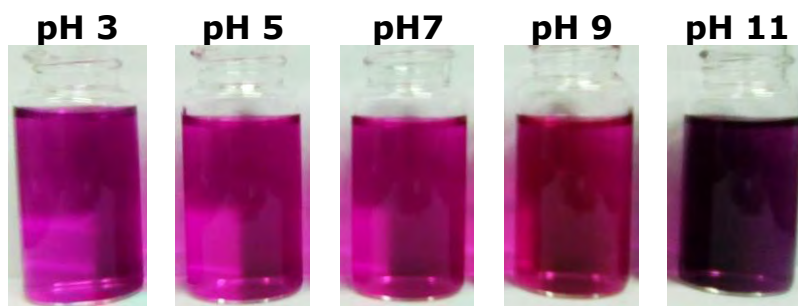


Figura 13. Color de los extractos de bugambilia morada al modificar el pH

La gráfica 2 muestra el extracto de brácteas color naranja con un máximo de absorción en 476 nm donde al disminuir el pH a 5 y 3 no hay modificación en su $\lambda_{\text{máx}}$, solo disminuye la intensidad de la banda entre 270-272 nm característico del CD. A pH 9 la banda se desplaza a 474 nm y a pH 11 desaparece la banda característica de betaxantina así mismo se observa la aparición de un hombro entre 360 y 370 puede ser debido a la hidrólisis en estas condiciones alcalinas.

Gráfica 2. Espectro UV-vis del extracto de brácteas naranjas a diferentes pH

A pH mayor a 7 ya hay una modificación en los máximos de absorción que se refleja en el cambio de color como se observa en la figura 14.

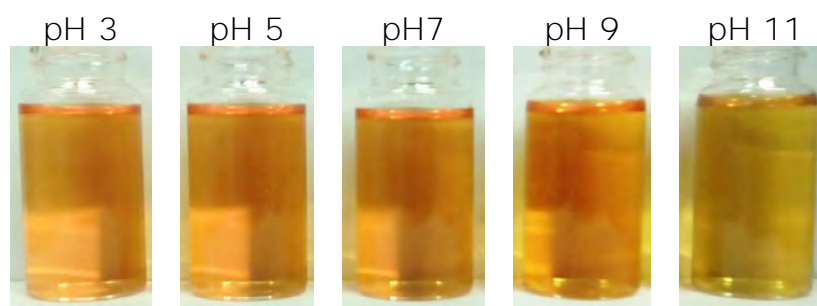


Figura 14. Cambio de color de los extractos de brácteas naranja al modificar el pH.

Segunda etapa. Síntesis verde de nanopartículas de plata

A continuación se muestran los resultados de la segunda etapa que consiste en la síntesis de NPs para lo cual se tienen 10 mL del extracto que esta diluido al 5% v/v, se agrega AgNO_3 a una concentración de 10^{-4} M y se deja en reposo dos viales por 24 horas. En los coloides expuestos en luz y en oscuridad fue positiva la reducción al observar cambio de color a los cuales posteriormente se midió la absorbancia UV-Vis en un rango de 200 a 700 nm donde se observan las bandas de resonancia de plasmón superficial (SPR). Y además se pudo confirmar la forma y tamaño de AgNPs con la posición de los plasmones junto con las imágenes TEM de los coloides.

Bugambilia morada

En la gráfica 3 podemos observar los espectros de absorción de los coloides de AgNPs sintetizados con betacianinas de brácteas moradas después de transcurridas 24 horas donde aparece una sola banda de plasmón característico para NPs esféricas, a 429 nm en el coloide expuesto a luz y en 449 nm en el coloide a oscuridad el plasmón desplazado a la derecha se puede atribuir a que hay mayor aglomeración de NPs. Además los plasmones anchos se atribuyen a que las NPs no tienen una distribución uniforme en cuanto a tamaño y forma. Además no hay modificación en el pico de absorción a 269 nm que nos podría indicar que el ciclo Dopa no interviene en la síntesis.

Gráfica 3. Espectros UV-vis de AgNPs obtenidas con extracto de brácteas moradas

En la figura 15 inciso a) se observa el extracto diluido al 5% v/v de color púrpura claro. Los colores en los coloides son muy similares, en el inciso b) coloide expuesto a oscuridad es ligeramente más oscuro que el c) esto se relaciona con su banda de plasmón desplazado hacia la derecha al tener mayor aglomeración de AgNPs.

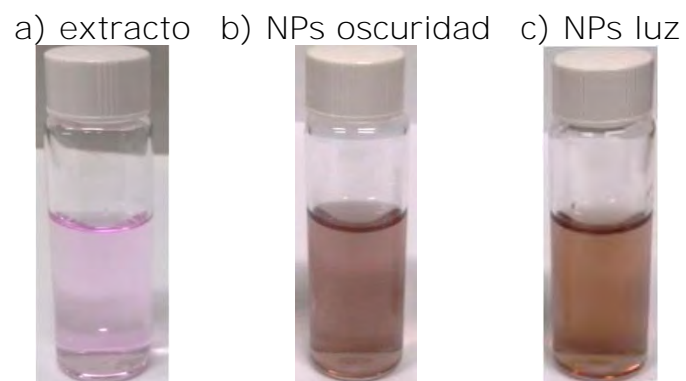


Figura 15. AgNPs sintetizadas con extracto de brácteas moradas.

TEM

En la figura 16 se muestran dos micrografías TEM donde se confirma que las AgNPs son de forma semiesférica y que el tamaño de partícula no se encuentra distribuido de forma homogénea ya que algunas tienden a ser un poco más grandes e irregulares. Se realizó medición de tamaño de las nanopartículas con un histograma de frecuencias donde el promedio de diámetro es de 20.10 nm con una desviación estándar \pm 10.5 nm.

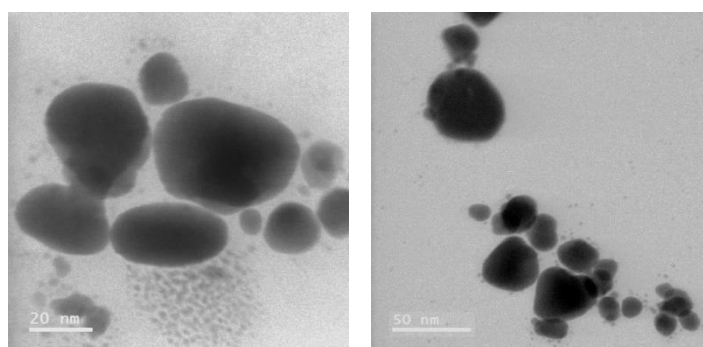


Figura 16. Micrografías TEM representativas de AgNPs.

En la figura 17 se observa el extracto de bugambilia morada al paso de 2 meses almacenado a temperatura ambiente y en oscuridad hay una pérdida de color debido a la degradación de las betalaínas.



Figura 17. Extracto de brácteas moradas a T_{amb} en el tiempo

Bugambilia Naranja

En la gráfica 4 se observan los espectros de absorción de los coloides de AgNPs sintetizadas por betaxantinas, presentes en brácteas naranjas después de 24 horas donde se tiene un solo plasmón típico de NPs esféricas. El plasmón de superficie del coloide en oscuridad apareció en 437 nm y en el coloide expuesto a luz en 434 nm. En este caso por los plasmones situados muy próximos se puede decir que la reducción no se ve afectada por la exposición a la luz, lo que cambia es el ancho de la banda en el coloide expuesto a luz que nos indica que la distribución de tamaños no es uniforme.

Gráfica 4. Espectros UV-vis de AgNPs obtenidas con extracto de brácteas naranjas.

En la figura 18 inciso a) se muestra el extracto diluido al 5% de color amarillo claro. En los coloides con NPs se observa el cambio de color el inciso b) expuesto a oscuridad es color naranja claro y expuesto a luz inciso c) muestra un color más oscuro que está relacionado con la banda de plasmón más ancha.

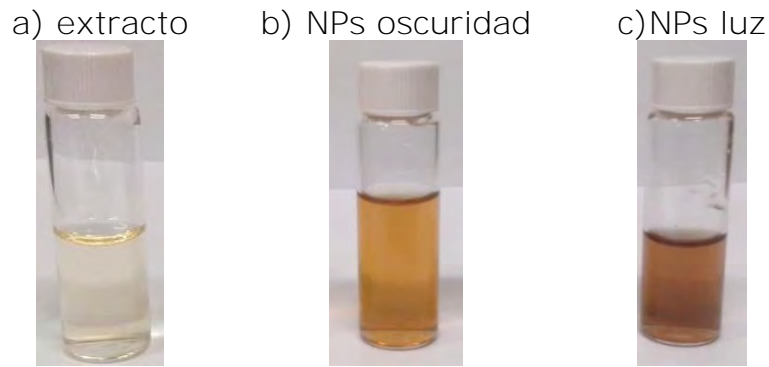


Figura 18. AgNPs sintetizadas con extracto de brácteas naranjas.

TEM

En la figura 19 se presentan dos micrografías donde se confirma que las AgNPs obtenidas son de forma semiesférica, se observa que la distribución no es completamente homogénea hay algunas NPs más grandes y al realizar el histograma de frecuencias el diámetro promedio es de 10.41 nm con desviación estándar $\pm 5.83\text{nm}$.

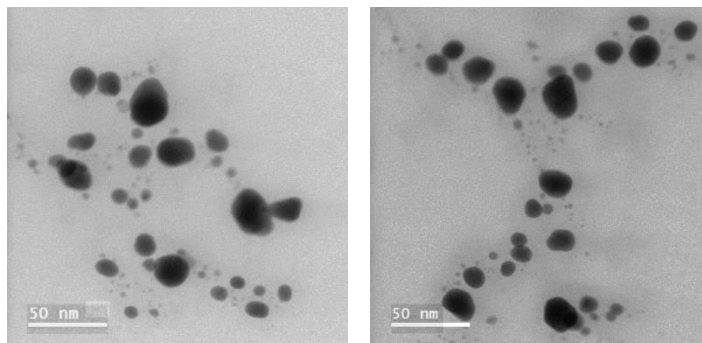


Figura 19. Micrografías TEM representativas de AgNPs.

En la siguiente imagen se observa la degradación de las betaxantinas presentes en el extracto de brácteas naranjas aunque se almacenó a temperatura ambiente y a oscuridad al paso de 2 meses ya hay una degradación muy avanzada perceptible por el color oscuro. Como se menciona en la literatura las betaxantinas son menos estables que betacianinas aun a temperatura ambiente sin presencia de luz.

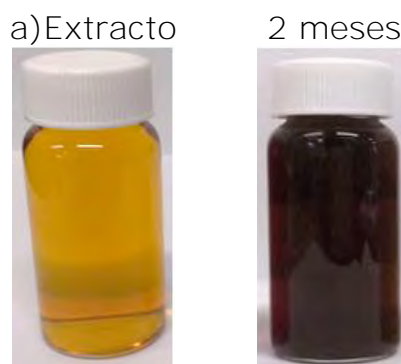


Figura 20. Extracto de brácteas naranjas a T_{amb} en el tiempo.

Betabel

En la gráfica 5 se observan los espectros de absorción en UV-Vis de los coloides de AgNPs sintetizados con extracto de betabel, después de 24 horas aparece una banda de plasmón característico para NPs esféricas a una longitud de onda de 417 nm en el coloide expuesto a luz y a 434 nm en oscuridad. La banda de plasmón es más intensa y ancha en el coloide expuesto a luz que indica incremento en el número de partículas y de mayor tamaño. Contrario a lo que ocurre en la reacción en oscuridad donde también se lleva a cabo la síntesis, se tiene una menor cantidad de partículas que pueden ser más pequeñas por lo que se observa menos intensa la banda de plasmón.

Gráfica 5. Espectros UV-vis de AgNPs obtenidas con extracto de betabel.

En la figura 21 inciso a) se muestra el extracto diluido al 5% de color rojo claro. En los coloides con NPs se observa el cambio de color el inciso b) expuesto a oscuridad es color naranja claro y el inciso c) expuesto a luz muestra un color más oscuro que está relacionado con la banda SPR más ancha e intensa que indica una mayor cantidad de NPs.

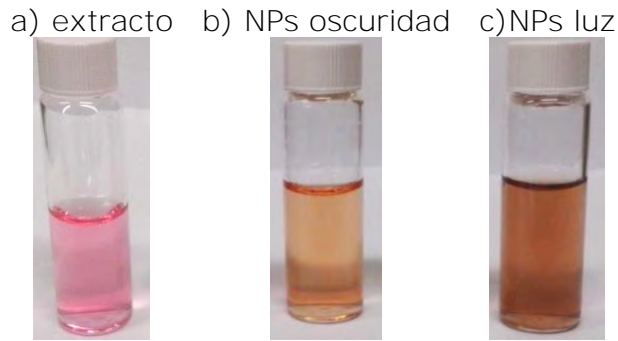


Figura 21. AgNPs sintetizadas con extracto de betabel

TEM En la figura 22 se presentan dos micrografías donde hay gran cantidad AgNPs y se confirma son de forma semiesférica. Al realizar las mediciones se tiene un tamaño promedio de diámetro 17.89 nm y desviación estándar de 7.56 nm.

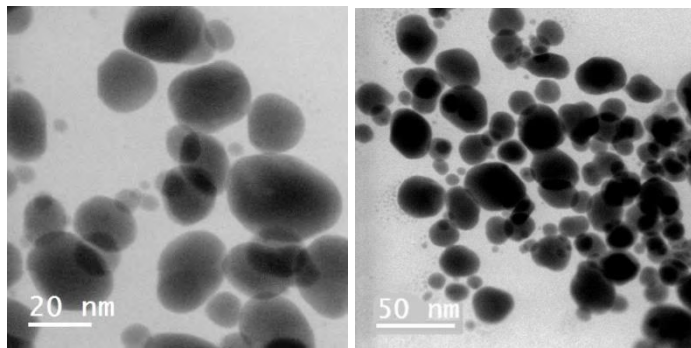


Figura 22. Micrografías representativas TEM de NPs.

En la figura 23 se observa cómo cambia el color del extracto de betabel en el tiempo, en el inciso a) el color característico rojo va cambiando a naranja al primer mes y color amarillo al segundo mes. Esto debido a la degradación de las betalaínas, estos cambios surgen aún a temperatura ambiente y oscuridad.

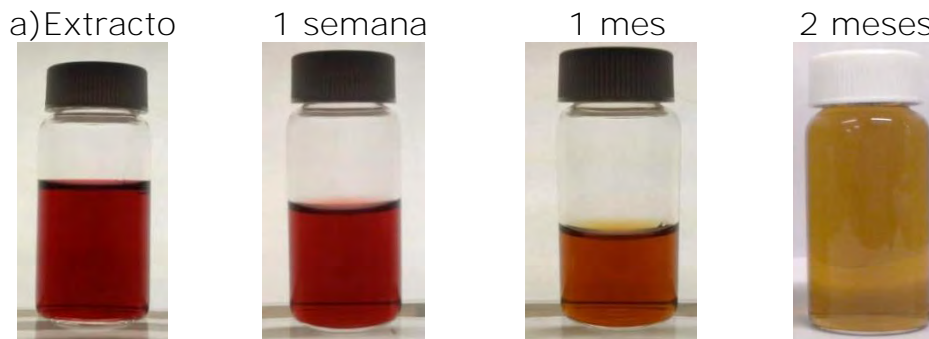


Figura 23. Extracto de betabel a T_{amb} en el tiempo

Tercera etapa. Caracterización vibracional de betalainas

A continuación se muestran los resultados de la tercera etapa que consistió primero en la identificación de las bandas de vibración de los extractos mediante espectroscopia infrarroja. Seguido se obtuvieron los espectros Raman donde se presentó un problema: la fluorescencia que ocurre debido a la absorción de la radiación pasando la molécula orgánica a un estado excitado y al relajarse emite radiación, esto nos dificulta el estudio del extracto por sí solo. En el tercer paso se obtuvieron espectros SERS de los coloides de AgNPs, estos espectros SERS se compararon con los espectros vibracionales teóricos obtenidos de los cálculos en Gaussian 09 por el método DFT B3LYP 631-G.

Brácteas moradas

Como se mencionó anteriormente en la literatura reporta que la molécula más abundante en brácteas moradas es: **6',6''-di-O-(E)-*p*-cumaroil-bougainvillein-v**.

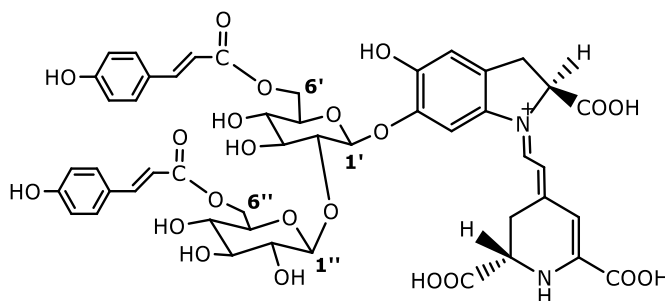


Figura 24. Molécula mayoritaria en brácteas moradas.

1. Espectroscopia infrarroja

En la gráfica 6 se tiene el espectro infrarrojo del extracto de brácteas moradas para identificar los principales grupos funcionales de la molécula que se aprecia en la figura 24. La banda ancha entre 3450 y 3100 cm^{-1} es debido a las vibraciones de estiramiento de grupo ν (N-H)

además de ν (OH). Las bandas en 2931 y 2887 cm^{-1} se atribuyen a la vibración de estiramiento ν (C-H).

La banda más intensa en 1728 cm^{-1} es debido a vibración de estiramiento del carbonilo ν (C=O). La banda entre 1644 y 1605 cm^{-1} son de gran intensidad aunque están traslapadas nos indica la presencia de enlaces tipo ν (C=N), ν (C=C) en el sistema conjugado diazaheptametino. La banda de gran intensidad en 1385 y 1356 cm^{-1} sugieren la presencia vibración de ν (C-N) y δ (O-H). La banda débil en 1254 cm^{-1} corresponde a vibraciones ν (C-N) y δ (O-H). El pico ancho de intensidad fuerte entre 1101 y 1057 cm^{-1} aparecen tres máximos que se atribuyen principalmente a flexión de δ (O-H), estiramiento ν (C-O) y estiramiento ν (C-C) de aromáticos.

Gráfica 6. Espectro infrarrojo del extracto de brácteas moradas.

2. Espectroscopia Raman

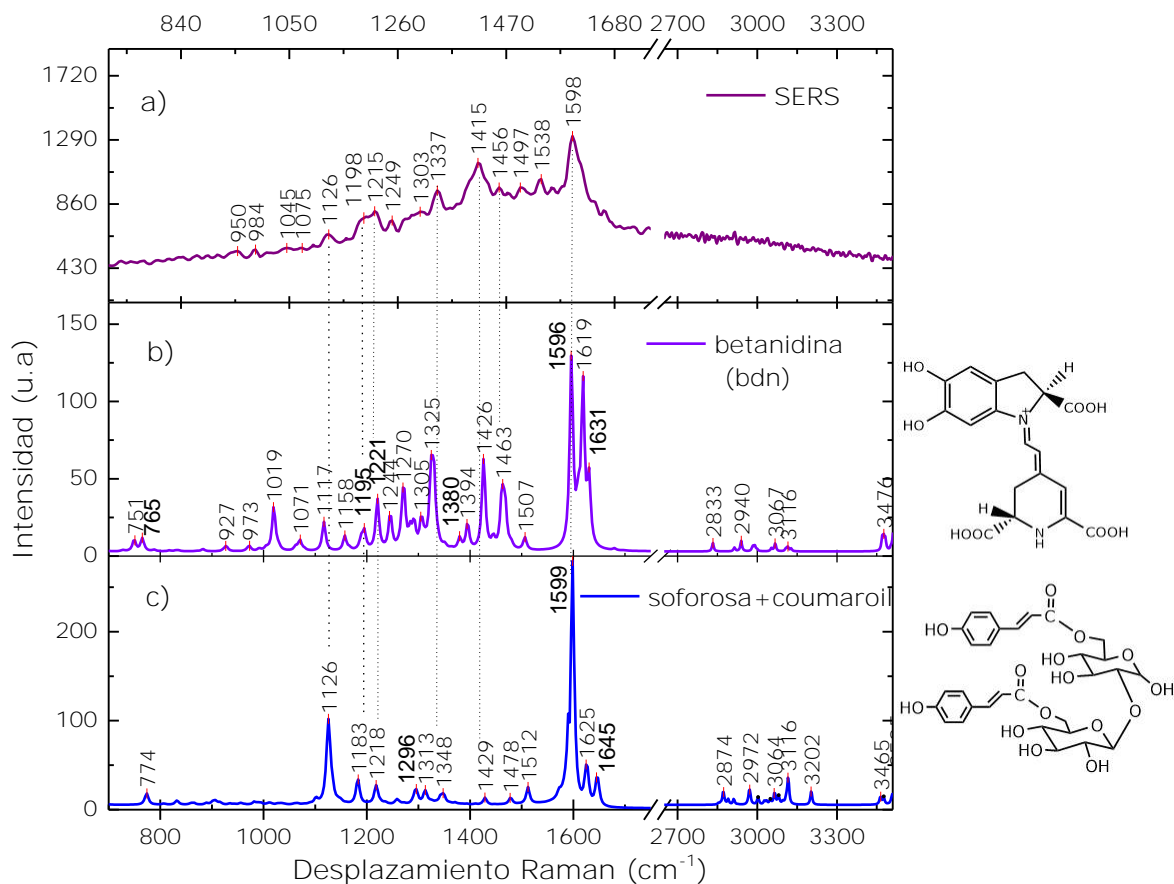
En la gráfica 7 se observa el espectro Raman experimental del extracto de brácteas moradas donde se aprecia únicamente fluorescencia debido a que las moléculas orgánicas absorben energía, esto nos dificulta ver la información del colorante analizado.

Gráfica 7. Espectro Raman del extracto de brácteas moradas.

3. Análisis computacional

Se presentó un problema en el modelado de la molécula ya que el tamaño es muy grande, por lo tanto no logramos obtener las frecuencias con el equipo de cómputo utilizado en laboratorio.

Sin embargo se decidió tomar como referencia dos moléculas que lo componen: betanidina (gráfica 8.b) y por otro lado los sustituyentes que es una soforosa unida con enlace éster a cumaroil (gráfica 8.c) para compararlo con el espectro SERS obtenido experimentalmente (gráfica 8.a) donde se observan varias bandas muy similares a las calculadas y como complemento tenemos los espectros IR.



Gráfica 8. Espectro experimental (a) y calculado (b, c) de vibraciones Raman.

Efecto SERS

A continuación se describen los tipos de vibración para las diferentes bandas que se muestran en la gráfica 8 del efecto SERS comparando con las vibraciones calculadas y de la bibliografía: la banda débil en 950 cm^{-1} se debe a ν (C-C) y flexión δ (CH) principalmente en anillo de ácido betalámico. Las bandas en 1045 y 1075 cm^{-1} se puede asignar a vibraciones de ν (C-O) y δ (OH) en ácidos carboxílicos. La banda en 1126 cm^{-1} de intensidad media es similar a 1117 cm^{-1} de betanidina (bdn) y 1126 cm^{-1} en coumaroil, se atribuye a vibraciones de δ (=CH), ν (C-O) en enlace éster y δ (OH) de fenol. Las bandas de intensidad media en SERS 1198 cm^{-1} y 1215 cm^{-1} se puede asignar a vibraciones δ (=CH) en aromáticos y δ (OH) en fenol; tienen señales similares en los

espectros calculados. Una banda débil en 1249 cm^{-1} similar a 1244 cm^{-1} se debe a δ (CH) en aromáticos y anillo de soforosa además flexiones de los δ (OH).

La banda en 1337 cm^{-1} de intensidad media es similar a 1325 cm^{-1} de bdn puede asignarse a flexión de δ (CH) de vinilos, δ (OH) en fenoles y carboxilos. La banda ancha en 1415 cm^{-1} de intensidad fuerte puede asignarse a vibraciones ν (C=C), δ (CH) de anillo piridina y δ (OH) en fenoles; no es visible en IR pero si en Raman. La banda en 1456 cm^{-1} de intensidad débil es similar a una banda en 1463 cm^{-1} de bdn, corresponde a estiramiento en enlaces ν (C-C) y ν (C-N) en anillos aromáticos. La banda en 1497 cm^{-1} de intensidad débil puede asignarse a vibración de ν (C-C), ν (C-N) en los anillos aromáticos, δ (NH) en AB y δ (OH) en los grupos fenol del CD. La banda ancha e intensa en 1598 cm^{-1} similar en 1596 cm^{-1} y 1599 cm^{-1} se puede asignar a vibración de estiramiento en ν (C=C) y ν (C=N) del conjugado diazaheptametino. Se atribuye que algunas bandas están desplazadas porque los grupos funcionales tienen interacción con el resto de la molécula y en el efecto SERS se debe considerar que se tiene una mezcla de moléculas que ya reaccionaron y están oxidadas junto con moléculas que aún no han reaccionado

En la tabla 6 se resume la asignación de bandas observadas en los espectros IR, Raman calculado y SERS experimental.

Tabla 6. Asignación de bandas de las señales características observadas en los espectros teóricos y experimentales

Experimental (cm ⁻¹)		Calculado DFT	Asignación de bandas
IR	SERS	Raman	
769 d	-	765 d	ν C-C + ν CO + δ OH
922 d	-	927 d bdn	δ CH + ν CC
1072 f	1075 d	1071 d bdn	δ OH + ν CO
-	1126 m	1126 f sof	δ =CH+ ν CO + δ OH
-	1198 m	1195 m bdn	δ = CH + δ OH
-	1215 m	1221 m bdn	δ =CH + δ OH
1254 d	1249 d	1244 m bdn	δ CH + ν C-N + δ OH
-	1337 m	1325 f bdn	δ OH + δ =CH
1356 f	-	1348 d sof	ν CC + ν CN + δ OH + δ CH
1385 f	-	1394 m bdn	ν C=N+ δ NH+ ν C-C
-	1415 f	1426 f bdn	ν C=C + δ CH
-	1456 d	1463 m bdn	ν C=C _{ar} + ν C-N
1516 m	1497 d	1507 d bdn 1512 d sof	δ NH+ ν C-N+ ν C=C _{ar} + δ OH
1605 f	1598 f	1596 f bdn	ν C=C+ ν C=N
-	-	1619 f bdn 1625 m sof	ν C=C _{ar} + ν C=N + δ OH ν C=C _{ar}
1644 f	1659 d	1631 m bdn	ν C=O + δ OH
		1645 m sof	ν C=C _{ar}
1726 m	1718 d	-	ν C=O

Intensidad de banda: (f) fuerte, (m) mediano, (d) débil; tipo de vibración: (ν) estiramiento, (δ) deformación, (ar) aromático. (Bdn) betanidina, soforosa+cumaroil (sof)

Brácteas naranjas

La molécula más abundante en brácteas naranjas es: dopaxantina (figura 25). Formada por ácido betalámico y L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina)

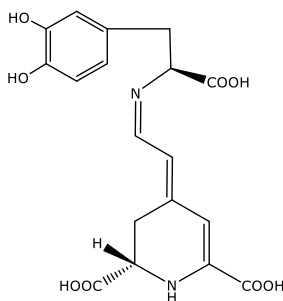


Figura 25. Molécula mayoritaria en brácteas naranjas.

1. Espectroscopia Infrarroja

En el espectro de infrarrojo del extracto de brácteas naranjas que se muestra en la gráfica 9 se puede deducir que la banda ancha en el intervalo de 3400 a 3100 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo ν (O-H) y grupos amino ν (N-H). El hombro que aparece en 2945 cm^{-1} indica el estiramiento ν (C-H). La frecuencia de estiramiento a 1726 cm^{-1} confirma la presencia del grupo carbonilo ν (C=O) en ácidos carboxílicos de la molécula. Una banda ancha con dos máximos en 1641 y 1603 cm^{-1} de gran intensidad indican la presencia de enlaces dobles ν (C=N) y ν (C=C) que se encuentran presentes en el sistema conjugado diazaheptametino. Una banda de menor intensidad en 1518 cm^{-1} es debido a vibraciones de estiramiento ν (C=C) y flexión δ (N-H). Las bandas que aparecen juntas en 1381 cm^{-1} y 1354 cm^{-1} sugieren la presencia de grupos ν (C-N) y δ (O-H) de aminas y ácidos carboxílicos. La banda en 1290 cm^{-1} y en 1203 cm^{-1} de intensidad débil se puede asignar a estiramiento ν (C-O) y ν (C-N). La banda ancha de gran intensidad con dos máximos de absorción entre

1101 y 1057 cm^{-1} se atribuye principalmente a estiramiento ν (C-C) en aromáticos, ν (C-O) en L-DOPA y ácidos carboxílicos.

Gráfica 9. Espectro infrarrojo del extracto de brácteas naranjas

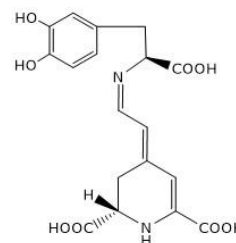
2. Espectroscopia Raman

En la gráfica 10 se observa el espectro Raman del extracto de brácteas naranjas, donde solo se tiene fluorescencia que nos dificulta ver la información del colorante analizado.

Gráfica 10. Espectro Raman del extracto de brácteas naranjas.

3. Análisis computacional

A continuación en la gráfica 11.b se observa el espectro Raman calculado por método DFT de la molécula Dopaxantina que fue usado como referencia para la asignación de bandas en el espectro SERS (11.a).



Gráfica 11. Espectro experimental SERS (a) y calculado de vibraciones Raman (b).

4. Efecto SERS

A continuación se describen los tipos de vibración para las diferentes bandas que se muestran en la gráfica 11 del efecto SERS comparado con las vibraciones calculadas y de la bibliografía: la banda en 693 cm^{-1} se asigna a flexiones de δ (OH) fuera del plano. La banda en 844 y 915 cm^{-1} se puede asignar a flexiones fuera de **plano** δ (C-H). Bandas débiles en 1122 y 1156 cm^{-1} son similares a señales de dopaxantina en 1126 , 1167 cm^{-1} que pueden asignarse a vibraciones de δ (=CH) y ν (C-N) en

la parte del AB. La banda en 1220 cm^{-1} de intensidad débil es similar a la banda 1219 cm^{-1} debido a vibraciones flexión de δ ($=\text{CH}$).

Las 2 bandas de intensidad media entre 1308 cm^{-1} y 1341 cm^{-1} similares a 1317 y 1345 cm^{-1} pueden asignarse a ν (C-O), δ (OH) de ácidos carboxílicos y ν (CN), δ (NH) en AB. La banda de intensidad fuerte en 1386 cm^{-1} puede asignarse al estiramiento ν (C=N) de imina. Una banda en 1448 cm^{-1} puede asignarse a vibración de ν (C=C) en el anillo L-DOPA y flexiones δ (OH) de este anillo.

Una banda de intensidad media en 1501 cm^{-1} similar a la banda 1493 débil corresponde a flexión δ (NH), tensión ν (C-N) en el ácido betalámico y tensión ν (C=C) en los anillos aromáticos. Bandas pequeñas entre 1574 cm^{-1} y 1619 cm^{-1} se asigna a tensión de estiramiento en los dobles enlaces ν (C=C), ν (C=N) y flexión δ (N-H) del conjugado 1,7-diazoheptametina.

En la tabla 7 se resume la asignación de bandas observadas en los espectros IR, Raman calculado y SERS experimentales.

Tabla 7. Asignación de bandas de las señales características observadas en el espectro teórico y experimental.

Experimental (cm ⁻¹)		Calculado DFT	
IR	SERS	Raman	Asignación de banda
-	844	858 d	δ CH
1072 f	-	1074 d	δ OH + ν CO
1099 m	-	1089 d	δ OH + ν CO + δ CH
-	1122 d	1126 d	ν CO + ν CN+ δ CH
-	1156 d	1167 d	ν CC + δ CH
1203 d	-	1204 m	δ =CH + ν CN
-	1220 d	1219 m	δ =CH
1290 d	1308 d	1285 d	δ CH + ν CO+ δ OH
1354	1341 d	1345 d	δ CH + δ OH + ν CN
1381 F	1386 m	1389 m	ν C=N + δ CH
1518 m	1501 m	1493 d	ν C-N + δ NH + ν CC _{ar}
-	1574 m	1565 f	ν C=C + ν C=N + δ NH
1603 f	1619 d	1614 f	ν C=C + ν C=N + δ OH
1637 f	-	1669 d	C=O + OH
1726 m	-	-	C=O

Intensidad de banda: (f) fuerte, (m) mediano, (d) débil; tipo de vibración: (ν) estiramiento, (δ) deformación.

Betabel

En la figura 26 se tienen las estructuras de las moléculas más abundantes en betabel: betanina y Vulgaxantina.

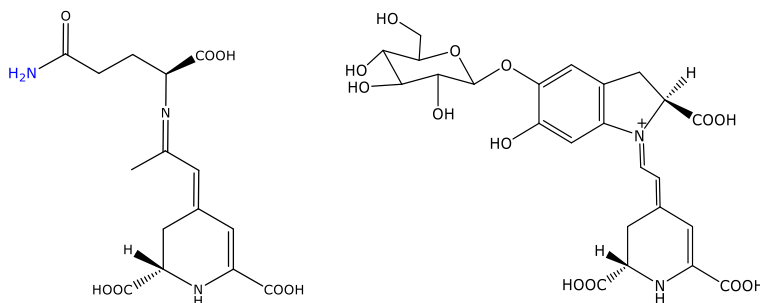


Figura 26. Moléculas mayoritarias en betabel

1. Espectroscopia Infrarrojo

En el espectro infrarrojo de la gráfica 12 se observa la asignación de bandas: en aproximadamente 3260 cm^{-1} y 2700 cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento ν (N-H) y del grupo ν (O-H).

Una banda intensa en 1637 cm^{-1} puede asignarse a vibraciones de estiramiento en los grupo carbonilo ν (C=O) e imino ν (C=N). Las bandas débiles entre 1456 y 1412 cm^{-1} se asigna a vibración de estiramiento ν (C-C), ν (C-N) de aromáticos y flexión δ (OH). La banda débil en 1340 cm^{-1} es debida a vibraciones de δ (OH) y ν (CN). La banda en 1269 cm^{-1} de intensidad débil puede asignarse a estiramiento de ν (C-N) de amina y ν (C-O). Las bandas anchas de intensidad media entre 1136 cm^{-1} y 1109 cm^{-1} indican vibración de ν (C-O), δ (NH) de amina primaria. La banda de intensidad fuerte en 1053 cm^{-1} y 995 cm^{-1} se debe principalmente a estiramiento ν (C-O), ν (C-N) y ν (C-C). La banda en 926 cm^{-1} corresponde a flexión de δ (CH) y δ (OH).

Gráfica 12. Espectro infrarrojo del extracto de betabel

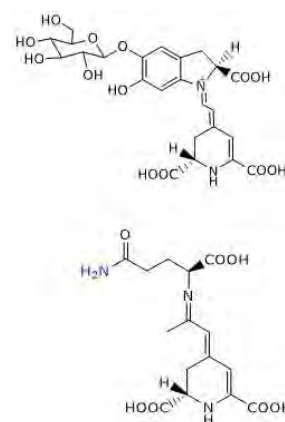
2. Espectroscopia Raman

A continuación se muestra el espectro Raman del extracto de betabel donde se obtiene únicamente fluorescencia sin presencia de bandas características del colorante.

Gráfica 13. Espectro Raman del extracto de betabel.

3. Análisis computacional.

En la gráfica 15.b se observa el espectro Raman calculado por método DFT de la molécula betanina y Vulgaxantina en 15.c que fueron usados como referencia para la asignación de bandas en el espectro SERS.



Gráfica 14. Espectro experimental SERS (a) y espectros calculados de vibraciones Raman (b, c).

1. Efecto SERS

A continuación se describen los tipos de vibración para las diferentes bandas que se muestran en la gráfica 14.a comparando con las vibraciones calculadas: las bandas en 621 cm^{-1} y 684 cm^{-1} se asigna a ν (C-C) y flexión fuera del plano de δ (OH). Bandas débiles en 774 cm^{-1} y 906 cm^{-1} corresponde a vibraciones δ (C-H) y δ (NH). Las bandas en 1122 cm^{-1} y 1198 cm^{-1} de intensidad media se pueden asignar principalmente a flexión de ν (CO), δ (=CH) y ν (CN) en la parte de

ácido betalámico. Las bandas en 1249 y 1278 cm^{-1} de intensidad débil son similares a 1247 y 1279 cm^{-1} de betanina (bn) que se asignan a vibraciones de ν (C-O), δ (OH) y δ (=CH) en anillo del ciclo DOPA.

La banda en 1328 cm^{-1} puede ser similar a la de 1345 cm^{-1} de betanina, es debido a ν (C-N) de amina y δ (OH) en glucosa y en ácidos carboxílicos. El pico en 1382 cm^{-1} es debido a estiramiento de imina ν (C=N). La banda en 1428 cm^{-1} que en los espectros calculados la señal es muy débil, sin embargo se le puede asignar a flexión de δ (O-H) y estiramiento en enlace ν (CC) y ν (CN) en aromático CD.

Las bandas débiles en 1481 cm^{-1} y 1501 cm^{-1} son similares a las bandas de gran intensidad en 1484 y 1507 cm^{-1} de betanina, pueden corresponder a estiramiento en ν (C=C), ν (C-N) en aromáticos y δ (NH) de ácido betalámico. Finalmente las bandas en 1554 y 1598 cm^{-1} se asignan a estiramientos de ν (C=C), ν (C=N) y flexión δ (NH) del conjugado diazaheptametino.

Tabla 8. Asignación de bandas de las señales características observadas en los espectros teóricos y experimentales.

Experimental (cm ⁻¹)		Calculado DFT	
IR	SERS	Raman	Asignación de banda
-	774 d	786 d bn	ν CC + ν C-N + δ CH
-	866 d	870 d bn	-
1053 f		1054 d vx	δ OH+ ν CO+ δ NH
1136 m	1122 m	1121 m bn 1126 d vx	δ =CH+ δ OH+ δ NH
-	1198 m	1184 d bn 1201 d vx	δ CH + δ OH δ CH + δ NH
-	1249 d	1247 m bn	ν CO + δ OH + δ CH
1269 d	1278 d	1279 m bn	δ =CH+ δ OH
1340 d	1328 f	1345 m bn 1345 d vx	δ OH + δ CH δ OH + δ CH + ν CN
-	1382 d	1382 m vx	ν C=N
1412 m	1428 f	-	δ NH + δ OH
1456 d	-	1446 d bn	δ OH + ν CC + ν CN
-	1481 d	1484 m bn	ν CC _{ar} + ν C-N + δ NH
-	1501 d	1507 f bn	δ NH + ν CC _{ar} + ν C-N
-	1554 m	1573 f vx	ν C=C + δ NH + ν C=N
-	1598 f	1594 d bn 1587 f vx	ν C=C+ ν C=N + δ NH
1637 f		1622 m vx 1643 m bn	ν C=C + ν C=N + δ NH ν C=O + δ OH

Intensidad de banda: (f) fuerte, (m) mediano, (d) débil; tipo de vibración: (ν) estiramiento, (δ) deformación. Molécula: (bn) betanina, (vx) vulgaxantina.

Conclusiones

En este trabajo se obtuvieron los extractos de betabel, brácteas de bugambilia morada, naranja de una manera sencilla, económica, didáctica y además cumple con los principios de la química verde.

Se caracterizaron los extractos mediante espectroscopia IR y UV-Vis. Se obtuvieron los espectros de absorbancia de betabel con máximos en 481 y 535 nm, los cuales son característicos de las moléculas de betaxantinas y betacianinas respectivamente; en las brácteas de bugambilia morada un máximo de absorción en 549 nm y en brácteas color naranja un máximo en 476 nm, indicando la presencia de betacianinas para el primero y betaxantinas para el segundo.

Se sintetizaron nanopartículas de plata en coloide con los extractos de betalaínas que pueden servir como agentes reductores. Este método se vuelve atractivo y alternativo porque es un proceso respetuoso con el ambiente sin la necesidad de usar reactivos químicos peligrosos.

Se observó que los tres extractos pueden generar nanopartículas de plata en ausencia de luz. Además estos extractos fueron evaluados con luz en 24 horas (método de fotoreducción) y se observaron ligeros cambios en los espectros de absorción por la generación de nanopartículas con forma esférica, de diversos tamaños entre los 10 y 20 nm.

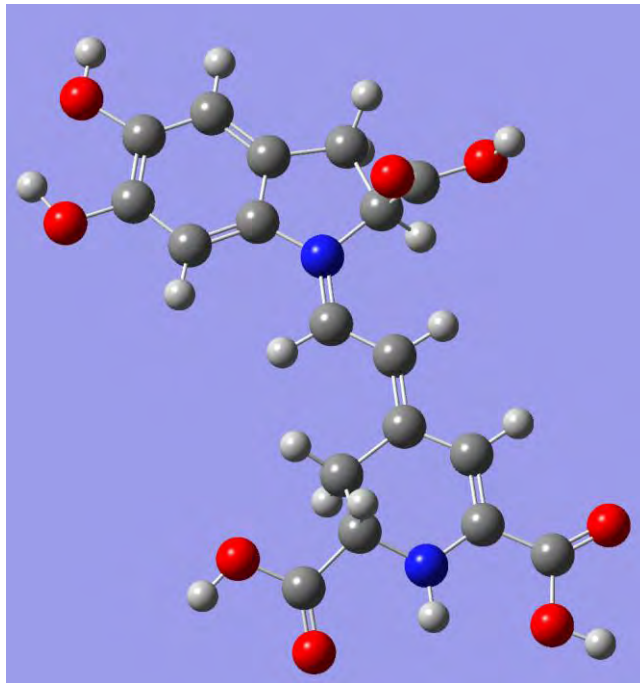
Se caracterizaron los coloides de nanopartículas obtenidos de betabel y brácteas de bugambilia mediante la técnica SERS, la cual es una variante de la espectroscopia Raman. Mediante el efecto SERS debido a la interacción metal-molécula es posible disminuir la señal de

fluorescencia; la cual es muy intensa en las moléculas orgánicas y dificulta obtener información.

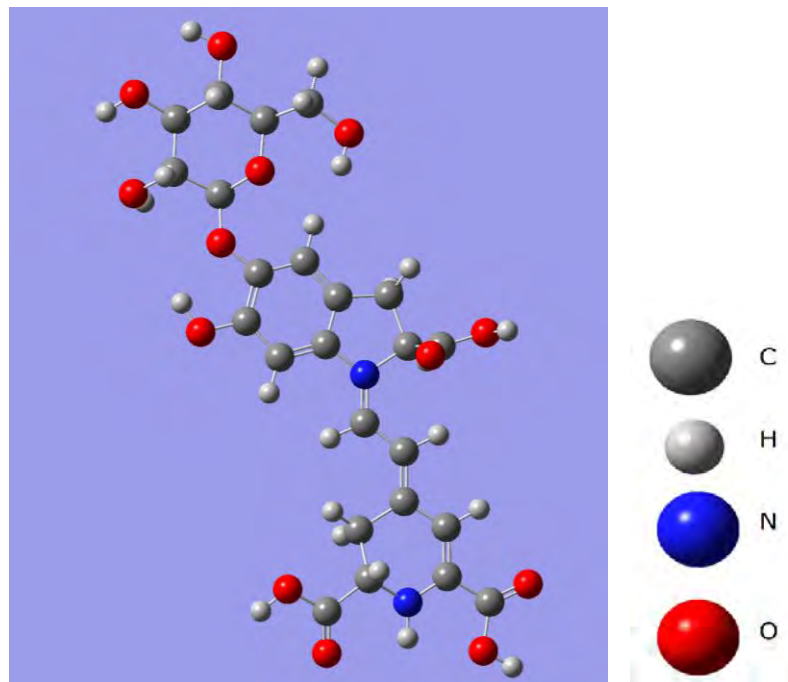
Se simularon, optimizaron y estudiaron diversas moléculas (betanidina, soforosa+cumaroil, dopaxantina, betanina, vulgaxantina) mediante el software Gaussian 09, por el método DFT y la base B3LYP. Los espectros experimentales tienen gran correspondencia con los espectros teóricos; así también fue posible la visualización e identificación de las vibraciones moleculares de los extractos estudiados.

En trabajos futuros se pueden realizar síntesis controladas para obtener morfologías definidas de nanopartículas metálicas. Se puede considerar que estas nanopartículas son obtenidas de forma ecológica y podrían ser usadas en diversas áreas; como en productos cosméticos, alimentos y farmacéuticos.

Anexo I

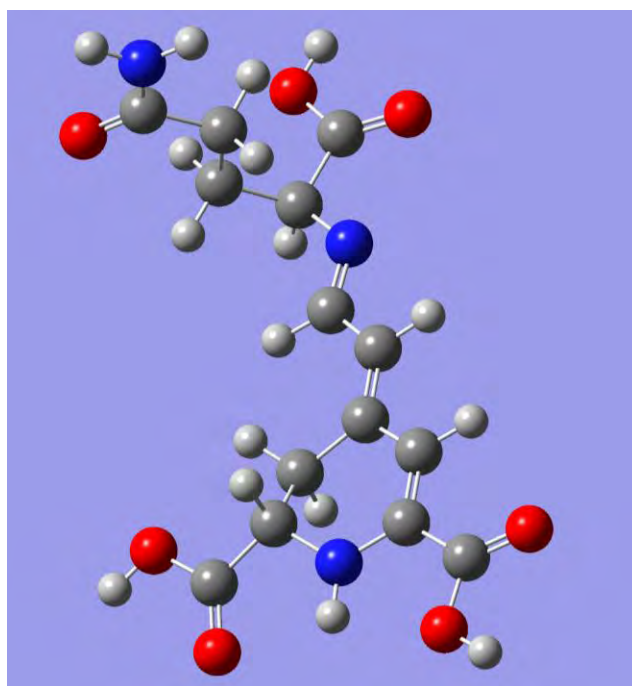


Betanidina

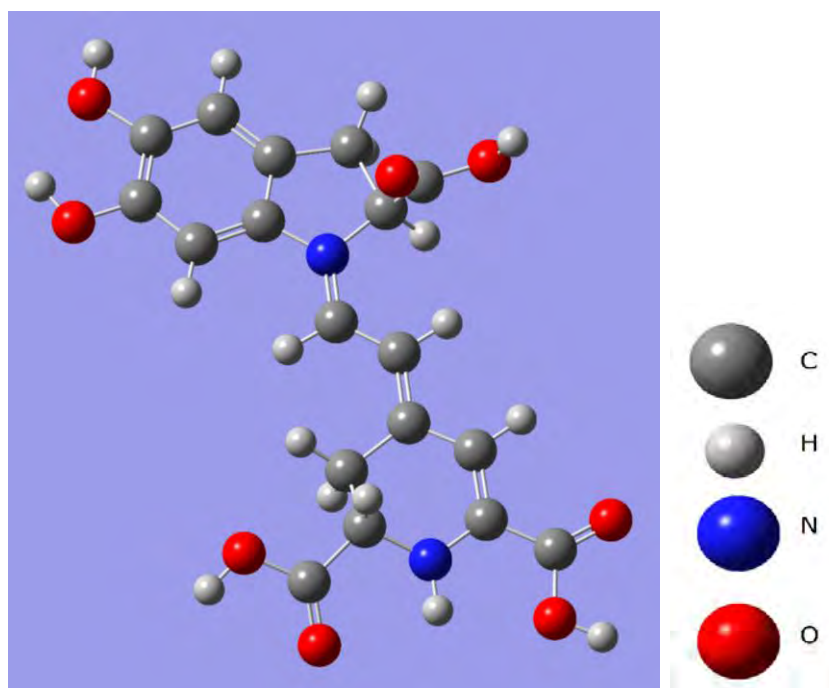


Betanina

betanidina-5-O-β-glucósido



Vulgaxantina I



Dopaxantina

Anexo II

Bandas características en IR y Raman de algunos grupos funcionales.

Aromáticos			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v =C-H	3105 - 3000	m	f
v -C=C-	1625 - 1590	V	m-f
	1590 - 1575	v	m
v C=C	1525 - 1470	v	d
	1470 - 1430	v	d
δ =CH	1290 - 900		

Piridinas			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v CH	3100 - 3010	m-f	m-f
C=C C=N en el plano	1615 - 1570	m-f	m-f
	1590 - 1575	m-f	m
	1520 - 1465	m-f	m
	1450 - 1410	m	m-d
	1000- 985	d-m	f

indoles			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
NH, CH y estiramiento en anillo	1630 - 1615	m	f-m
	1600 - 1575	m	f-m
	1565 - 1540	v	-
	1520 - 1470	m	-

Ácidos carboxílicos -COOH			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v OH	3300- 2500	d-m	d
v C=O	1710 - 1660	f	d-m
v CO y δ OH	1440 - 1395	d	d-m
v CO	1320 - 1210	m-f	d-f
δ OH fdp	960 - 875	m	m-d

Fenoles -OH			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v OH	3250 - 3000	v	d
δ OH	1410 - 1310	f	m-d
v CO y δ OH	1260 - 1180	f	m-d

Esteres R-CO-OR'			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v C=O	1730 - 1715	f	m
v C-O asim	1275 - 1185	f	m
v C-O sim	1160 - 1050	f	d

Amina secundaria aromática R-NH-R'			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v NH	3450 - 3400	m	d
δ NH	1580 - 1490	d-m	d
v C-N	1360 - 1250	f-m	m-d
v C-N	1280 - 1180	m	m-d
δ NH	750 - 700	f	d

Imina C=N			
Grupo funcional	región (cm-1)	Intensidad	
		IR	Raman
v NH	3400 - 3100	m	m
C=N	1690 - 1630	v	m-f
δ NH	1590 - 1500	m	d

Intensidad de banda: (f) fuerte, (m) mediano, (d) débil; tipo de vibración: (v) estiramiento, (δ) deformación

Fuente: (Socrates, 2001)

Bibliografía

- Amaladhas, P. T., Usha, M., & Naveen, S. (2013). Sunlight induced rapid synthesis and kinetics of silver nanoparticles using leaf extract of *Achyranthes aspera* L. and their antimicrobial applications. *Advanced Materials Letters*, 4(10), 779-785.
- An, J., Zhang, M., & Wang, S. (2008). Physical , chemical and microbiological changes in stores green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles- PVP. *Lebensmittel Wissenschaft und technologie*, 1100 1107.
- Aroca , R., Alvarez-Puebla, R., Pieczonka, N., & Sanchez-Cortez, S. (2005). Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 116, 45-61.
- Aroca, R. (2006). *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- Attoe, E., & von Elbe, J. (1981). Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *Journal of food science*, 46, 1934-1938.
- Azeredo, H. (2009). Betalains: properties,sources, applications, and stability-a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2365-2376.
- Badui , S. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta Edición ed.). México: Pearson Educación.
- Bhattacharya, D., & Gupta , R. (2005). Nanotechnology and potential of microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(4), 199-204.
- Bilik, A. (1981). Thin-Layer Chromatographic Separation of Beet Pigments. *Journal of Food Science* , 46, 298-299.
- Birla, S. S., Gaikwad, S. C., Gade, A. K., & Rai, M. K. (2013). Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions. *The ScientificWorld Journal*, 12.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *Journal og Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294.
- Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W., & Corke, H. (2001). Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem*, 49, 4429-4435.
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., & Corke, H. (1998). Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2063- 2070.

- Cañamares, M. V., García Ramos, J. V., Gómez-Varga, J. D., Domingo, C., & Sanchez-Cortes, S. (2007). Ag Nanoparticles Prepared by Laser Photoreduction as Substrates for in Situ Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis of Dyes. *Langmuir*, 23, 5210-5215.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., & Ross, B. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(3), 241-258.
- Cjuno, J., & Arroyo, J. (2003). La química teórica y la química cuántica computacional. *CSI boletín*, 48, 16-19.
- Clemente, A., & Desai, P. (2011). Evaluation of the haematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus tricolor* leaf extract in rat. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10, 595-602.
- Cohen, E., & Saguy, I. (1983). Effect of Water Activity and Moisture Content on the stability of beet powder pigments. *Journal of Food Science*, 48, 703-708.
- Cruz, D., Rodriguez, M., Lopez, J., & Creus, A. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- Cruz D.A, e. a., Rodriguez, M. C., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencia e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- Cuevas, G. (2005). Química computacional. *Ciencia*, 56(2), 33-43.
- Delgado Vargas, F., Jiménez, A., & Paredes Lopez, O. (2010). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 173- 289.
- Dhand, V. (2015). Green Synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science & Engineering C*, 8-9.
- Diez, M. E., & Vera, R. (s.f.). *CeCa/CULA*. Recuperado el 23 de 05 de 2017, de <http://www.cecalc.ula.ve/documentacion/tutoriales/gaussian/g94/node16.html>
- Enciso-Díaz, O., Méndez-Gutierrez, A., Hernández, L., & Sharma, A. (2012). Antibacterial Activity of *Bougainvillea glabra*, *Eucalyptus globulus*, *Gnaphalium attenuatum*, and Propolis Collected in Mexico. *Pharmacology & Pharmacy*, 3, 433-438.
- Escribano, J., Pedreño, M., & García-Carmona, F. (1998). Characterization of the Antiradical Activity of Betalains From *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9, 124-127.
- Fennema, O. (1995). *Química de alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.

- Figuro-Nazuno, J., Rentería- Agualimpia, W., & Bustillo-Hernández, C. (2008). *Química Computacional*. Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Computación.
- Gaillet, S., & Rouanet, J.-M. (2015). Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 58-63.
- García Carmona, F., Gandía Herrero , F., & Escribano, J. (2011). Flores fluorescentes. *Investigación y ciencia* , 51-57.
- Gengatharan, A., & Dykes, G. (2015). Betalains: Natural Plant Pigments with Potential Application in Functional Foods. *LWT - Food Science and Technology*, 4-8.
- Halls, M., Velkovski, J., & Schlegel, H. (2001). Harmonic frequency scaling factors for Hartree-Fock, S-VWN,B-LYP, B3-LYP, B3-PW91 and MP2 with the Sadlej pVTZ electric property basis set. *Theoretical Chemistry Account*, 105, 413-421.
- Har Bhajan Singh. (2014). *Handbook of natural dyes and pigments*. New Delhi: WOODHEAD PUBLISHING INDIA PVT LTD.
- Herbach, K., Stintzing, F., & Carle , R. (2004). Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet(*Beta vulgaris* L.) preparations. . *Journal of Food science*, 491 498.
- Herbch, K. M., Stintzing, F. C., & Carle , R. (2006). Betalain Stability and Degradation— Structural and Chromatic Aspects. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 43-44, 46.
- Heuer, S., Richter, S., Metzger, J. W., Wray, V., Nimtz, M., & Strack, D. (1994). Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry*, 37(3), 761-767.
- Huang, A., & Von Elbe, J. (1987). Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of food science*, 52(6), 1689-1693.
- Jackman, R., & Smith, J. (1996). Anthocyanins and betalains. En J. Houghton, & G. Hendry, *Natural Food Colorants* (págs. 280-295). Springer Science.
- JECFA. (16 de 07 de 2018). *www.fao.org*. Obtenido de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-052.pdf
- Kapadi, G., Azuine, M., Sridhar, R., & et al. (2003). Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacological Research*, 141-148.
- Kappor , S. (1998). Preparation, Characterization, and Surface Modification of Silver Particles. *Langmuir*, 14, 1021-1025.

- Khan, M., & Giridhar, P. (2015). Plant betalains: chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 267-295.
- Kugler, F., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MS. *Anal Bioanal Chem*, 387, 637-648.
- Kumar, S., Manoj, P., & Giridhar, P. (2015). Fruit extracts of *Basella rubra* that are rich in bioactives and betalains exhibit antioxidant activity and cytotoxicity against human cervical carcinoma cells. *Journal of Functional Foods*, 509-515.
- Kumar, S., Ritesh, S., Sharmila, G., & Muthukumar, C. (2013). Extraction optimization and characterization of water soluble red purple pigment from floral bracts of *Bougainvillea glabra*. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-2.
- Kumar, V., Kumar, R., Singh, D. K., Bano, D., Jagannadham, M. V., & Hadi, S. (2016). Photoinduced green synthesis of silver nanoparticles with highly effective antibacterial and hydrogen peroxide sensing properties. *Photochemistry and photobiology*, 1-49.
- Le Ru, E., & Etchegoin, P. (2009). *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy: and related plasmonic effects*. Amsterdam, Pays bas: Elsevier.
- Luchez, F., Tahri, Z., De Waele, V., Yordanov, I., Mintova, S., Moissete, A., . . . Poizat, O. (2014). Photoreduction of Ag by diethylaniline in colloidal zeolite nanocrystals. *Microporous and Mesoporous Materials*, 194, 183-189.
- Luo, C., Zhang, Y., & Zeng, X. (2005). The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of colloid and Interface Science*, 444-447.
- Martinez, F. M., Zuñiga, E. G., & Sanchez, A. (2013). Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *Mundo Nano*, 6(10), 101-108.
- McCreery, R. L. (2000). *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Columbus, Ohio: Wiley-Interscience.
- Murray, A., & Barnes, W. (2007). Plasmonic Materials. *Advanced Materials*, 19, 3771-3782.
- Pérez, J., Murillo, R., & Gómez, R. (s.f.). *Espectroscopías infrarroja y Raman*. Recuperado el 08 de 03 de 2017, de <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/EsRaman.pdf>
- Pimienta Barrios, E., Méndez Morán, L., Ramírez Hernández, B. C., García de Alba, K. E., & Domínguez Arias, R. M. (septiembre de 2008). Efecto de la ingestión del fruto de *Xoconostle* (*Opuntia joconostle* Web.) sobre la glucosa y lípidos séricos. *Agrociencia*, 42(6), 645-653.

- Pitahaya. *Pitaya y Pitahaya: ¿no son lo mismo, pero son igual?* Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Rai, M., & Posten, C. (2013). *Green Biosynthesis of Nanoparticles Mechanism and Applications*. Boston: CAB International.
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27, 76-83.
- Saguy, I., Kopelman, I., & Mizrahi, S. (1978). Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 26(2), 360-362.
- Sánchez- Cortez, S. (2004). SERS en coloides. *Óptica pura y aplicada*, 37(2), 33-42.
- Sani, H., Baharoom, A., Ahmad, M., & Ismail , I. (2009). Effectiveness of *Hylocereus polyrhizus* extract in decreasing serum lipids and liver MDA-TBAR level in hypercholesterolemic rats. *Sains Malaysiana*, 38, 271-279.
- Sapers, G., & Hornstein, J. (1979). Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science*, 44, 1245- 1248.
- Schrader, B. (1995). *Infrared and Raman Spectroscopy*. Weinheim: VCH.
- Schwartz , S., & von Elbe, J. (1983). Identification of betanin degradation products. *Z Lebensm Unters Forsch*, 176, 448-453.
- Sharma , V., Yngard, R., & Lin , Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 83-85.
- Simon, P., Drdák, M., & Cruz, R. (1993). Influence of water activity on the stability of betanin in various water/alcohol model systems. *Food Chemistry*, 46, 155-158.
- Singh, A., Jain , D., Upadhyay, M., & Khandelwal, N. (2010). GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING ARGEMONE MEXICANA LEAF EXTRACT AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(2), 483-489.
- Skoog , D., Holler , J., & Nieman, T. (1992). *Principios de análisis instrumental*. España: McGraw-Hill.
- Skoog, D., & Leary, J. (1994). *Analisis instrumental*. Madrid: McGraw Hill.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. West Sussex, Inglaterra: JOHN WILEY & SONS, LTD.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 19-38.

- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 19 - 38.
- Stintzing, F., & Carle, R. (2007). *N-heterocyclic pigments: Betalains*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press.
- Suárez, D. (2012). Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono. *Bol. Grupo Español Carbón*, 25, 23-28.
- Sundrarajan, M., & Gowri, S. (2011). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles by *Nyctanthes arbor-tristis* leaves extract. *Chalcogenide Letters*, 8(8), 447-451.
- Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., & Fazzari, M. (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1266-1270.
- Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., & Dornier, M. (2005). Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*, 60, 3-12.
- Valles-Sanchez, A., Rosales-Marines, L., & Serrato-Villegas, L. (2014). Métodos y Usos de la Química Computacional. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11), 16-21.
- Vázquez, G., & Echeverría, O. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. México D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- von Elbe, J. (1974). Color stability of betanin. *Journal of food science*, 334- 336.
- von Elbe, J., Maing, I., & Amundson, C. (1974). Color stability of betanin. *Journal of food science*, 39, 334-337.
- Wijnhoven, S., Peijnenburg, W., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H., . . . Gosens, I. (2009). Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2), 109-138.
- Wroblewska, M., Juskiewicz, J., & Wiczowski, W. (2011). Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 178-185.
- Wroblewska, M., Juskiewicz, J., & Wiczowski, W. (2011). Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 178.
- Wu, L.-C., Hsu, H.-W., Chen, Y.-c., Chiu, C.-C., Lin, Y.-I., & Ho, J.-a. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95(2), 319-327.

- www.metas.com.mx*. (julio de 2009). Recuperado el 26 de abril de 2017, de <http://www.metas.com.mx/guiametas/la-guia-metas-09-07-medicion-de-color.pdf>
- Young, D. (2001). *Computational Chemistry A Practical Guide for Applying Techniques to Real-Word Problems*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), 69-81.
- Zielinska-Przyjemska, M., Olejnik, A., & Dobrowolska-Zachwieja, A. (2009). In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. *Phytotherapy Research*, 23, 49-55.
- Zou, D.-m., Brewer, M., García, F., & et al. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 1-12.