



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando como agente reductor el extracto acuoso de las hojas de la especie *Marrubium vulgare L.*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

LUIS ÁNGEL FLORES LINARES

ASESORA: Q.F.B BRÍGIDA DEL CARMEN CAMACHO ENRÍQUEZ

COASESORA: DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO

COASESORA: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando como agente reductor el extracto acuoso de las hojas de la especie *Marrubium vulgare* L.

Que presenta el pasante: **Luis Ángel Flores Linares**

Con número de cuenta: **412065778** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Septiembre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano	
VOCAL	Dra. Yolanda Marina Vargas Rodríguez	
SECRETARIO	Q.F.B. Brígida de Carmen Camacho Enríquez	
1er. SUPLENTE	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
2do. SUPLENTE	Dr. Benjamín Velasco Bejarano	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

*A mis padres **Mónica y Roberto** por su apoyo, trabajo y sacrificio todos estos años. Que, con sus consejos, pláticas y experiencias me impulsaron a terminar este proyecto que es tanto de ustedes como mío. En todo este tiempo ha sido un privilegio ser su hijo, son los mejores padres. Los amo con todo mi ser.*

*A mis hermanos **Enrique y Brenda** por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida, este trabajo también es suyo. Los amo con todo mi corazón hermanos.*

*A **Karina** por llegar a mi vida en el momento justo y ser mi compañera, amiga, novia, como siempre te lo he dicho me faltan palabras para agradecerte por estar a mi lado durante mucho tiempo, estas líneas también te las dedico por tu apoyo, por no dejar que me rindiera y alentar a superarme cada día para culminar la experimentación y redacción de esta tesis, muchas gracias.*

*Le doy las gracias a la **Mtra. Brígida** y al **Mtro. Mario** por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación en Farmacognosia y Fitoquímica, lugar donde me compartieron parte de su experiencia y además por confiar en mí para lograr este gran paso en mi vida.*

***Alejandra Sánchez (Técnico académico)** por el apoyo en la preparación y obtención de la micrografía de las nanopartículas de plata obtenidas para este trabajo de investigación, a la **Dra. Ganem, Dra. Anita, Dra. Gaby** y al **Dr. Ángeles** por brindarme el apoyo para el empleo de sus equipos y lograr los resultados para este proyecto de tesis.*

*A mis colegas **Oscar, Many, Chuy, Andrea, Beto, Carlos, Uziel, Tavo, Adriana, Pedro, Ricardo, Mimi, Diana, Rafa, Eduardo, Oscar Cedillo, Misael, Daniel y Marisol** les doy las gracias por compartir grandes momentos a lo largo de la carrera, por permitirme conocerlos y por ser parte de su círculo de confianza, donde construimos día con día nuestra amistad.*

*También le agradezco mucho a **Alejandra (bondad), Lidia (maldad), Isaac, Mary Carmen, Miriam y Eli** por compartir un su conocimiento conmigo, por brindarme su amistad y quienes fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo de investigación y redacción de esta tesis.*

*A **Miriam López** y su mamá por el apoyo en la recolección de ejemplares de marrubio, a **Betty y Aranza** por ser grandes personas conmigo y brindarme su apoyo emocional y alentarme para terminar este proyecto de investigación. A **Tonanci** por tus consejos y brindarme apoyo para terminar la investigación y redacción de esta tesis.*

*Me gustaría agradecer en estas líneas a mis colegas **Christian, Danini, Maay, Adri, Zim, Yess y Ricardo** por compartir sus conocimientos en el ámbito laboral, por los grandes momentos, las risas, los enojos, etc. que pasamos juntos, por permitirme conocerlos y aprender de cada uno de ustedes, muchas gracias, amigos.*

*A **Wen, Ale, Cesar, Palmera, Beto, Celestino, Loa, Belvin, Julio, Adrián, Sandy, Mix, Luis y Miguel** por brindarme su apoyo durante mi estancia en Toluca y hacerme sentir como en familia, por los momentos divertidos que pase con ustedes y por compartir su conocimiento conmigo, muchas gracias.*

Muchas gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme las puertas y darme la oportunidad de estudiar una carrera la cual cambio mi vida y forma de ver el ambiente que me rodea. En cualquier lugar que éste pondré en alto el nombre de la institución.

Finalmente, gracias al apoyo del programa PAPIME PE204118 “Actualización y fortalecimiento de la enseñanza experimental de las asignaturas: Fitoquímica y Farmacognosia y Fitofármacos de la Licenciatura en Química Industrial” por el financiamiento de este proyecto de tesis.

CONTENIDO

CONTENIDO	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1. MEDICINA TRADICIONAL	2
2.1.1. <i>MARRUBIUM VULGARE L.</i> (MARRUBIO).....	3
2.2. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	5
2.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS	6
2.3.1. RESEÑA DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	6
2.3.2. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	7
2.3.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES DE SEGUNDO ORDEN.....	7
2.3.4. DISEÑOS BOX-BEHNKEN.....	7
2.4. RESEÑA HISTÓRICA DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	8
2.4.1. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	8
2.4.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	9
2.4.3. MÉTODOS FÍSICOS.....	9
2.4.4. MÉTODOS QUÍMICOS.....	10
2.4.5. MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	11
2.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	12
2.6.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	12
2.6.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	13
2.6.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	13
2.7. NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y APLICACIONES	14
2.8. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	16
2.8.1. VENTAJAS DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE.....	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGÍA	19
4.1. ADQUISICIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	19
4.1.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	19
4.1.2. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	19

4.1.3.	IDENTIFICACIÓN DE LA MATERIA PRIMA (MARRUBIO).....	19
4.2.	PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL CONTROL DE CALIDAD.....	19
4.2.1.	MATERIAL EXTRAÑO.....	19
4.2.2.	CONSERVACIÓN.....	20
4.2.3.	ANÁLISIS MACROSCÓPICO.....	20
4.2.4.	DETERMINACIÓN DE AGUA Y MATERIA VOLÁTIL.....	20
4.2.5.	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	20
4.3.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR DIFERENTES FUENTES DE ENERGÍA.....	20
4.3.1.	MONITOREO DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	20
4.3.2.	OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	21
4.4.	CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD REDUCTORA.....	23
4.4.1.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	23
4.5	APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PELÍCULAS COMESTIBLES.....	24
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1.	ELECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	25
5.2.	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.....	25
5.3.	ANÁLISIS MACROSCÓPICO.....	26
5.4.	DETERMINACIÓN DE % DE AGUA Y MATERIAL VOLÁTIL.....	26
5.5.	ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	27
5.6.	PARÁMETROS Y MONITOREO DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	28
5.7.	OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DIFERENTES FUENTES DE ENERGÍA.....	30
5.7.1.	ANÁLISIS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	30
5.7.2.	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL MÉTODO DE CALENTAMIENTO CONVENCIONAL.....	32
5.7.3.	REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.....	34
5.8.	ESPECTROSCOPIA UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	34
5.8.1.	EFFECTO DEL VOLUMEN DE EXTRACTO.....	35
5.8.2.	EFFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN.....	36
5.8.3.	OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS PURAS.....	37
5.9.	ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA PURAS.....	39
5.10.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE MARRUBIO POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	39
5.11.	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE MARRUBIO, NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SOBRENADANTE.....	40
5.12.	APLICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PELÍCULAS COMESTIBLES.....	42
6	Conclusiones.....	46

7	PROSPECTIVAS	47
8	ANEXOS	48
I.	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	48
II.	MONITOREO PARA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR CALOR CONVENCIONAL.....	49
III.	DISEÑOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DIFERENTES TIPOS DE ENERGÍA.	50
IV.	ANÁLISIS ANOVA PARA LOS MÉTODOS UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DIFERENTES TIPOS DE ENERGÍA.	53
V.	FOTOGRAFÍAS DE SOLUCIONES COLORIDAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR DIFERENTES TIPOS DE ENERGÍA.	54
VI.	CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA METODOLOGÍA DE SIMPSON	56
VII.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	56
VIII.	PREPARACIÓN DE REACTIVOS UTILIZADOS EN EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	57
IX.	LISTA DE EQUIPOS UTILIZADOS	58
9	BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Plantas estudiadas para la síntesis de nanopartículas de plata</i>	3
<i>Tabla 2 Clasificación botánica de marrubio</i>	4
<i>Tabla 3 Colores absorbidos y complementarios en el espectro visible</i>	12
<i>Tabla 4 Regiones del espectro infrarrojo</i>	13
<i>Tabla 5 Agentes reductores y estabilizantes utilizados en la obtención de síntesis de AgNP's en solución</i>	15
<i>Tabla 6 Factores y niveles propuestos para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i>	20
<i>Tabla 7 Diseño experimental de monitoreo para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i> ...	21
<i>Tabla 8 Factores propuestos para la optimización del método de síntesis de AgNP's</i>	21
<i>Tabla 9 Diseño experimental de Box-Behnken para calentamiento convencional</i>	22
<i>Tabla 10 Diseño experimental Box-Behnken para irradiación con microondas</i>	22
<i>Tabla 11 Diseño experimental Box-Behnken para irradiación infrarroja</i>	23
<i>Tabla 12 Preparación de sistemas para realizar la curva de calibración</i>	23
<i>Tabla 13 Estudio de las partes aéreas de las especies vegetales utilizadas en la síntesis verde de nanopartículas de plata</i> ...	25
<i>Tabla 14 Determinación de agua y materia volátil de las hojas de marrubio</i>	26
<i>Tabla 15 Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de marrubio</i>	27
<i>Tabla 16 Diseño experimental de monitoreo para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i> ..	28
<i>Tabla 17 Datos experimentales de cada tipo de energía empleada en la obtención de nanopartículas de plata</i>	31
<i>Tabla 18 Datos estadísticos del método de calentamiento convencional</i>	32
<i>Tabla 19 Datos de estadística descriptiva para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calentamiento convencional</i>	33
<i>Tabla 20 Repetibilidad del método de síntesis de AgNP's asistida por calor convencional</i>	34
<i>Tabla 21 Longitudes de onda de metabolitos presentes en el extracto de marrubio</i>	35
<i>Tabla 22 Contenido de mg de EAG/g Ps de romero, marrubio y yerbabuena</i>	40
<i>Tabla 23 Cuantificación de compuestos con capacidad reductora del extracto acuoso de las hojas de marrubio</i>	40
<i>Tabla 24 Grupos funcionales identificados en el extracto acuoso de las hojas de marrubio</i>	41
<i>Tabla 25 Grupos funcionales identificados en las nanopartículas de plata</i>	41
<i>Tabla 26 Grupos funcionales identificados en el sobrenadante</i>	42
<i>Tabla 27 Formulación utilizada para la obtención de películas comestibles</i>	42
<i>Tabla 28 Diseño experimental para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i>	49
<i>Tabla 29 Diseño experimental de monitoreo para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i> ..	49
<i>Tabla 30 Diseño experimental en términos codificados Box-Behnken para calentamiento convencional</i>	50
<i>Tabla 31 Diseño experimental de optimización de síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i>	50
<i>Tabla 32 Diseño experimental en términos codificados Box-Behnken para irradiación con microondas</i>	51
<i>Tabla 33 Diseño experimental de optimización de síntesis de nanopartículas de plata asistida por microondas</i>	51
<i>Tabla 34 Diseño experimental en términos codificados Box-Behnken para irradiación infrarroja</i>	52
<i>Tabla 35 Diseño experimental de optimización de síntesis de nanopartículas de plata asistida por luz infrarroja</i>	52
<i>Tabla 36 Datos estadísticos de análisis de varianza (ANOVA) para la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i>	53
<i>Tabla 37 Datos estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) para el método de síntesis de nanopartículas de plata asistida por microondas</i>	53
<i>Tabla 38 Datos estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) para la síntesis de nanopartículas de plata asistida por luz infrarroja</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Fotografía de un ejemplar de marrubio</i>	4
<i>Figura 2 Estructura química de los polifenoles presentes en el extracto de las hojas de marrubio. Obtenido de Boudjelal y cols, (2012)</i>	4
<i>Figura 3 Estructura básica y algunos tipos de flavonoides</i>	5
<i>Figura 4 Reacción entre un fenol y el reactivo de Folin-Ciocalteu</i>	6
<i>Figura 5 Resonancia de plasmón superficial de una nanopartícula metálica</i>	12
<i>Figura 6 Recipiente cerámico procedente de Manises (Valencia) del siglo XV decorado con lustre</i>	14
<i>Figura 7 Mecanismo de formación de nanopartículas de plata</i>	15
<i>Figura 8 Serie de fotografías de los órganos vegetales de la especie Marrubium vulgare L.</i>	26
<i>Figura 9 Fotografías correspondientes a las pruebas positivas del tamizaje fitoquímico realizado al extracto acuoso de las hojas de marrubio</i>	27
<i>Figura 10 Diagrama de Efectos de Pareto para el monitoreo de la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional</i>	29
<i>Figura 11 Efecto de los factores e interacciones en el diseño experimental de monitoreo de la síntesis de nanopartículas de plata</i>	30
<i>Figura 12 Espectros UV-Vis de extracto acuoso de las hojas de marrubio (azul) y AgNP´s (rojo)</i>	35
<i>Figura 13 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de AgNP´s sintetizadas con diferentes cantidades de extracto acuoso de las hojas de marrubio</i>	36
<i>Figura 14 Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)</i>	36
<i>Figura 15 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de AgNP´s tomadas a diferentes tiempos</i>	37
<i>Figura 16 Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)</i>	37
<i>Figura 17 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de plata puras (a) y (b) micrografía de una nanopartícula observada por MEB: 10000x [Fotografía de Alejandra Sánchez, México, 2018, Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Estudios Cuautitlán]</i>	38
<i>Figura 18 Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata puras para la determinación de estabilidad</i>	39
<i>Figura 19 Curva de calibración de ácido gálico</i>	40
<i>Figura 20 Espectro infrarrojo del extracto acuoso de las hojas de marrubio (1a), nanopartículas de plata (2a) y sobrenadante (3a)</i>	43
<i>Figura 21 Pérdida de peso (g) de trozos de manzana recubiertos (rojo) y trozo de manzana control (verde)</i>	44
<i>Figura 22 Serie de fotografías correspondientes a la aplicación de nanopartículas de plata en recubrimientos comestibles</i> .	44
<i>Figura 23 Oxidación de fenoles a quinonas</i>	45
<i>Figura 24 Reacción de fenoles a quinonas en presencia de nanopartículas de plata</i>	45
<i>Figura 25 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)</i>	54
<i>Figura 26 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la temperatura)</i>	54
<i>Figura 27 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)</i>	54
<i>Figura 28 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)</i>	55
<i>Figura 29 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la potencia)</i> ..	55
<i>Figura 30 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)</i>	55
<i>Figura 31 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)</i>	55

Figura 32 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del porcentaje del voltaje).....55

Figura 33 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción).....56

LISTA DE ABREVIATURAS

-	Negativo
+	Escaso
++	Moderado
+++	Abundante
A	Absorbancia
AgNP's	Nanopartículas de plata
ANOVA	Análisis de Varianza
CV	Coefficiente de Variación
DBB	Diseño Box-Behnken
DBIB	Diseño de Bloques Incompletos Balanceado
Desv. Est	Desviación estándar
DLD	Dispersión de Luz Dinámica
DOE	Desing of Experiments
EAG	Equivalentes de ácido gálico
Exp	Experimento
FC	Folin-Ciocalteu
FIR	Infrarrojo lejano
GHz	Giga Hertz
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alterna
IR	Infrarrojo
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
min	Minutos
MIR	Infrarrojo Medio
mM	Milimolar
MO	Microondas
NIR	Infrarrojo Cercano
NP's	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Potencia
p	p de probabilidad
PD	Polidispersión
PPO	Polifenoloxidasa
Prom	Promedio
Ps	Planta seca
R ²	Coefficiente de determinación
RC	Recubrimientos comestibles
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SSA	Secretaria de Salud
T	Temperatura
t	Tiempo
V	Volumen (mL)
W	Watts
α	Nivel de significancia (0.05)
λ	Longitud de onda máxima

1 INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio, análisis, formación y estructuración de materiales a nivel molecular o supramolecular en el rango de 1-100 nm, generando así sistemas con propiedades o funciones innovadoras debido a su diminuto tamaño **(Ramírez Díaz & Ramírez Solis, 2006)**.

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo importantes investigaciones en nanotecnología centradas en distintas aplicaciones en áreas como: electrónica, mecánica, ciencias ambientales, química, biomédicas, la ciencia de las plantas, entre otras. Por ejemplo; en el campo de la agricultura, existen muchas investigaciones que demuestran su potencial para mejorar los sistemas alimentarios a través de diferentes enfoques que mejoran el desarrollo de nuevos productos **(Kole, Kumar, & Mariya, 2016)**.

En general, las nanopartículas metálicas se pueden obtener por métodos químicos y físicos. Sin embargo, el uso de agentes químicos en el proceso de síntesis no puede pasar desapercibido. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos procesos ecológicos para la obtención de éstas. Los métodos biológicos han dado paso a la “síntesis verde” de nanopartículas que han demostrado ser mejores debido a que permite controlar su crecimiento, forma, estabilización y carga eléctrica. La obtención de nanopartículas metálicas por el método de síntesis verde involucra organismos marinos, bacterias, hongos y plantas **(Sood & Sethi Chopra, 2017)**.

Las plantas y sus derivados tales como los extractos vegetales son una mezcla compleja de compuestos químicos con variadas concentraciones y combinaciones de agentes orgánicos que cuentan con capacidad de reducir iones metálicos en un medio acuoso. Este hecho se conoce desde principios del siglo XX, pero en los últimos años ha adquirido una gran importancia por lo que se han desarrollado metodologías para la síntesis de nanopartículas metálicas con diversas aplicaciones. Las nanopartículas de los metales nobles como la plata (AgNP's) son un tópico de atención para diversas aplicaciones biológicas, además de que poseen propiedades únicas tales como la relación superficie/volumen, absorción de energía en el rango del espectro UV-Vis y su superficie de contacto las hacen que sean muy útiles en la vida humana.

Como contribución a la investigación del área de Fitoquímica; en el presente proyecto se planteó como propósito utilizar el extracto acuoso de las hojas de una planta medicinal perteneciente a la Medicina Tradicional Mexicana, conocida popularmente como “marrubio” para la obtención de nanopartículas de plata, con el fin de contribuir al desarrollo de metodologías experimentales repetibles con un enfoque verde.

2 MARCO TEÓRICO

2.1. MEDICINA TRADICIONAL

La medicina tradicional ha desempeñado un papel importante en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en los países en desarrollo. El 80 % de la población mundial acude a este tipo de medicina para satisfacer las necesidades primarias de la salud. Si bien, con la llegada de los fármacos sintéticos, los productos de origen vegetal pasaron a segundo plano, no obstante, en las últimas décadas han vuelto a alcanzar una presencia cada vez mayor. El retorno a lo natural ha promovido una investigación más intensa sobre las drogas de origen vegetal, por presentar un menor número de efectos secundarios comparado con los fármacos sintéticos **(Prieto González, Garrido Garrido, González Lavaut, & Molina Torres, 2004)**.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010), define a la Medicina Tradicional como la suma de todos los conocimientos y prácticas, explicables o no, usados en el diagnóstico, prevención y eliminación del desequilibrio físico, mental o social y basados exclusivamente en la observación y experiencia, transmitidos de generación en generación oralmente o por escrito. Cada cultura del mundo, con base a sus recursos naturales y costumbres ha desarrollado una serie de prácticas encaminadas al restablecimiento de la salud. México no se quedó atrás de este desarrollo y orgullosamente poseemos lo que se conoce como Medicina Tradicional Mexicana en donde la herbolaria es una práctica fundamental.

En México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos en zonas rurales donde los servicios de atención médica son escasos. En el país existe una gran diversidad de especies vegetales de origen tropical, de las cuales cinco mil plantas son usadas como medicinales, y que dada la diversidad vegetal podrían llegar a ser hasta 20 mil. A pesar de la riqueza y variedad de la flora medicinal, el porcentaje de especies que poseen estudios fitoquímicos y farmacológicos es muy escaso.

En nuestro país el 99 % de las plantas medicinales, crecen de manera silvestre, algunas son anuales, otras perennes, por lo que es necesario crear un programa de propagación a nivel nacional para proveer de materia prima vegetal en cantidades suficientes según la demanda y evitar con ello el exterminio de especies nativas y silvestres, garantizando así la calidad de los recursos medicinales. El control de calidad de los recursos vegetales utilizados como medicinales, debe aplicarse desde su cultivo, colecta, transporte, almacenamiento y venta al público, así como también es necesario establecer una metodología para el registro de plantas que son introducidas al mercado, donde se incluyen principalmente su identificación botánica para asegurar, que es la especie medicinal correcta, concentración y dosificación de los compuestos con actividad biológica **(Torres, Tapia, & Aguilar, 2005)**.

Dentro de la herbolaria mexicana se encuentran las plantas que se muestran en la tabla 1 y que se seleccionaron como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de plata (AgNP's), en este proyecto de tesis, de las que se eligió el marrubio.

Tabla 1 Plantas estudiadas para la síntesis de nanopartículas de plata

Nombre científico	Nombre común	Sinonimia popular	Familia	Metabolitos identificados	Usos medicinales.
<i>Marrubium vulgare L.</i>	marrubio	Malva del sapo, marrubio blanco	Lamiaceae	Apigenina, luteolina, ácido clorogénico, verbascósidos	Bronquitis, bilis, padecimientos respiratorios y estomacales
<i>Tagetes lucida Cav.</i>	pericón	Anisillo, hierba anís y periquillo	Asteraceae	Tagetona, tagetina, kaempferol, pectina y quercetina	Padecimientos estomacales y gripales
<i>Tanacetum parthenium L.</i>	Santa María	Hierba santa, manzanilla grande y mastranzo	Asteraceae	Apigenina, luteolina, tanacetina y α -metil- γ -lactona	Trastornos menstruales, padecimientos estomacales
<i>Ruta graveolens L.</i>	ruda	Roda, ruta	Rutaceae	Cumarinas, quercetina, rutina y kaempferol	Padecimientos estomacales, tos y trastornos menstruales
<i>Salvia hispánica L.</i>	chía	Chan	Lamiaceae	Mucilagos, ácido cafeico, quercetina y ácido clorogénico	Padecimientos estomacales

2.1.1. *MARRUBIUM VULGARE L.* (MARRUBIO)

El género *Marrubium* cuenta con treinta especies diferentes, *Marrubium vulgare L.* es el nombre científico de la planta conocida popularmente como “marrubio”, perteneciente a la familia Lamiaceae. Planta nativa de las regiones templadas de Europa, norte de África y Asia. La composición química de la planta está constituida por diterpenos, flavonoides y una serie de ésteres de fenilpropanoides. La lactona diterpenica marrubína está considerada como marcador quimiotaxonómico a quien también se le atribuyen las propiedades biológicas. Entre los flavonoides se encuentran la apigenina y luteolina (y derivados), presentes en la familia Lamiaceae.

El marrubio es una planta anual que mide entre 30 a 90 cm de altura, sus hojas son opuestas de color verde, ovaladas, rugosas y con presencia de tricomas, con flores blancas y pequeñas concentraciones glomerulares en la unión entre la hoja y tallo, la flor tiene forma tubulosa, además cuenta con tallos cuadrados (característica de las plantas labiadas) cubiertos con abundante vello de color blanco. En la figura 1 se muestra una imagen del ejemplar, así como, su taxonomía (tabla 2).



Figura 1 Fotografía de un ejemplar de marrubio

Tabla 2 Clasificación botánica de marrubio

Reino	Plantae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Lamioideae
Tribu	Marrubieae
Género	<i>Marrubium</i>
Especie	<i>Marrubium vulgare</i> L.
Nombre común	marrubio

De acuerdo con Boudjelal y cols. (2012), el extracto acuoso de las hojas de marrubio contiene quince metabolitos secundarios del grupo de los polifenoles como ácido clorogénico y verbascósido (figura 2). Por otro lado, los tallos y las flores jóvenes se utilizan para el tratamiento de la bronquitis (aguda o crónica), tos, asma, como expectorante y antiespasmódica; en general para problemas respiratorios.

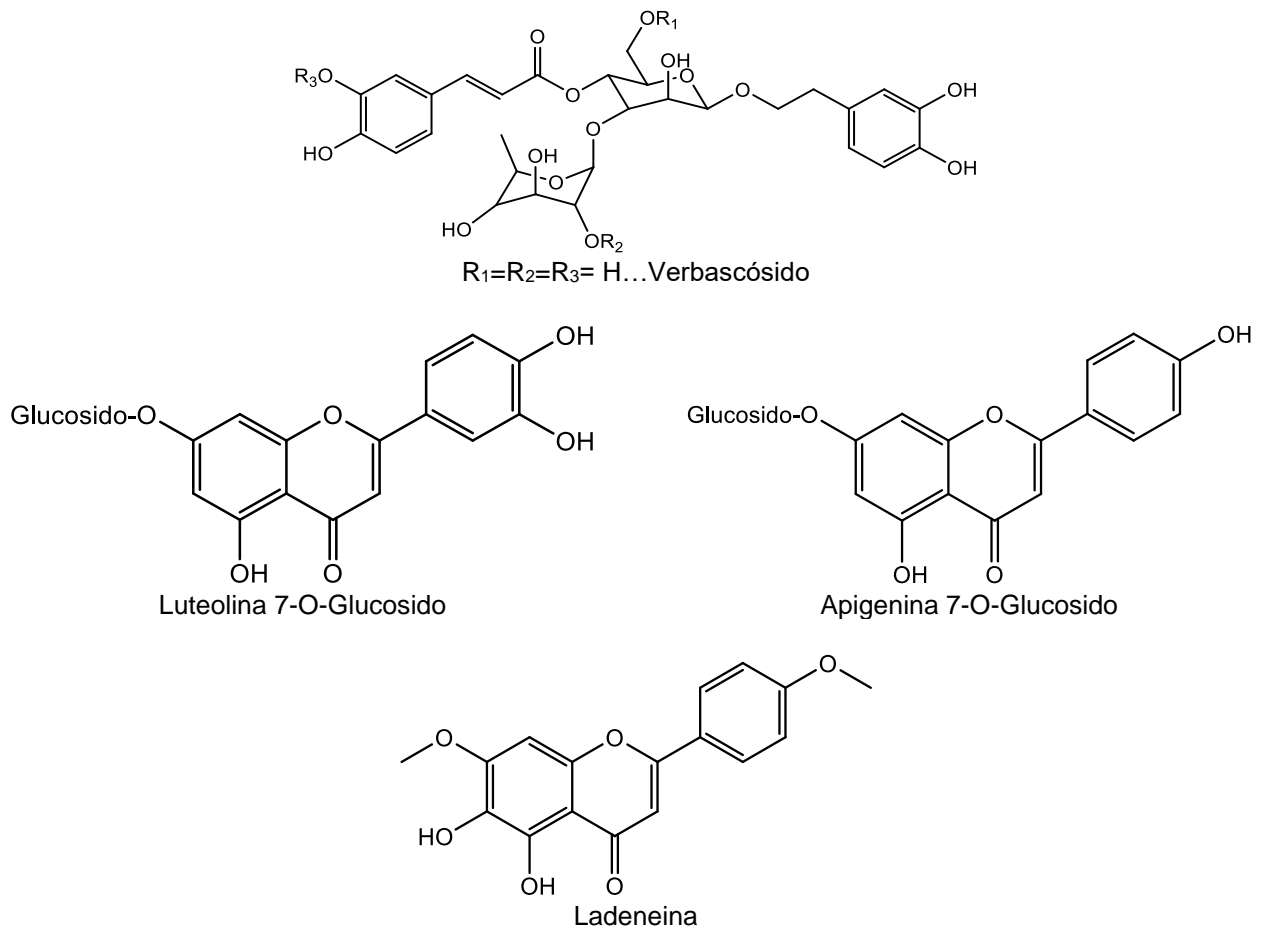


Figura 2 Estructura química de los polifenoles presentes en el extracto de las hojas de marrubio. Obtenido de Boudjelal y cols, (2012)

2.2. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Los compuestos fenólicos y los polifenoles son metabolitos secundarios formados a partir de la ruta del Shikimico, que directamente proporciona fenilpropanoides o por la vía de aceto-malonato que conduce a los policétidos, como algunos fenoles simples; ambos cumplen con una amplia gama de funciones fisiológicas en las plantas (**Lattanzio, 2013**). Los flavonoides son metabolitos de biosíntesis mixta (ruta de Shikimico y acetato-malonato) con una estructura química basada en un esqueleto $C_6-C_3-C_6$. Se diferencian en el grado de oxidación del anillo "C", en la colocación del anillo aromático "B" en las posiciones C2 o C3 del anillo C, y en los patrones de hidroxilación globales (figura 3). Los flavonoides se pueden modificar por hidroxilación, metoxilación u O-Glicosilación de los grupos hidroxilos (**Stobiecki & Kachlicki, 2006**). Los flavonoides presentan actividad antioxidante y se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos como, cardiotónicos, antiinflamatorios, antimicrobiales, entre otros (**Martínez Flórez, González Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002**).

En cuanto a sus características estructurales y el grado de oxidación que presenta en el anillo "B" y "C" se pueden clasificar en: flavanos, flavonoles, flavonas, antocianidinas, catequinas, etc. Existen tres características estructurales que son importantes para su función: la presencia del anillo "B" de la estructura catecol u o-dihidroxi, la presencia de un doble enlace entre el carbono 2 y 3, y la presencia de los grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5.

Los flavonoles y flavonas se unen a azúcares preferentemente en el C3 del anillo C y con menor frecuencia en el C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glucósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente (**Martínez Flores, González Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002**).

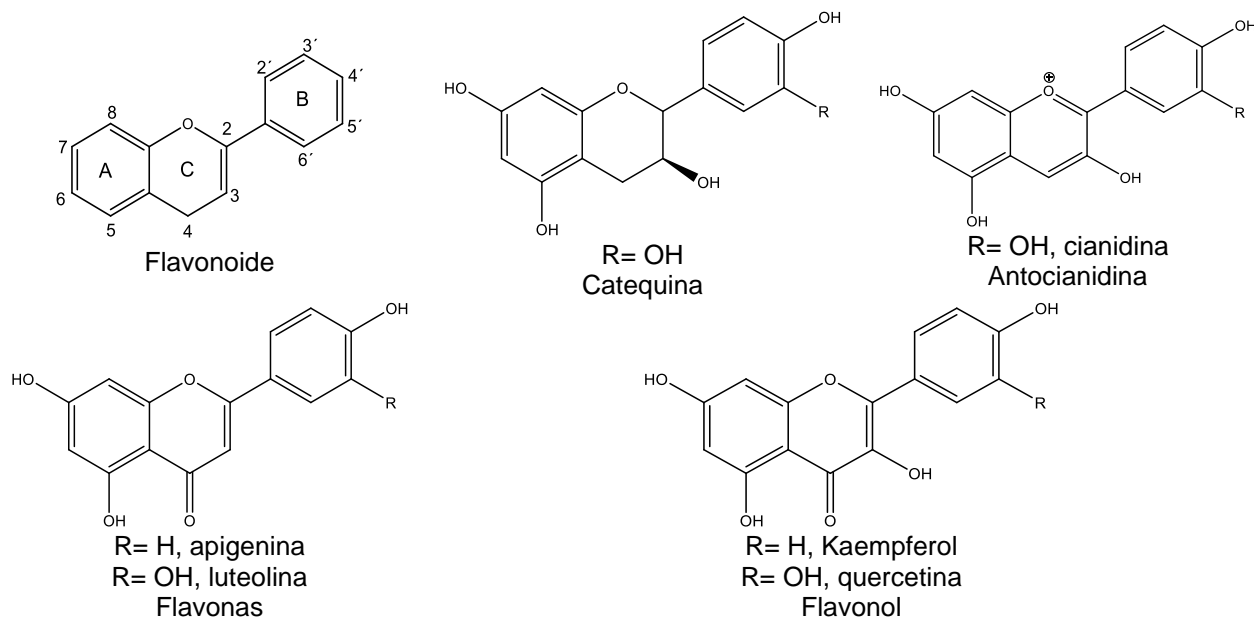


Figura 3 Estructura básica y algunos tipos de flavonoides

Entre los métodos más utilizados para cuantificar compuestos polifenólicos totales en vegetales son vainillina y Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad que tienen los

compuestos fenólicos para reaccionar con agentes oxidantes, el reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico en ácido fosfórico que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones en medio alcalino reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (color amarillo, W^{6+} y Mo^{6+}) en óxidos cromógenos de color azul intenso de tungsteno y molibdeno (W^{5+} y Mo^{5+}) (figura 4). La coloración azul producida posee una absorción máxima a 765 nm. Por tanto, la respuesta de este análisis depende de la cantidad de fenoles presentes y el número de grupos hidroxilo o de grupos potencialmente oxidables que controlan la intensidad del color observado (**Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008**).

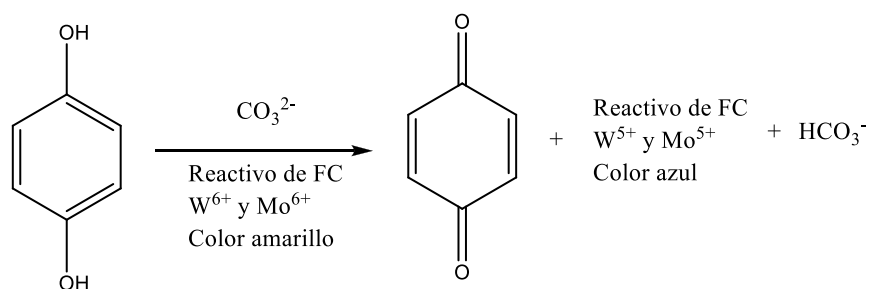


Figura 4 Reacción entre un fenol y el reactivo de Folin-Ciocalteu

2.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

2.3.1. RESEÑA DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El diseño de experimentos (DE) se origina a partir de los trabajos realizados por Ronald Fisher en Inglaterra en el campo de la agricultura. Sus expectativas lo llevaron a publicar en 1935 su libro *Design Of Experiments* (DOE). Desde entonces, varios investigadores han contribuido al desarrollo y aplicación de la técnica en diferentes campos. Montgomery (2005) considera cuatro periodos históricos para el diseño de experimentos:

Periodo 1. Inicia en la década de los veinte, por Fisher e introduce de forma sistemática el pensamiento científico, la aplicación de diseño factorial completo y fraccionado; el análisis de varianza en las investigaciones experimentales científicas.

Periodo 2. Box y Wilson inician este periodo con el desarrollo de la Superficie de Respuesta (RSM), es decir, la respuesta es inmediata y sigue una secuencialidad. En esta etapa surgen diseños como: Diseños Compuestos Centrales (DCC), Diseños Compuestos Centrales en las Caras (FCD) y Diseños Box-Behnken (DBB). Durante los siguientes tres años, la RSM y otras técnicas se extendieron a la industria química y a los procesos industriales, en especial en las áreas de investigación y desarrollo.

Etapa 3. Este periodo inicia a finales de los 70's por el interés que tienen las industrias de la época en mejorar sus procesos. Los trabajos de Taguchi sobre el Diseño Robusto de Parámetros (RPD) permitieron acrecentar el interés y uso del Diseño de Experimentos en áreas como automotriz, electrónica y semiconductores. Estos trabajos permitieron desarrollar el concepto de robustez y ampliar la aplicación del Diseño de Experimentos en otras áreas.

Etapa 4. Esta etapa se desarrolló en los 90's, surgiendo los diseños óptimos y el software para su análisis de Diseños de Experimentos (**Ilzarbe Izquierdo, Tanco, Viles, & Álvarez Sánchez, 2007**).

El diseño de experimentos se define como una técnica en la que se realizan una serie de ensayos con cambios premeditados de los factores de un proceso, para observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida y lograr una investigación de forma planeada.

Lo anterior se puede describir con base a $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ son las variables independientes o variables de entrada (factores controlables) con las que se va a trabajar el diseño, $Z_1, Z_2, Z_3, \dots, Z_n$, son las variables que intervienen en el proceso (factores no controlables) o ruido, y “Y” es la variable dependiente o bien la variable de respuesta. El diseño de experimentos se realiza para obtener datos apropiados que pueden ser analizados mediante métodos estadísticos, con el objeto de producir conclusiones válidas y objetivas **(Siqueiros Tarazón, 2004)**.

2.3.2. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie de respuesta (RSM) sirve para optimizar una o más variables de interés, lo cual se logra al determinar sus mejores condiciones de trabajo. Para ello se utiliza un conjunto de técnicas estadísticas que permiten modelar y analizar la forma en que la variable de interés es influenciada por otras. Entre los diseños más utilizados se encuentran los diseños factoriales completo o fraccionado **(Siqueiros Tarazón, 2004)**.

2.3.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES DE SEGUNDO ORDEN

Los diseños de segundo orden son aquellos que nos permiten estudiar los efectos lineales, de interacción y efectos cuadráticos de un factor dependiente en función de un factor independiente. Se utilizan para la exploración de una superficie más compleja o bien cuando se tienen identificada la región de respuesta óptima y se requiere caracterizar esta respuesta. La Metodología de Superficie de Respuesta es una estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, que son aquellas que dan por resultado valores óptimos de uno o varios experimentos. Los modelos que se utilizan en la metodología de superficie de respuesta son básicamente polinomios **(Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2008)**. De esta manera, si se tienen “k” factores el modelo de segundo orden es:

$$y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_1\beta_1A^2 + \beta_2\beta_2B^2 + \beta_3\beta_3C^2 + \beta_1\beta_2AB + \beta_1\beta_3AC + \beta_2\beta_3BC \dots \dots \dots (1)$$

Donde “y” es la respuesta, β_0 es el intercepto, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ son coeficientes lineales, $\beta_1\beta_1, \beta_2\beta_2, \beta_3\beta_3$ son coeficientes cuadráticos, $\beta_1\beta_2, \beta_1\beta_3, \beta_2\beta_3$ son coeficientes de interacción, A, B y C son los factores independientes **(Krupa Deva, Evy, & Nirmala, 2016)**.

2.3.4. DISEÑOS BOX-BEHNKEN

Los diseños experimentales tipo Box-Behnken (DBB) son aquellos que tienen tres niveles en cada factor, esto permite la estimación de un modelo cuadrático bien definido e incluyendo las interacciones entre los factores, este diseño es una alternativa para ajustar modelos que requieren tres niveles (-1, 0, +1) en cada factor. Es considerado un diseño cuadrático independiente que se forma combinando el Diseño de Experimentos Factorial 2^k con el Diseño de Bloques Incompletos Balanceados **(Siqueiros Tarazón, 2004)**.

En un diseño factorial 2^k , para cada factor se consideran dos niveles, que pueden codificarse en los valores +1 (para el más alto) y -1 (para el más bajo), considerando todas las combinaciones posibles de los niveles de los “k” factores, se obtiene una matriz de diseño de 2^k filas, cada una de ellas presenta un tratamiento, los diseños factoriales presentan el inconveniente de que, salvo que se repitan algunas observaciones, no permiten la estimación del error experimental (ecuación 2).

$$N=2^k \dots\dots\dots (2)$$

El Diseño de Bloques Incompleto Balanceado (DBIB) es un arreglo tal, que todos los tratamientos tienen igual número de réplicas y que cada par de tratamientos se presenta en el mismo bloque en número igual de veces en algún lugar del diseño, el balance obtenido con el mismo número de ocurrencias de todos los pares de tratamiento tiene como resultado una precisión igual en todas las comparaciones entre los pares de medias de tratamientos (**Kuehl, 2001**). El balance no siempre se puede lograr o en algunos casos el número de bloques necesarios para lograrlo hace inconsecuente el experimento, la desventaja que presentan estos diseños experimentales es que exigen un número muy alto de repeticiones, lo que lo hace inmanejable (**Kohli Mohan, Ackermann Díaz, & Castro, 2003**).

2.4. RESEÑA HISTÓRICA DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A principios del siglo XVI se descubrieron los compuestos de plata, sin embargo, fue hasta el siglo XIX cuando con el trabajo de Fox-Talbot y Dagerre, utilizaron el haluro de plata en forma de nanopartícula para aplicaciones en fotoquímica. En esa época, también se emplearon nanopartículas de oro en el moldeado del vidrio, más conocido como “ruby glass”. En 1856, Michael Faraday postuló que el color del *ruby glass*, así como solución acuosa de oro, se debía a pequeñas partículas dispersadas en el sólido.

Durante la segunda mitad del siglo XX, el interés científico por las nanopartículas metálicas, no se limitó a sus propiedades ópticas, también abarcó el estudio de su estabilidad coloidal y su nucleación. El uso de metales coloidales para fines histológicos como agentes de tinción empezó en 1960 y se expandió rápidamente con el uso del microscopio electrónico en el campo de la biología celular. A finales de los 70’s, Goad y Moskovits demostraron que los colores observados en los poros de óxidos de aluminio se debían a la resonancia de plasma de las partículas de metal que estaban depositadas en este óxido.

El descubrimiento de la conexión entre las mejoras electromagnéticas y la resonancia de plasmones provocaron un gran interés en los investigadores teóricos y experimentales que se dedicaron a estudiar nanopartículas metálicas con diferentes geometrías, esto marcó el principio de importantes avances en sus propiedades ópticas. En la década de los 90’s, algunos de los avances en la síntesis de nanopartículas metálicas fueron inspirados por el fenómeno de la cuantización en el tamaño, principalmente para semiconductores (**López Téllez, y otros, 2013**).

2.4.1. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La nanotecnología ha tenido un desarrollo importante en los últimos años debido a que describe la creación de materiales con características estructurales controladas en el rango nanométrico. La nanotecnología presenta un enorme potencial de aplicaciones en diferentes áreas científicas y tecnológicas; por ello, uno de sus objetivos es la obtención de nanopartículas de diversos elementos

metálicos con formas y tamaños diferentes, puesto que presentan propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas, etc. **(López Téllez, y otros, 2013)**.

Una nanopartícula es considerada como un agregado de átomos que mediante un arreglo y las condiciones de formación llegan a comportarse como una unidad completa en términos de propiedades y transporte por lo menos, una de sus dimensiones está entre 1 y 100 nm. A medida que se aproximan a este intervalo, los efectos de tamaño y superficie son más evidentes. Esto tiene implicaciones que pueden manifestarse en sus propiedades magnéticas, en la conducción electrónica o en la reactividad química, entre otras. Es posible controlar dichas propiedades por la modificación de su tamaño, su morfología y su composición. Las nanopartículas metálicas han sido empleadas para una variedad de aplicaciones en diferentes áreas tales como: marcadores biológicos, bactericidas, en celdas solares, térmica, materiales cerámicos, en óptica y electrónica, fármacos, fotoquímica, catálisis química, sector textil e industrias cosmética y automotriz **(López Téllez, y otros, 2013)**.

2.4.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La obtención de nanopartículas metálicas se puede lograr mediante tres métodos: físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos son aquellos procesos en los que no hay transformaciones químicas y que generalmente conducen a partículas cuyo tamaño tiene gran variabilidad, dentro de esta categoría se encuentran los procesos de ablación laser, irradiación con microondas, luz infrarroja, calor convencional, sonoquímica, entre otros.

Los métodos químicos conllevan a reacciones químicas de reducción de iones metálicos para la formación de nanopartículas o de polimerización de óxidos metálicos para la obtención de nanopartículas de óxidos metálicos como es el caso del método sol-gel, termólisis, microemulsión, electroquímica, reducción química, fotólisis o fotoquímica, nanopartículas soportadas, entre otros. Los métodos biológicos son aquellos que emplean algunos organismos vivos, como los hongos, bacterias y plantas **(López Téllez, y otros, 2013)**.

2.4.3. MÉTODOS FÍSICOS

2.4.3.1. MICROONDAS

La radiación por microondas es una forma de energía electromagnética situada en el intervalo de frecuencias 300-300000 MHz correspondiente a una longitud de onda (10 mm – 30 cm) **(Ferrer, Julián, Carrera, & Marcos, 1992)**. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido. Los disolventes polares se calientan y sus componentes moleculares se ven obligados a girar con el campo y pierden energía en colisiones. Las muestras conductoras y semiconductoras se calientan cuando los iones y los electrones contenidos en ellas forman una corriente eléctrica y la energía es liberada debido a la resistencia eléctrica del material **(Zanella, 2012)**.

El calentamiento por microondas de las muestras líquidas permite la disminución de las fluctuaciones de temperatura en el medio de reacción, proporcionando, un entorno propicio para la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas metálicas. La técnica de irradiación con microondas produce

nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logre un control preciso en la morfología, como pasa en otros métodos físicos **(Zanella, 2012)**.

2.4.3.2. MÉTODO DE DISPERSIÓN DE ÁTOMOS METÁLICOS SOLVATADOS

En este método, el metal es vaporizado y depositado en nitrógeno líquido a -196 °C aproximadamente, de tal manera que los átomos o pequeños clústers metálicos quedan atrapados en una matriz orgánica sólida, esto evita que se aglomeren las nanopartículas obteniendo sistemas ultrafinos y altamente reactivos por su diminuto tamaño. Generalmente, un calentamiento de la matriz o el uso de disolventes más polares deriva en partículas más pequeñas, cuyo tamaño y distribución es usualmente menor que el obtenido por la técnica de condensación en gas inerte **(López Téllez, y otros, 2013)**.

2.4.3.3. ABLACIÓN LÁSER

Dentro de esta categoría se encuentra la ablación láser que ha demostrado ser una técnica versátil para la obtención de nanopartículas metálicas con una alta pureza. Para obtener nanopartículas por esta técnica se coloca un láser de alta potencia a manera de pulsos sobre la superficie de un blanco provocando que se evapore rápidamente (llegando al estado de plasma) y enseguida se condensa para formar el material nanoestructurado, la calidad y tamaño de las nanopartículas dependen de la optimización de los parámetros del láser y/o de la presión del gas inerte que se esté utilizando. Una variación de esta técnica es colocar el blanco dentro de un líquido, de manera que el plasma generado se condense inmediatamente en el líquido en forma de nanopartícula. De esta manera se obtienen directamente nanopartículas en un medio líquido y libre de subproductos, por lo que se evita la oxidación en caso de metales altamente oxidables como el hierro **(Mosquera, Rosas, Debut, & Guerrero, 2015)**

5.5.4 MÉTODOS QUÍMICOS

5.5.4.1 REDUCCIÓN QUÍMICA

El principio básico para la obtención de sistemas coloidales es la reducción de un precursor metálico, este método de síntesis permite controlar adecuadamente el tamaño, distribución y la forma de las nanopartículas. En sistemas acuosos, el agente reductor es adicionado o generado *in situ*, mientras que en sistemas no-acuosos, el disolvente actúa también como agente reductor, entre los agentes reductores más utilizados son el borohidruro de sodio, citrato de sodio y glucosa, estos dos últimos agentes reductores son sustancias no tóxicas e igualmente efectivas. En sistemas no acuosos se emplea el polietilenglicol, glicerol, y etilenglicol para la obtención de nanopartículas coloidales **(Aguilar Mendez, 2009)**.

5.5.4.2 SOL-GEL

Este método se utiliza principalmente para la fabricación de nanomateriales (normalmente un óxido metálico). A partir de una solución química que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas dispersas o de una red de polímeros, los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos y cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta se forma un gel. El método sol-gel ha

sido usado en los últimos años para preparar una amplia variedad de materiales nanoestructurados, además de que involucra procesos a baja temperatura **(Zanella, 2012)**.

5.5.4.3 FOTOQUÍMICA Y RADIOQUÍMICA

La reducción fotoquímica o fotólisis y la radioquímica o radiólisis difieren en el nivel de energía utilizada, la síntesis fotoquímica está caracterizada por emplear energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías de 103-104 eV. Estos dos métodos tienen ventajas sobre el método de reducción química, debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se usan los agentes reductores. Además, la reducción foto y radioquímica permiten obtener nanopartículas en condiciones de estado sólido a bajas temperaturas y de alta pureza **(Zanella, 2012)**.

5.5.5 MÉTODOS BIOLÓGICOS

5.5.5.1. BACTERIAS

En la búsqueda de procesos sintéticos para la obtención de nanopartículas metálicas se encuentra la utilización de microorganismos vivos o muertos. En virtud de que se realiza en condiciones suaves, es posible controlar los factores involucrados en la síntesis y estabilización de las nanopartículas. **(López Téllez, y otros, 2013)**.

5.5.5.2. HONGOS

Mukherjee (2001) utilizó el hongo *Verticillium* (hongo fitopatógeno) aislado de una planta del género *Taxus* y lo expuso a una solución acuosa de AgNO_3 causando la reducción de los iones metálicos y la formación de nanopartículas de plata de aproximadamente 25 nm de diámetro. Las nanopartículas de plata se formaron debajo de la superficie de las células fúngicas con una reducción insignificante de los iones metálicos observados en la solución.

5.5.5.3. PLANTAS

Recientemente se están utilizando los extractos vegetales de las plantas para la obtención de nanopartículas de plata ya que son una opción amigable con el medio ambiente, además de que es simple, rápida y estable la obtención de éstas y como medio reductor se utiliza el disolvente universal "agua". Utilizando la planta completa o sus órganos por separado se han obtenido nanopartículas metálicas con aplicaciones en las áreas biomédicas y ambiental. El mecanismo exacto y los compuestos químicos responsables de la reducción del ion metálico aún no han sido dilucidados. Sin embargo, se ha propuesto que proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, polifenoles, terpenoides, entre otros; tienen un papel importante en la reducción del precursor metálico, así como en la estabilización de la nanopartícula producida. Especies vegetales como *Panax ginseng*, *Cocos nucifera*, *Ginkgo biloba*, *Cymbopogon citratus*, entre otras han sido utilizadas para la síntesis de nanopartículas metálicas **(Singh, Kim, Zhang, & Yang, 2016)**.

2.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

2.6.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La espectrofotometría UV-Vis se basa en la medida de la absorción de radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. El intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta que abarca de 190 a 380 nm y la visible que va de 380 a 780 nm (tabla 3). La espectrofotometría en la zona visible (antes se solía llamar colorimetría), es la medida de absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia (Ríos Castro, Moreno Bondi, & Simonet Suau, 2012).

Tabla 3 Colores absorbidos y complementarios en el espectro visible

λ (nm)	Color absorbido	Color complementario
650-780	Rojo	Azul-verde
595-650	Naranja	Verdoso-azul
560-595	Amarillo-verdoso	Púrpura
500-560	Verde	Rojo-púrpura
490-500	Azul-verdoso	Rojo
480-490	Verdoso-azul	Naranja
420-480	Azul	Amarillo
400-420	Violeta	Amarillo-verde

Tomada de Ríos Castro, Moreno Bondi, & Simonet Suau (2012)

Dentro de las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas destaca la aparición de plasmones de superficie los cuales se pueden apreciar debido al pequeño tamaño de la nanopartícula. Para que este fenómeno ocurra el tamaño de la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente. Los electrones de la superficie son capaces de interactuar con la radiación electromagnética dependiendo de la forma, tamaño y naturaleza de la nanopartícula, además de las condiciones físicas y químicas del medio circundante en el que se encuentre el sistema coloidal. El campo eléctrico oscilante de la luz incidente induce un dipolo eléctrico en la partícula desplazando uno de los electrones deslocalizados, generando así una carga neta negativa a un lado de la nanopartícula (figura 5). En partículas pequeñas se produce un dipolo, a partir de los 30 nm se genera un cuádruplo (Cruz D. A., y otros, 2011).

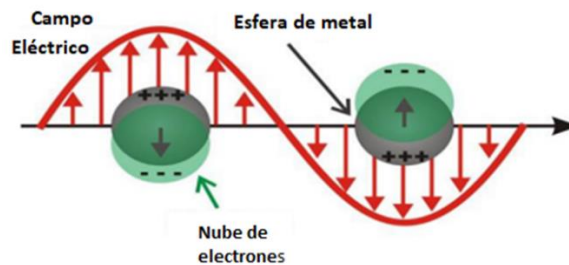


Figura 5 Resonancia de plasmón superficial de una nanopartícula metálica
Modificada de Montero, J. M (2012)

2.6.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopia infrarroja es una técnica analítica que tiene sus bases físicas en la vibración de enlaces de moléculas, esta vibración genera movimientos característicos de varios grupos funcionales (alcoholes, carbonilo, amidas, etc.). La región infrarroja del espectro electromagnético se suele dividir en tres partes debido a las diferencias de energía y también el carácter de las transiciones involucradas en cada caso, así como a la configuración de la instrumentación requerida para la obtención de los correspondientes espectros. En la tabla 4 se indican las zonas en las que se divide la región infrarroja, si bien es cierto que en algún caso se puede diferir el valor que se considera como separación entre el infrarrojo medio y el lejano (**Ríos Castro, Moreno Bondi, & Simonet Suau, 2012**).

Tabla 4 Regiones del espectro infrarrojo

Región	λ (cm ⁻¹)	Tipo de transición
Infrarrojo cercano (NIR)	4000-12800	Vibración (sobretonos y combinación)
Infrarrojo medio (MIR)	400-4000	Vibración + rotación (fundamentales)
Infrarrojo lejano (FIR)	10-400	Rotación pura y vibración

Nota: Información obtenida de Ríos y cols. (2012)

En el infrarrojo cercano (NIR, Near IR) se producen las transiciones correspondientes a la excitación de un modo normal de vibración al segundo estado excitado o superiores (sobretonos) o cuando el fotón de vibración excita simultáneamente dos o más modos de vibración (bandas de combinación). La zona del infrarrojo medio (MIR, Middle IR) corresponde básicamente a las transiciones fundamentales entre los estados vibracionales de más baja energía hasta el primer estado excitado. Por otra parte, en el infrarrojo lejano (FIR, Far IR) aparecen bandas de absorción correspondientes a torsión de baja frecuencia y rotación interna en líquidos y vibraciones de red en sólidos (**Ríos Castro, Moreno Bondi, & Simonet Suau, 2012**).

2.6.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La Microscopía Electrónica de Barrido es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, que se ha usado en el estudio de muestra tales como; nanomateriales, productos comerciales, materiales semiconductores, etc. (**Clavijo, 2013**). El funcionamiento básico del microscopio electrónico de barrido se basa en la incidencia de un haz de electrones de alta energía por medio de un sistema de lentes para focalizar dicho haz sobre una muestra que generará a su vez, electrones secundarios y retrodispersos como respuesta de impacto electrónico, estos electrones que salen de la muestra son detectados por dispositivos que registran la cantidad y la convierten en una señal digital para construir una imagen. La información que se obtiene en la MEB es la morfología de la muestra, simulación 3D empleando la escala de grises, composición de elementos acoplando un espectrofotómetro de dispersión de energía (EDXS) o de longitud de onda (WDXS) de rayos X, Cristalografía superficial acoplando un detector de electrones retrodispersos (EBSD) (**Vargas, y otros, 2014**).

2.6.3. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

Para determinar el tamaño de las partículas se hace pasar un haz de luz producido por una lámpara de helio-neón el cual es filtrado a través de un monocromador y finalmente éste incide sobre una celda que

contiene la muestra de partículas. Los detectores comúnmente situados a 90° o 173° respecto al plano de ubicación de la celda registran la dispersión de fotones provenientes de la inflexión del láser de incidencia. Finalmente, la señal es convertida a registros digitales dónde es posible analizar los gráficos de distribución del tamaño de las partículas. Se debe de tener en cuenta algunos parámetros importantes durante la medición como la absorción de la luz por parte de la muestra, constante dieléctrica del medio en que se encuentran dispersas las NP's, la temperatura de medición, viscosidad del medio y el movimiento browniano de las partículas en estudio **(Leyva Gómez, 2013)**.

Como consecuencia del movimiento Browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas que se mueven más lento (partículas grandes) llevan variaciones de menor intensidad. Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra debe permanecer en reposo **(Cuadros Moreno, Casañas Pimentel, San Martín Martínez, & Yañes Fernandez, 2014)**.

2.7. NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y APLICACIONES

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan distintas como en la joyería, fabricación de utensilios, monedas, fotografía o explosivos, etc. De todos estos usos, uno de los más importantes es el empleo como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos. Así, ya desde la antigüedad se empleaban vasijas de plata para almacenar agua o vino ya que se consideraba que preservaba sus propiedades. Hipócrates, padre de la medicina moderna, describió el empleo de polvo de plata para su aplicación en la curación de heridas y en el tratamiento de úlceras. En los siglos XVII y XVIII se empleó el nitrato de plata para el tratamiento de úlceras y su actividad antimicrobiana se estableció en el siglo XIX. Sin embargo, después de la introducción de los antibióticos en 1940 el uso de las sales de plata disminuyó. Posteriormente se han empleado sales y compuestos de plata en diferentes campos biomédicos, especialmente en el tratamiento de quemaduras **(Monge, 2009)**.

El primer ejemplar reconocido es la copa de bronce Lycurgus (figura 6) del siglo IV d. C. que posee vidrio coloreado cuya propiedad es que dispersa luz verde y transmite luz roja debido a que contiene nanopartículas metálicas de aproximadamente 70 nm que son una aleación de plata (70 %) y oro (30) **(Monge, 2009)**.



Figura 6 Recipiente cerámico procedente de Manises (Valencia) del siglo XV decorado con lustre

Nota: Ilustración tomada de Monge (2009)

En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en solución se lleva a cabo mediante el empleo de un precursor metálico, agente reductor y un agente estabilizante. El mecanismo de formación de las soluciones coloidales a partir de la reducción de iones de plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el procedimiento de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerán de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas mediante regulación de los factores que intervienen en la reacción como: concentración, temperatura, pH, agente reductor, etc. En la figura 7 se presenta el mecanismo de formación de nanopartículas de plata. El precursor metálico en presencia de un agente reductor produce átomos de plata libres que inician la nucleación y crecimiento que de acuerdo con las condiciones de síntesis ésta se detendrá.

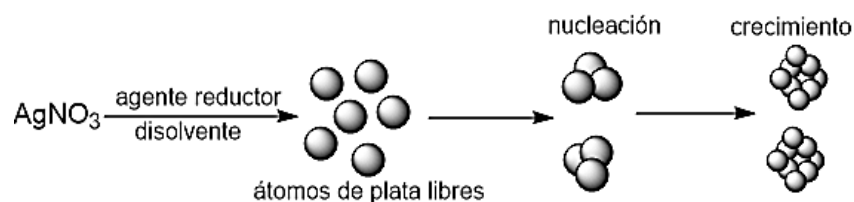


Figura 7 Mecanismo de formación de nanopartículas de plata
Nota: Información tomada de Monge (2009)

El método más usado para la obtención de nanopartículas es mediante el uso de una sal o precursor metálico en presencia de un agente reductor y un medio líquido que favorezca la dispersión de nanopartículas formadas. En éste destaca la formación de AgNP's a partir de AgNO_3 empleando como agentes reductores ácido ascórbico, polioles o monosacáridos. El uso de agentes reductores débiles, como los polioles, deben tener una alta temperatura de reflujo para la obtención AgNP's de aproximadamente 40 nm. En el caso de los monosacáridos, se ha desarrollado un método denominado "verde", debido a que no se generan residuos peligrosos para el medio ambiente. En la tabla 5 se muestra una lista de agentes reductores y estabilizantes.

López y cols., (2012) reportan que se pueden obtener nanopartículas de plata utilizando extractos de las siguientes plantas: *Medicago sativa* L. (alfalfa), *Aloe vera* (sábila), *Cinnamomun camphora* (árbol de alcanfor), *Capsicum annuum* L. (pimiento rojo), etc. El tamaño de las nanopartículas que se obtuvo está entre 20-80 nm.

Tabla 5 Agentes reductores y estabilizantes utilizados en la obtención de síntesis de AgNP's en solución

Precursor	Reductor	Estabilizante
AgNO_3	Citrato de sodio	Citrato de sodio
AgNO_3	NaBH_4	BH_4^-
AgNO_3	Ac. Ascórbico	Ac. Ascórbico
AgNO_3	Polioles	PVP
AgNO_3	β -D-glucosa	Almidón
AgNO_3	DFM	APS y PVP
AgNO_3	Radiación UV	PVP y PEG

Nota: PVP= polivinilpirrolidona, APS= aminopropiltriétoxissilano y PEG= polietilenglicol

Fuente: Monge (2009)

Entre las aplicaciones de las nanopartículas de plata esta la elaboración de envases plásticos para contener alimentos, prolongando de tres a cuatro veces su frescura **(Euroresidentes, 2017)**. En agricultura se están utilizando las nanopartículas de plata para erradicar microorganismos no deseables de suelos de macetas y cultivos hidropónicos o como aerosoles para detener el crecimiento de hongos, moho para evitar la podredumbre y muchas otras enfermedades de las plantas **(Singh, Kumar Singh, S.M., & A.K., 2015)**.

2.8. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la Industria Agroalimentaria es la pérdida postcosecha ya sea por almacenamiento o transporte. Datos proporcionados por SAGARPA (2016), estima la pérdida postcosecha a nivel internacional de granos almacenados, asciende al 5%, sin embargo, en los países subdesarrollados estos porcentajes se pueden incrementar hasta a un 30%. En el caso de México estas pérdidas van en el orden de 20 a 30%, mientras que la FAO reporta que estos porcentajes oscilan entre 10 a 25%. Las causas de las pérdidas postcosecha se atribuyen a los factores bióticos como los insectos, hongos, roedores e incluso aves, entre otros.

Los recubrimientos comestibles (RC) son capas finas de material transparente alimenticio que se deposita en una sustancia nutritiva (generalmente vegetales y frutas frescas) para extender su vida útil. Estos recubrimientos reducen los procesos metabólicos, retardando el crecimiento bacteriano y la senescencia; facilitando la distribución y comercialización de las frutas y vegetales. La formulación de los RC incluye proteínas, polisacáridos y sustancias hidrófobas, ya sea como componentes únicos o combinados. El mecanismo por el que se conserva la calidad de frutas y vegetales es porque constituyen una barrera semipermeable a los gases presentes en el aire, al vapor de agua; retrasando así su deterioro, controlando la respiración, la senescencia, mejorando las propiedades sensoriales, ayudando a mantener la integridad estructural del producto que envuelven, reteniendo compuestos volátiles y también actuando como vehículo de aditivos alimentarios **(Andrade, Acosta, & Luna, 2013)**.

El uso de polisacáridos y proteínas permite la formación de redes moleculares enlazadas por una alta interacción entre sus moléculas, proporcionándoles excelentes cualidades mecánicas y de barrera. Dentro de los polisacáridos más utilizados en la elaboración de recubrimientos comestibles se encuentran; pectinas, celulosa y sus derivados, alginato, quitosano, dextrina, goma arábiga, almidones (de trigo, maíz, yuca y papa) **(Andrade, Acosta, & Luna, 2013)**. En el caso de las proteínas, la soya es la más utilizada por su excelente capacidad de formar recubrimientos y por sus buenas propiedades de barrera frente al oxígeno en humedades relativamente bajas **(Valdés Fernández, Baños Bautista, Ramírez Ocampo, Pereira García, & Rodríguez Falcón, 2015)**.

En cuanto a las sustancias hidrófobas, éstas presentan excelentes características frente a la humedad, sin embargo, les falta adherencia e integridad estructural y por ende poseen malas propiedades mecánicas dando como resultado recubrimientos quebradizos. Sin embargo, éstos reducen la transpiración y deshidratación mejorando el brillo y apariencia del alimento. Dentro de las fuentes lipídicas más utilizadas están las ceras animales y vegetales, los aceites esenciales (con buenas propiedades antimicrobianas), los ácidos grasos de puntos de fusión alto (cera de abeja) **(Valdés Fernández, Baños Bautista, Ramírez Ocampo, Pereira García, & Rodríguez Falcón, 2015)**.

Debido a las desventajas que presenta el uso de sustancias hidrófobas en la formulación de recubrimientos comestibles, es necesario el uso de aditivos como plastificantes (glicerol, sorbitol, ácidos grasos, etc.) emulsificantes y tensoactivos **(Fernández, Echeverría, Mosquera, & Paz, 2017) (Andrade, Acosta, & Luna, 2013)**.

2.8.1 VENTAJAS DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE

Un recubrimiento comestible forma parte del alimento y como su nombre lo dice, pueden ser consumidos como parte de éste. Los recubrimientos comestibles están manufacturados por polímeros biodegradables, no tóxicos que ayudan a conservar las propiedades de los alimentos durante su almacenamiento y comercialización. Algunas de sus características que presentan se enlistan a continuación:

- No tóxicos
- Preparación simple
- Protectores por acción física, química y mecánica
- Transparentes y difíciles de detectar durante el consumo
- Prolongar la vida útil controlando el desarrollo de microorganismos
- Adecuada permeabilidad al vapor de agua
- Selectividad de gases desde el alimento hacia el exterior y viceversa

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una metodología que permita la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de las hojas de la especie *Marrubium vulgare* L. (marrubio) para determinar los factores que influyen en el tamaño de partícula.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las partes aéreas de cinco especies vegetales utilizando el extracto acuoso de cada planta como agente reductor en presencia de nitrato de plata para la obtención de nanopartículas de plata.
- Recolectar y herborizar un ejemplar de la planta medicinal seleccionada para que estudiando sus características macroscópicas en el herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala proporcione su identidad botánica.
- Realizar el tamizaje fitoquímico preliminar al extracto acuoso de la planta seleccionada mediante una serie de pruebas cromogénicas y de precipitación para identificar cualitativamente los grupos químicos presentes.
- Optimizar la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional, microondas y luz infrarroja utilizando un diseño experimental de segundo orden (Diseño Box-Behnken), para estudiar los factores que afectan el tamaño de partícula.
- Caracterizar las nanopartículas de plata obtenidas mediante espectroscopia UV-Vis, Dispersión de Luz Dinámica, espectroscopia infrarroja y Microscopia Electrónica de Barrido para comprobar su tamaño y forma.
- Aplicar las nanopartículas de plata sintetizadas en un recubrimiento comestible para evitar el cambio de coloración en trozos de manzanas.

4 METODOLOGÍA

4.1. ADQUISICIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para seleccionar la materia prima vegetal se ensayaron cinco especies: marrubio, Santa María, ruda, pericón y semillas de chía. El marrubio se recolectó en el municipio de Zumpango, en la época de verano, y la Santa María, ruda, pericón y semillas de chía se compraron en mercados de los municipios de Cuautitlán y Cuautitlán Izcalli.

Para la conservación de las plantas se utilizó el método de desecación natural a la sombra, colocándolas extendidas sobre papel secante protegido de la luz y el polvo. Posteriormente cada especie vegetal se separó en sus diferentes órganos (flores, hojas y tallos).

4.1.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los órganos vegetales de cada especie se trituraron en un procesador de alimentos Marca Moulinex® durante un tiempo de 9 segundos (con intervalos de 3 segundos) y los tallos fueron cortados en pequeños trozos.

Se pesaron 0.5 g de cada órgano por separado (flores, hojas y tallos), posteriormente se sometieron a un proceso de extracción discontinua, digestión o infusión, dependiendo de la dureza del órgano vegetal en un volumen de 10 mL de agua destilada. Finalmente se separó el extracto del marco agotado por centrifugación a 2500 rpm por 5 min.

4.1.2. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se colocaron 2 mL de extracto vegetal de cada planta en tubos de ensayo previamente identificados y se adicionaron 12 mL de una solución acuosa de nitrato de plata 1 mM. Cada sistema se agitó hasta obtener una mezcla homogénea y se monitorearon durante una semana para confirmar si había un cambio de color (rojo ladrillo) indicativo de la formación de nanopartículas de plata. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente.

4.1.3. IDENTIFICACIÓN DE LA MATERIA PRIMA (MARRUBIO)

Una vez seleccionado la materia prima, se regresó al sitio de recolección (Zumpango, San Sebastián, Edo de México, en la época de verano) para el acopió de más material vegetal. Del material recolectado se seleccionaron tres ejemplares y se llevaron al Herbario Etnobotánico ITZA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala para su identificación taxonómica.

4.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL CONTROL DE CALIDAD

4.2.1. MATERIAL EXTRAÑO

La materia prima recolectada se inspeccionó para identificar y separar todo elemento que no cumpliera con las características físicas de la planta, así como la eliminación del polvo (**SSA, 2013**).

4.2.2. CONSERVACIÓN

La materia prima recolectada se sometió a un proceso de desecación natural a la sombra por lo que se colocó extendido en una mesa sobre papel secante, protegida de la luz y el polvo durante una semana. De la planta seca se seleccionaron las hojas y se trituraron utilizando un procesador de alimentos marca Moulinex® durante 9 segundos (en intervalos de tres segundos). El polvo obtenido se pasó por un tamiz malla #10 con apertura de 1.68 mm, con el fin de clasificar el polvo de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2013).

4.2.3. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Un ejemplar de marrubio se separó en sus diferentes órganos (hojas, flores y tallos) y se observaron utilizando el microscopio estereoscópico con el fin de documentar las características físicas de cada órgano de la planta.

4.2.4. DETERMINACIÓN DE AGUA Y MATERIA VOLÁTIL

Se determinó el porcentaje de agua y material volátil en el polvo de las hojas de marrubio, por lo que se pesó aproximadamente 1 g de muestra, posteriormente se colocaron en el plato de la termobalanza marca Ohaus® por un tiempo de 10 minutos y 100 °C de temperatura. Este procedimiento se realizó por triplicado. Se anotó el valor obtenido en la termobalanza y se calculó el porcentaje de agua y material volátil con la ecuación que se muestra a continuación:

$$g \text{ H}_2\text{O} = \frac{\text{Valor obtenido en la termobalanza}}{100} (\text{peso promedio de muestra})$$

$$\text{mg de planta seca} = (\text{peso promedio de muestra} - g \text{ H}_2\text{O}) \left(\frac{1000\text{mg}}{1 \text{ g}} \right)$$

4.2.5. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Para la obtención del extracto acuoso de las hojas de marrubio se siguió la metodología planteada en el numeral 4.1.1. Y para realizar el tamizaje fitoquímico se ensayaron pruebas de identificación y precipitación para flavonoides, lactonas, taninos/fenoles, alcaloides, espuma entre otras (anexo VIII).

4.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR DIFERENTES FUENTES DE ENERGÍA

4.3.1. MONITOREO DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Se plantearon una serie de experimentos y se evaluaron empleando un modelo matemático lineal en el software estadístico Design-Expert versión 7.0.0. el tipo de diseño experimental empleado fue un factorial completo de tres factores dos niveles sin puntos centrales, es decir 2^3 (tabla 6).

Tabla 6 Factores y niveles propuestos para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Calor convencional		
Factor	-1	1
V (mL)	1	2
T (°C)	60	70
t (min)	90	120

Los experimentos se realizaron conforme al diseño experimental en términos actuales mostrado en la tabla 7¹.

Tabla 7 Diseño experimental de monitoreo para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Exp	V (mL)	T (°C)	t (min)
1	1	60	90
2	2	60	90
3	1	70	90
4	2	70	90
5	1	60	120
6	2	60	120
7	1	70	120
8	2	70	120

4.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Se planteó la optimización del método de síntesis de nanopartículas de plata asistida por tres diferentes tipos de energía: calentamiento convencional, irradiación con microondas y luz infrarroja. En la tabla 8 se observan los factores y niveles a optimizar. Se seleccionará la fuente de energía y las mejores condiciones que condujeron a la obtención del menor tamaño de partícula.

Tabla 8 Factores propuestos para la optimización del método de síntesis de AgNP's

Calentamiento convencional			Microondas		
Factor	-1	1	Factor	-1	1
V (mL)	1	2	V (mL)	1	2
T (°C)	60	70	Potencia (w)	30	50
t (min)	90	120	t (s)	200	300

Luz infrarroja		
Factor	-1	1
V (mL)	1	2
% Voltaje	30	50
t (min)	23	31

Para la optimización de los métodos se utilizó un Diseño de experimentos Box-Behnken (DBB). Los diseños de experimentos de optimización se realizaron empleando el software estadístico Design-Expert versión 7.0.0. Cada diseño constó de 17 experimentos con cinco puntos centrales y se realizaron conforme a las tablas 9, 10 y 11 para cada tipo de energía. Los diseños experimentales se encuentran en términos actuales².

¹ El diseño experimental de monitoreo en términos codificados se encuentra en el anexo II.

² Los diseños experimentales de optimización en términos codificados se encuentran en el anexo III.

Tabla 9 Diseño experimental de Box-Behnken para calentamiento convencional

Exp	V (mL)	T (°C)	t (min)
1	1	60	105
2	2	60	105
3	1	70	105
4	2	70	105
5	1	65	90
6	2	65	90
7	1	65	120
8	2	65	120
9	1.5	60	90
10	1.5	70	90
11	1.5	60	120
12	1.5	70	120
13	1.5	65	105
14	1.5	65	105
15	1.5	65	105
16	1.5	65	105
17	1.5	65	105

Tabla 10 Diseño experimental Box-Behnken para irradiación con microondas

Exp	V (mL)	P (w)	t (s)
1	1	30	250
2	2	30	250
3	1	50	250
4	2	50	250
5	1	40	200
6	2	40	200
7	1	40	300
8	2	40	300
9	1.5	30	200
10	1.5	50	200
11	1.5	30	300
12	1.5	50	300
13	1.5	40	250
14	1.5	40	250
15	1.5	40	250
16	1.5	40	250
17	1.5	40	250

Tabla 11 Diseño experimental Box-Behnken para irradiación infrarroja

Exp	V (mL)	Voltaje (%V)	t (min)
1	1	30	23
2	2	30	23
3	1	50	23
4	2	50	23
5	1	40	15
6	2	40	15
7	1	40	31
8	2	40	31
9	1.5	30	15
10	1.5	50	15
11	1.5	30	31
12	1.5	50	31
13	1.5	40	23
14	1.5	40	23
15	1.5	40	23
16	1.5	40	23
17	1.5	40	23

4.4. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD REDUCTORA

Para llevar a cabo la cuantificación de compuestos químicos con capacidad reductora se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu. En la tabla 12 se muestran los detalles de preparación de los sistemas y en el anexo VII se dan los detalles del procedimiento.

Tabla 12 Preparación de sistemas para realizar la curva de calibración

Sistema	Blanco	I	II	III	IV	V	VI	Muestra
Ac. Gálico 0.1 mg/mL	0	50	200	400	600	800	1000	NA
Agua (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Reactivo Folin-Ciocalteu (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Na ₂ CO ₃ al 20 % (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
[µg/mL]	0	0.5	2	4	6	8	10	NA

Nota: NA significa No Aplica

4.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 10 mL de extracto acuoso de las hojas de marrubio y se llevó al aforo con agua destilada (solución 1).

En otro matraz volumétrico de 10 mL se adicionó 1 mL de la solución 1, enseguida se adicionaron 2 mL de agua destilada, 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó la mezcla durante un minuto y se dejó reposar durante 8 minutos, posteriormente se adicionaron 2 mL de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 20 %, la solución se mezcló durante un minuto y finalmente se dejó reposar durante 30 minutos. Pasado el tiempo de reposo se procedió a leer la absorbancia de la muestra a una longitud de 765 nm.

4.5 APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PELÍCULAS COMESTIBLES

Las nanopartículas de plata obtenidas se integraron a una formulación de un recubrimiento comestible. Para obtener los recubrimientos comestibles se procedió a colocar 2 g de alginato de sodio y 0.5 g de Tween 60 en un vaso de acero inoxidable, posteriormente se adicionaron 50 mL de agua destilada a 70 °C, la mezcla se agitó vigorosamente por 10 minutos. La emulsión resultante se dividió en dos partes y se etiquetaron como “**Solución 1**” y “**Solución 2**”.

La **Solución 1** (control) contenía 25 mL de emulsión los cuales se colocan en una caja Petri y extendieron uniformemente hasta obtener una capa homogénea, la caja Petri se introdujo a una estufa previamente acondicionada a 40 °C y se dejó por un tiempo de 40 minutos de incubación, una vez terminado el tiempo de incubación se determinaron las propiedades físicas del recubrimiento.

La **Solución 2**. En un vaso de metal se colocaron 25 mL de emulsión seguido de 25 mL de una solución de nanopartículas de plata a una concentración de 16.6270 ppm, la mezcla se agitó vigorosamente por 5 minutos, posteriormente la mezcla resultante se colocó en un caja Petri extendiendo uniformemente hasta que se obtuvo una capa homogénea, la caja Petri se introdujo a una estufa previamente acondicionada a 40 °C y se dejó por un tiempo de 40 minutos de incubación, una vez terminado el tiempo de incubación se determinaron las propiedades físicas del recubrimiento.

Una vez obtenidos los recubrimientos comestibles, se procedió a cortar una manzana en trozos cuadrangulares y se cubrieron. Se rotularon como recubrimiento sin nanopartículas de plata, control y recubrimiento con nanopartículas. Se observaron los cambios de coloración en cada caso.³

³ Los equipos utilizados en el presente trabajo de investigación se encuentran en el anexo IX.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ELECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Como se indicó en el apartado de metodología se utilizaron las plantas: marrubio, Sta. María, ruda pericón y semillas de chía. Se seleccionaron éstas, por los datos obtenidos en la literatura que indican que contienen compuestos fenólicos con capacidad reductora. Los criterios para elegir la plata fueron; cambio de coloración (rojo ladrillo) en los sistemas de síntesis, tiempo de reacción, presencia de una banda alrededor de los 450 nm indicativa de la formación de nanopartículas de plata y la absorbancia de éstas. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 13 Estudio de las partes aéreas de las especies vegetales utilizadas en la síntesis verde de nanopartículas de plata

Órgano de la planta	Tiempo de síntesis	Color obs	A obs	λ (nm) obs
Flores de marrubio	22 horas	Rojo claro	0.554	450
Hojas de marrubio	3 días	Rojo ladrillo	1.238	450
Tallos de marrubio	-	-	-	-
Hojas de Sta. María	3 días	Rojo ladrillo	0.925	460
Flores de Sta. María	3 días	Rojo oscuro	0.745	495
Tallos de Sta. María	-	-	-	-
Hojas de ruda	-	-	-	-
Tallos de ruda	7 días	Rojo claro	0.784	460
Hojas de pericón	-	-	-	-
Tallos de pericón	-	-	-	-
Semillas de chía	7 días	Rojo-naranja	1.380	450

Nota: Los signos (-) significan que no hubo cambios visuales en los experimentos, si se deseara profundizar en el estudio se recomienda el considerar modificar las condiciones de reacción.

Con base a los resultados obtenidos, los tallos de marrubio, Sta. María y pericón, así como, las hojas de ruda y pericón se descartaron porque no presentaron el cambio de coloración. Considerando el tiempo de reacción, se descartaron las hojas y flores de Sta. María, los tallos de ruda y semillas de chía por ser muy largos, sin embargo, éstos pueden ser candidatos para futuras investigaciones, debido a que están presentando la banda de plasmón en la longitud de onda prevista (\sim 450 nm), solo restaron las flores y hojas de marrubio. Se seleccionaron las hojas de marrubio debido a su alta disponibilidad (la planta presenta pocas flores) y porque cumplieron con los requisitos previstos.

5.2. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La planta fue recolectada en la comunidad de San Sebastián, Zumpango, Estado de México, el 26 de agosto del 2016 entre 12-13 h, de la materia prima recolectada se separaron tres ejemplares completos, los cuales se herborizaron para su identificación taxonómica. El Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala emitió una carta con los siguientes datos; el ejemplar fue registrado con el número 2517 IZTA, con el nombre científico de la especie "*Marrubium vulgare L.*", conocido comúnmente como "marrubio", el cual pertenece a la familia Lamiaceae (anexo I).

5.3. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

En la figura 8 se puede observar una serie de fotografías correspondientes a los órganos vegetales de marrubio, en éstas se pueden observar que sus hojas son ovaladas con un peciolo corto que sobresale del tallo, de color verde, con rugosidades y tricomas de color blanco (1a y 2a). Presenta inflorescencias que contienen flores en forma tubular cubiertas de pequeños tricomas (1b y 2b), además, cuenta con un tallo que es rectangular el cual está cubierto de una velloidad blanquecina y abundante (1c).

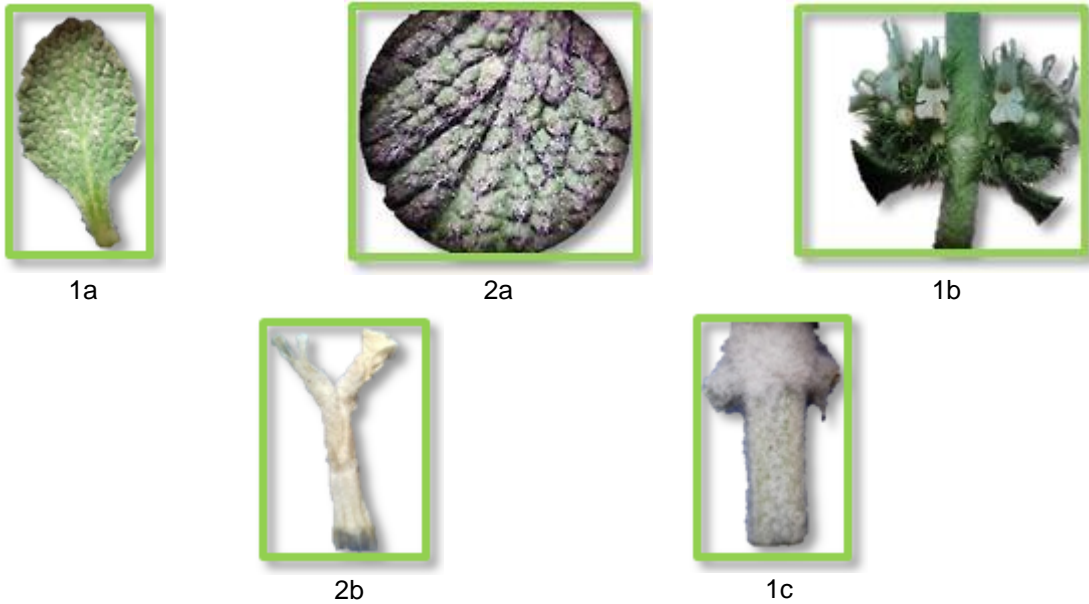


Figura 8 Serie de fotografías de los órganos vegetales de la especie *Marrubium vulgare L.*

5.4. DETERMINACIÓN DE % DE AGUA Y MATERIAL VOLÁTIL

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de las tres determinaciones del % de agua y material volátil realizadas al polvo de las hojas de marrubio, obteniendo un valor de 8.77 %, de acuerdo con Villar del Fresno, (1999) las plantas medicinales deberán tener un valor máximo del 10% de agua y material volátil. El resultado obtenido se encuentra por debajo del 10 % por lo que se puede deducir que el material se sometió a un correcto proceso de conservación y almacenamiento.

Tabla 14 Determinación de agua y materia volátil de las hojas de marrubio

Peso (g) de muestra de marrubio	% agua y material volátil	Promedio % de agua y material volátil
1.002	8.39	8.77
1.020	8.97	
1.005	8.96	

5.5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

El análisis fitoquímico preliminar es una técnica en la que se puede detectar de manera presuntiva los grupos químicos extraídos de una planta, en este caso, del extracto acuoso para después realizarle una serie de reacciones que dan como resultado cambios de color característicos y / o precipitación. Los grupos químicos detectados en el extracto acuoso de las hojas de marrubio son: agrupamientos lactónicos, fenoles, taninos, azúcares reductores, nitrogenados y flavonoides (tabla 15⁴) y en la figura 9 se muestran las imágenes correspondientes a las pruebas realizadas al extracto vegetal de marrubio

Tabla 15 Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de marrubio

Ensayo	Metabolito secundario	Extracto acuoso
Bornträger	Quinonas	-
Baljet	Agrupamientos lactónicos	++
Espuma	Saponinas	-
FeCl ₃	Fenoles / taninos	+++
Fehling	Azúcares	+++
Shinoda	Flavonoides	-
Aluminio	Flavonoides	+++
Ninhídrida	Compuestos nitrogenados	+++
2,4-DNFH	Grupo carbonilo	+++
Ácido silicotúngstico	Turbidez	-
Dragendorff	Alcaloides	-
Hager	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Rosenthaler	Alcaloides	-



Figura 9 Fotografías correspondientes a las pruebas positivas del tamizaje fitoquímico realizado al extracto acuoso de las hojas de marrubio

⁴ Nota: Los resultados se registraron de acuerdo con Domínguez (1988) cómo: abundante (+++), moderado (++), escaso o dudoso (+) y negativo (-).

5.6. PARÁMETROS Y MONITOREO DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Para la investigación de los factores que afectan el tamaño de partícula en la obtención de nanopartículas de plata, se tomó como referencia el trabajo de Lescas & Moreno (2016), en este trabajo utilizaron 2 mL de extracto vegetal.

Por otra parte, para determinar la temperatura y tiempo se realizaron una serie de ensayos exploratorios que dieron por resultado los intervalos de temperatura de 60-70°C y tiempo de reacción de 90-120 min. Con estos datos se planteó el diseño experimental factorial completo, empleando un modelo matemático lineal de tres factores dos niveles (2^3), sin puntos centrales (anexo II). En el caso de la síntesis con irradiación con microondas (MO) e infrarrojo (IR) los factores fueron las siguientes MO; V:1 a 2 mL, Potencia: 30 a 50 w, t: 200-300 s e IR; V: 1 a 2 mL, % de Voltaje: 30 a 50 y t:23 a 31min.

Con base en los resultados obtenidos de la tabla 16 se concluye que se obtuvieron nanopartículas de plata con un intervalo de tamaño promedio de partícula entre 51-98 nm que cumple con los criterios para la escala nanométrica menor de 100 nm. ⁵Entre los datos mostrados en la tabla 16 se observa que el experimento 7 se obtuvo el menor tamaño de partícula de 51.13 nm, mientras que el experimento 6 fue el que presentó un mayor tamaño de partícula de 98 nm.

Tabla 16 Diseño experimental de monitoreo para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Exp	V (mL)	T (°C)	t (min)	Tamaño de Partícula (nm)
1	1	60	90	76.49
2	2	60	90	64.47
3	1	70	90	88.18
4	2	70	90	69.67
5	1	60	120	85.30
6	2	60	120	98.00
7	1	70	120	51.13
8	2	70	120	79.66

Los resultados obtenidos en el diseño experimental de monitoreo factorial completo indicó que la interacción de los factores “AC” (volumen y tiempo) son altamente significativos, seguido de la interacción de “BC” (temperatura y tiempo) y el factor lineal B (temperatura) son significativos. La influencia en la respuesta del sistema ante cambios en los factores puede observarse de manera estandarizada en el Diagrama de Efectos de Pareto (figura 10), en el que se confirma que la interacción del volumen y la temperatura son los factores que tienen un mayor predominio sobre la respuesta. Los factores e interacciones que no sobrepasan el límite estadístico “t-value” tienen un aporte insignificante en la respuesta.

⁵ El diseño experimental de monitoreo en términos codificados se encuentra en el anexo II.

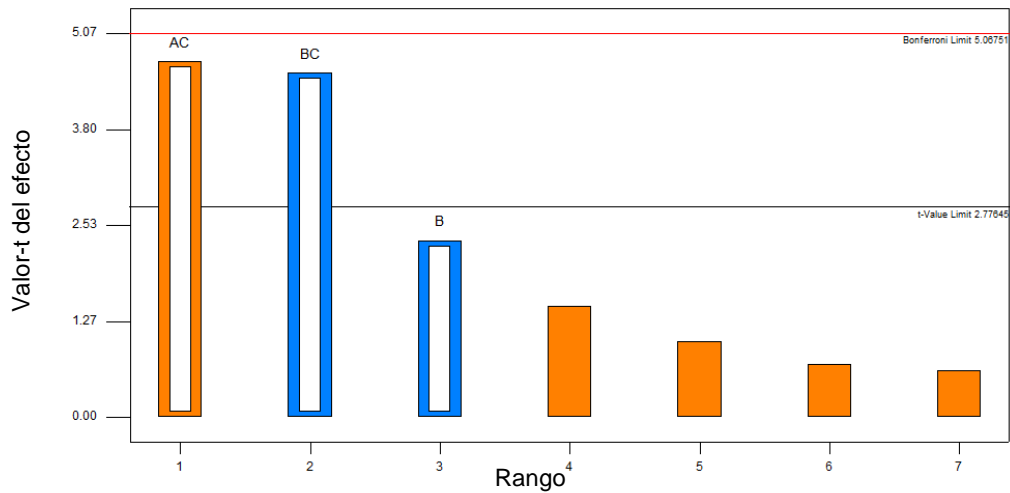
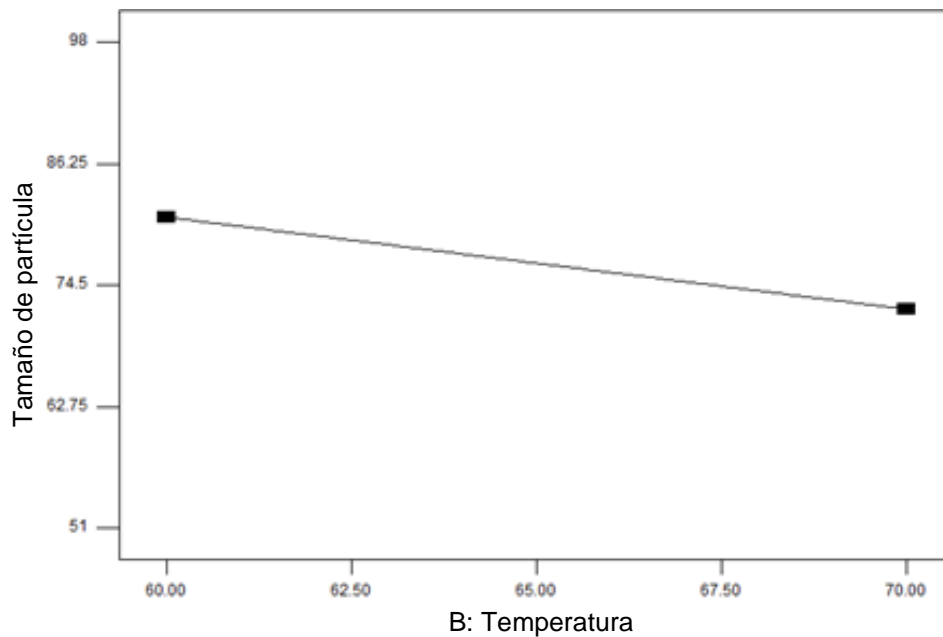
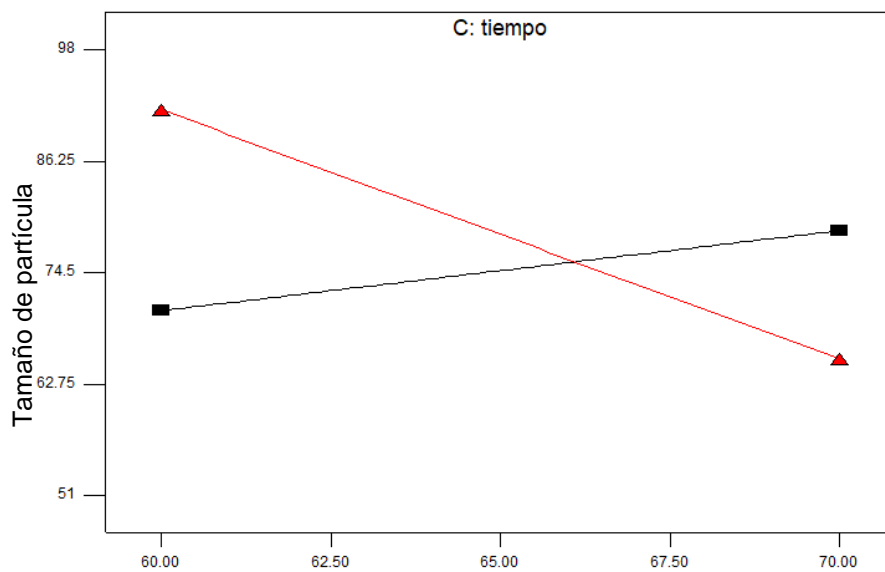
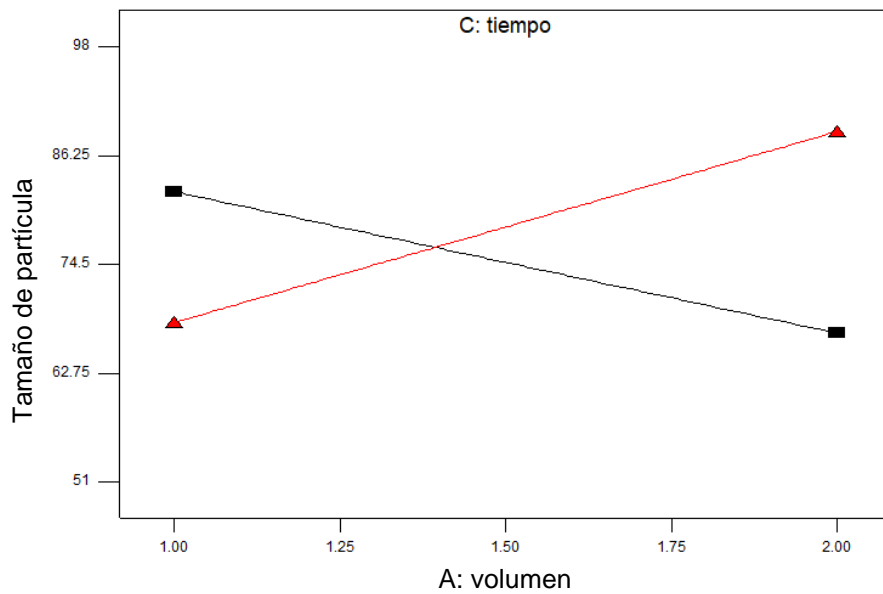


Figura 10 Diagrama de Efectos de Pareto para el monitoreo de la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Los efectos principales y de interacción presentes en el sistema pueden observarse en la figura 11. A medida que la pendiente sea mayor, es decir, que la diferencia entre el nivel bajo y alto sea más grande, el efecto del factor sobre la respuesta será más influyente. Si se observa la interacción de los factores volumen-tiempo, se puede concluir que a menor tiempo y mayor volumen de extracto acuoso son las condiciones en donde se obtendrán partículas con un menor tamaño de partícula. Y para la interacción tiempo-temperatura se concluye que a mayor temperatura y menor tiempo se favorecen las condiciones de reacción y la respuesta tiende a ser menor. Se debe de tener en cuenta que estos efectos son representativos para los intervalos establecidos para cada uno de los factores monitoreados en este estudio.





B: Temperatura

Figura 11 Efecto de los factores e interacciones en el diseño experimental de monitoreo de la síntesis de nanopartículas de plata

5.7. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DIFERENTES FUENTES DE ENERGÍA

5.7.1. ANÁLISIS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

Los experimentos fueron diseñados y analizados en el software estadístico Design-Expert versión 7.0.0. Se utilizó un Diseño Experimental Box-Behnken (DBB), con 17 experimentos para cada tipo de energía empleada con el fin de evaluar el efecto de los factores sobre el tamaño de partícula, conteniendo cinco puntos centrales para cada diseño experimental.

En la tabla 17 se observan los tamaños de partícula promedio de las nanopartículas de plata por diferentes tipos de energía: 50.99 a 79.89 nm, 100 a 114 nm y 64.48 a 118.9 nm para calor convencional, irradiación con microondas y luz infrarroja respectivamente⁶. Como se puede observar en la tabla 17 existen diferencias en la respuesta debido al tipo de energía empleada para la obtención de nanopartículas de plata dado que cada una de éstas actúa de diferente manera en la estructura de la materia⁷.

Tabla 17 Datos experimentales de cada tipo de energía empleada en la obtención de nanopartículas de plata

Tipo de energía	Tamaño de partícula (nm)
Calentamiento convencional	50.99 a 79.89
Irradiación con Microondas	100 a 114
Luz infrarroja	64.48 a 118.9

Las microondas se generan por ondas de radio de alta frecuencia, normalmente oscilan en un intervalo de 300 MHz a 30 GHz (**Correa Cuevas & Hernández Baltazar, 2011**). La irradiación con microondas es empleada como una fuente de calor que proporciona energía para completar procesos, este tipo de radiación se considera como no ionizante, debido a que no contiene suficiente energía para provocar cambios químicos en los compuestos, además el calentamiento por microondas permite el ahorro de tiempo y consumo de energía. En el presente estudio las microondas actúan principalmente sobre las moléculas de agua provocando un calentamiento instantáneo debido a que las moléculas de agua intentan alinearse con el campo eléctrico, el calor generado es la consecuencia del movimiento y fricción entre las moléculas originando la transferencia de energía. Con base a los resultados obtenidos con este método de síntesis (100 a 114 nm) no fue un tipo de energía conveniente para la obtención de nanopartículas de plata, debido al incremento rápido de temperatura la nanopartícula no alcanza el estado de estabilización, por lo que conduce a un incremento en el tamaño de partícula. El incremento del tamaño de partícula es atribuido a la formación de agregados hecho que se demostró por la observación de un polvo fino color rojo en las paredes del vaso donde se llevó a cabo la reacción.

La luz infrarroja es un tipo de radiación que forma parte del espectro electromagnético, tiene una mayor longitud de onda que la radiación visible, pero a su vez es menor que la radiación de microondas. El fundamento de la radiación infrarroja radica en que las moléculas tienen frecuencias a las cuales pueden rotar y vibrar. La transferencia de calor se origina por la rotación bipolar y vibracional de las moléculas polares presentes en el sistema, esto hace que el sistema incremente su temperatura en un tiempo más corto. Con base en los resultados obtenidos mediante este tipo de energía fueron más favorables en comparación del método de Microondas. Sin embargo, los tamaños de partícula oscilan entre 64.48 a 118.9 nm, por lo tanto, no cumplen con la especificación, "**menor a 100 nm**". El incremento de tamaño se debe a la formación de agregados, hecho que también se demostró por la formación de un polvo fino color rojo en las paredes del matraz en donde se llevó a cabo la reacción.

Finalmente, la fuente de energía que presentó mejores resultados y que se encuentra dentro de la especificación "**menor a 100 nm**" fue el método asistido por calentamiento convencional, en donde, los mecanismos de calentamiento son por conducción, es decir, que la transferencia de calor se realiza a

⁶ Los diseños experimentales de optimización en términos actuales y datos del análisis de ANOVA para cada método de síntesis se encuentran en el anexo III y IV respectivamente.

⁷ Las fotografías de soluciones coloridas de nanopartículas de plata de cada método de síntesis empleado se encuentran en el anexo V.

través de una parrilla que por contacto directo con el sistema se puede controlar la cinética de formación de nanopartículas de plata, así como su tamaño (50.99 a 79.89) nm y forma.

5.7.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL MÉTODO DE CALENTAMIENTO CONVENCIONAL

Tabla 18 Datos estadísticos del método de calentamiento convencional

Término	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-value	P-value	
Modelo	803.79	9	89.31	5.88	0.0146	Significativo
V	495.81	1	495.81	32.64	0.0007	
T	37.54	1	37.54	2.47	0.1599	
t	24.47	1	24.47	1.61	0.245	
VT	43.16	1	43.16	2.84	0.1357	
Vt	1.28	1	1.28	0.084	0.7803	
Tt	0.38	1	0.38	0.025	0.8791	
V ²	63.38	1	63.38	4.17	0.0804	
T ²	52.83	1	52.83	3.48	0.1044	
t ²	93.71	1	93.71	6.17	0.042	

Montgomery, (2004) considera que una prueba de hipótesis estadística es un enunciado o una afirmación ya sea acerca de los parámetros de distribución de probabilidad o de un modelo. A continuación, se plantean una serie de hipótesis para la falta de ajuste al modelo y si los factores tienen efecto sobre la respuesta (tamaño de partícula).

H₀: Hay ajuste al modelo

H₁: No hay ajuste al modelo

El criterio de decisión es el siguiente:

Cuando el valor de significancia $\alpha=0.05$

Se acepta H₀ si la $p<0.05$.

De acuerdo con Ekpenyong, Antai, Asitok, & Ekpo, (2017) establecen que un valor de “p” mayor al nivel de significancia (0.05) es la adecuada para la falta de ajuste a los datos. Con base al criterio establecido anteriormente, se acepta la hipótesis nula (H₀) y se rechaza la hipótesis alterna (H₁), debido a que el valor de la probabilidad de ANOVA es menor que el valor de p (0.0146<0.05), por lo tanto, el modelo actual tiene un valor de F=5.88 indicando que el modelo cuadrático es significativo con un nivel de confianza del 95 % y, por lo tanto, solo existe un 1.46 % de probabilidad de que el valor de F obtenido pudiera deberse al ruido.

Para analizar el efecto de los factores se consideró el siguiente planteamiento de hipótesis:

H₀: El factor tiene efecto significativo

H₁: El factor no tiene efecto significativo

El criterio de decisión es el siguiente:

Cuando el valor de significancia $\alpha=0.05$

Se acepta H₀ si la $p<0.05$.

Con base en los resultados obtenidos en la tabla 18 se concluye que se acepta la hipótesis nula (H₀) y se rechaza la hipótesis alterna (H₁), para el factor lineal volumen de extracto (mL) y el factor cuadrático t² (tiempo) debido a que sus valores de $p=0.0007<0.05$ y $p=0.042<0.05$ respectivamente, por otra parte, se acepta la hipótesis alterna (H₁) y se rechaza la hipótesis nula (H₀) para los factores lineales temperatura y tiempo, las interacciones de los factores VT (volumen y temperatura), Vt (volumen y tiempo), Tt (temperatura y tiempo) y los términos cuadráticos V² (volumen) y T² (temperatura) debido a que sus valores de probabilidad son mayores a 0.05 indicando que no son significativos en el diseño experimental.

Una prueba de ajuste en ANOVA normalmente suele venir acompañada por un coeficiente de determinación (R²), el cual es un porcentaje de las variaciones en una respuesta que se puede explicar mediante los factores individuales y sus interacciones. Aunado a esto, mide que tan bien se ajusta a una serie de observaciones, es decir, cuanto más cerca está el R² de 1, el ajuste de los datos será mejor. En este estudio, el R²= 0.8832 concuerda con la R² ajustada= 0.7330, para la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calentamiento convencional indica que el modelo experimental es adecuado, con un coeficiente de variación de 5.61% (tabla 19).

Tabla 19 Datos de estadística descriptiva para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calentamiento convencional

C.V. %	5.61
R ²	0.8832
R ² ajustada	0.7330
Precisión	8.8010

La precisión adecuada es uno de los parámetros por los cuales se puede o no navegar por el espacio de un diseño experimental. La precisión adecuada mide la relación de señal / ruido, de acuerdo con Vargas Henríquez, Pedraza Yapes y cols, (2014) para que la relación sea la adecuada debe ser mayor a 4. La relación obtenida en este estudio fue de $8.801>4$ lo que indica que existe una señal adecuada, por lo tanto, este modelo se puede utilizar para navegar por el espacio del diseño experimental para futuros estudios.

La siguiente ecuación polinomial cuadrática en términos actuales muestra la dependencia del tamaño de partícula en función de cada término lineal, interacciones y términos cuadráticos. Esta ecuación que

se muestra enseguida sirve para predecir el tamaño de partícula o los factores que pueden influir en la respuesta.

$$T. \text{ Partícula} = -436.65875 + 108.312V + 20.39345T - 4.66615t - 1.31400VT + 0.075333Vt + 4.1 \times 10^{-3}Tt - 15.519V^2 - 0.14169T^2 + 0.02968t^2 \dots (4)$$

En la ecuación 4 se observa cómo el volumen de extracto y la temperatura aumentan el tamaño de partícula, mientras que el tiempo de reacción lo disminuye. De igual manera las interacciones de VT disminuyen el tamaño de partícula, por otro lado, las interacciones de Vt y Tt tienden a aumentar el tamaño de partícula. Finalmente, los factores cuadráticos V² y T² disminuyen el tamaño de partícula y el t² tiende a aumentar la respuesta en el sistema.

Dado que los factores que afectan el tamaño de partícula; V y el t² resultaron ser significativos, estos términos serán los que permanecerán en una nueva ecuación llamada “ecuación cuadrática reducida”, y los factores que no tienen efecto sobre la respuesta se eliminan, es decir, son los que presentaron un valor de p>0.05 con base a la tabla 18 de ANOVA, la ecuación cuadrática reducida se muestra enseguida en términos actuales (ecuación 5):

$$T. \text{ de partícula} = -436.65875 + 108.312V + 0.02968t^2 \dots (5)$$

5.7.3. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Para comprobar los resultados obtenidos anteriormente mencionados se realizó la repetibilidad del método de síntesis de nanopartículas de plata. En la tabla 20 se muestra la repetibilidad del método de síntesis de AgNP’s asistida por calor convencional, para esto, se realizaron 5 repeticiones en condiciones óptimas (2 mL de extracto vegetal, temperatura de 70°C y un tiempo de reacción de 105 min), obteniendo un tamaño de partícula promedio de 52.68 nm, por lo que se deduce que la metodología propuesta es precisa y a su vez es repetible, obteniendo así un %RSD de 2.05%, es decir, el método puede ser utilizado en futuras investigaciones.

Tabla 20 Repetibilidad del método de síntesis de AgNP’s asistida por calor convencional

No de repetición	Tamaño de partícula (nm)
1	52.75
2	52.51
3	52.11
4	54.45
5	51.59
Prom	52.68
Desv. Est.	1.08
%RSD	2.05

5.8. ESPECTROSCOPIA UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

De acuerdo con Boudjelal, Henchiri, Siracusa, Madani, & Ruberto (2012), la infusión acuosa de marrubio revela la presencia de 15 metabolitos, pertenecientes a la clase de los polifenoles. En especial, siete

flavonoides y ácido clorogénico en pequeñas cantidades. El extracto, además presenta una serie de moléculas complejas derivadas del verbascósido. Entre los flavonoides identificados se encuentra la apigenina y ladaneina y luteolina. En la tabla 21 se muestran las longitudes de onda de las bandas características de algunas de las moléculas identificadas en el extracto acuoso de marrubio y cuyas longitudes de onda se encuentran entre 219 y 350 nm.

Tabla 21 Longitudes de onda de metabolitos presentes en el extracto de marrubio

Metabolito	Longitud de onda (nm)			Referencia
	λ_1	λ_2	λ_3	
Ácido clorogénico	219	243.7	328	Siahpoush, Ghasemi, Shams Ardakani, & Asghari (2011)
Apigenina	270	350	N. A	Grayer, y otros (1996)
Verbascósido	291	329	N. A	Gafner, Wolfender, Nianga, & Hostettmann (1997)
Ladaneina	286	335	N. A	Grayer, y otros (1996)

Estos datos concuerdan con el espectro UV-Vis del extracto acuoso de las hojas de marrubio (figura 12, espectro color azul). El trazo rojo corresponde al espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata, comparándolo con el del extracto acuoso sin reaccionar se observa un ligero desplazamiento batocrómico de 250 (extracto) a 260 nm y desaparición de las bandas entre 275 y 410 nm aproximadamente. Demostrando que los polifenoles que adsorben energía en esa región son parte de las moléculas responsables de la reducción de la Ag^+ a Ag^0 y en el caso de los flavonoides la región del cinamoilo se encuentra aproximadamente a 328 nm, por lo tanto, se sugiere que es la especie química que está reaccionando.

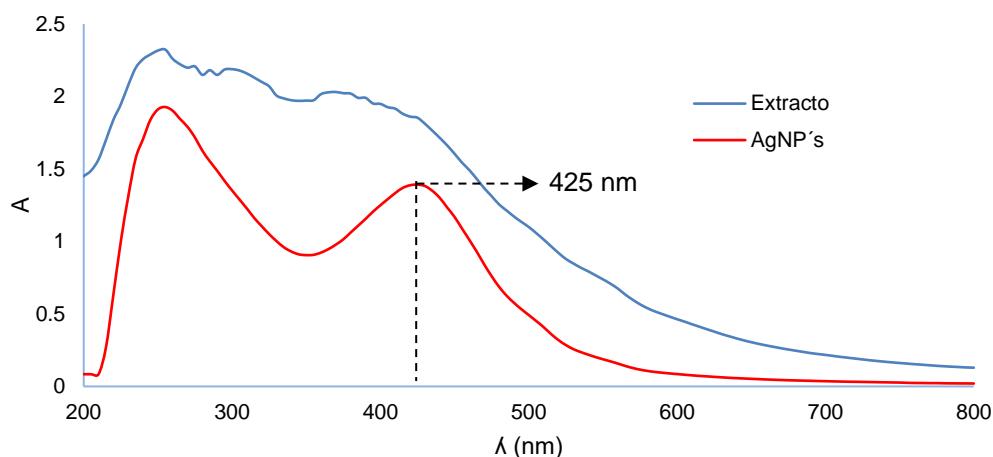


Figura 12 Espectros UV-Vis de extracto acuoso de las hojas de marrubio (azul) y AgNP's (rojo)

5.8.1. EFECTO DEL VOLUMEN DE EXTRACTO

En la figura 13 se muestran una serie de fotografías de soluciones coloridas correspondientes a nanopartículas de plata obtenidas al variar la cantidad de extracto vegetal, manteniendo a una temperatura de 70 °C y un tiempo de reacción de 105 min. En las imágenes de los sistemas con 1, 1.5 y 2.5 mL de extracto adicionado el color de la solución fue café, mientras que para una cantidad de 2 mL de extracto el color fue un rojo ladrillo característico de las nanopartículas de plata.

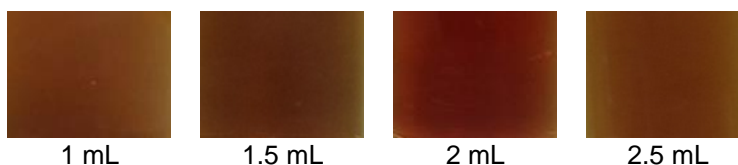


Figura 13 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de AgNP's sintetizadas con diferentes cantidades de extracto acuoso de las hojas de marrubio

Cruz, D. A., y cols, (2011) explican, para que el fenómeno de formación de un plasmón de superficie ocurra el tamaño de la partícula en estudio tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente. La luz incidente produce un dipolo eléctrico en la partícula desplazando los electrones deslocalizados, generando así una carga negativa y como el resto de los núcleos y sus electrones internos no se han desplazado contribuyen a una red catiónica dando estabilización a la nanopartícula. En partículas menores a 30 nanómetros se produce un dipolo, en partículas mayores a 30 nanómetros se produce un cuádruplo y en partículas extremadamente grandes se producen multipolos.

En la figura 14 se observan los espectros UV-Vis de los sistemas anteriormente descritos. Primero se debe de fijar la atención en la banda de 425 nm que está presente en todos los sistemas y que corresponde al plasmón de resonancia superficial, indicativa de la formación de las AgNP's, cuando se aumenta el volumen de extracto hay un incremento en la absorbancia, se podría decir que cuando se incrementa el volumen de extracto hay una mayor cantidad de moléculas con capacidad reductora que pueden producir una mayor concentración de AgNP's, sin embargo, entre 2 y 2.5 mL no se cumple con esto, para que el sistema con 2.5 mL de extracto incremente su absorbancia se necesitaría aumentar el tiempo de reacción.

Un requisito primordial para que la resonancia de plasmón de superficie se presente es que la longitud de la luz que se incide sea mayor que el tamaño de la partícula que recibe el haz de luz. Si hay una disminución en la absorbancia, como aquí se está evidenciando, es debido probablemente a un aumento en el tamaño de partícula, producto de la agregación de las AgNP's, que como se puede observar el color rojizo empieza a desaparecer y el sistema adquiere turbidez, lo que impide el paso libre del haz de luz.

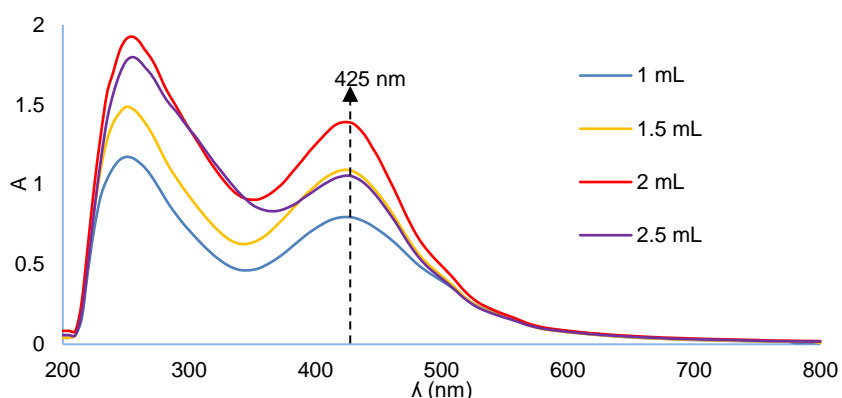


Figura 14 Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)

5.8.2. EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN

En la figura 15 se observa una serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata tomadas a diferentes tiempos (en intervalos de 15 minutos) durante tres horas.

En el transcurso de la reacción se observaron los colores característicos de éstas que van desde un color café (color inicial) pasando por amarillo, marrón, rojo y finalmente un color rojo oscuro, además, se puede observar que conforme avanza el tiempo de reacción el color se intensifica indicando la reducción de Ag^+ a Ag^0 .

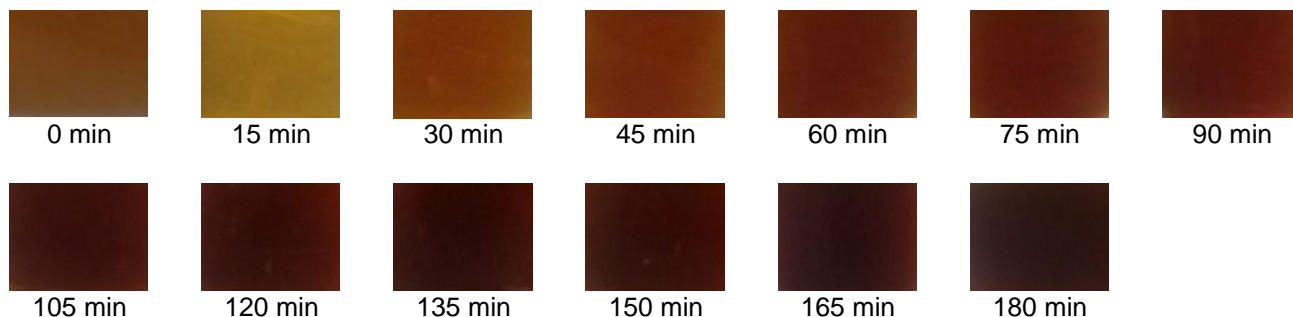


Figura 15 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de AgNP's tomadas a diferentes tiempos

En la figura 16 se presentan los espectros de absorción a diferentes tiempos desde el tiempo 0 hasta 17 horas. En este gráfico se observa un incremento de la absorbancia cuando el tiempo de incubación se prolonga y en consecuencia la concentración de plata coloidal incrementa. La banda de plasmón de resonancia se observó a un tiempo de 15 minutos de reacción en donde se confirma la formación de nanopartículas de plata. Por otra parte, este experimento reveló que la longitud de onda de la banda de plasmón de superficie se presenta entre 415 y 420 nm; dicha banda está presente en un intervalo de tiempo de 1 a 6 horas y cuando alcanza las 17 horas desaparece, producto de la coalescencia de las nanopartículas metálicas observándose un precipitado de color café oscuro en el fondo del matraz.

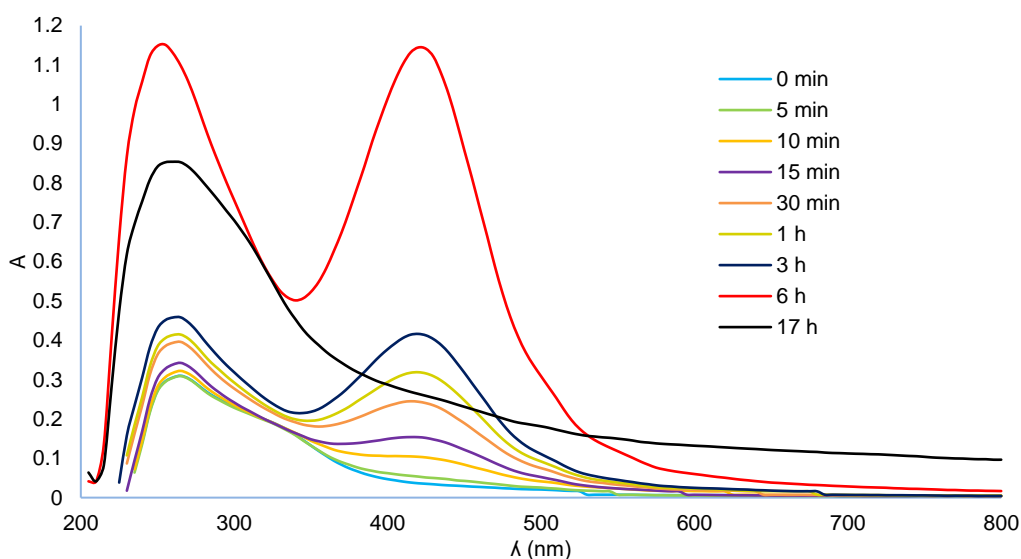


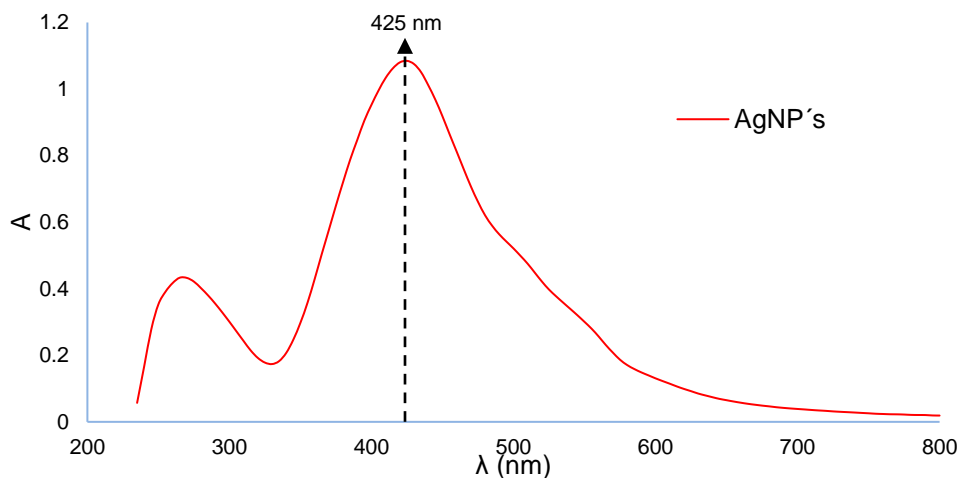
Figura 16 Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)

5.8.3. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS PURAS

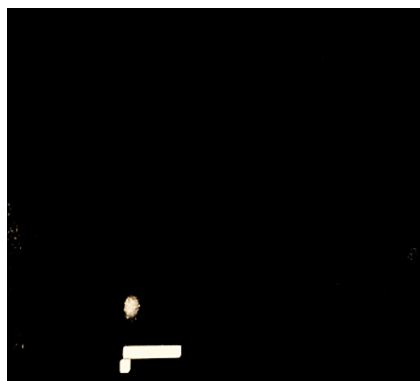
Para obtener las nanopartículas puras fue necesario colocar la suspensión coloidal en una ultracentrífuga a 12500 rpm por 20 minutos. Se retiró el sobrenadante y la suspensión coloidal de plata

obtenida se re-suspendió en 50 mL de agua destilada, observando un color rojo ladrillo característico de las nanopartículas de plata con una concentración de 9.6460×10^{-4} M. Cabe señalar que esta concentración se determinó por el método de Simpson⁸ (área bajo la curva) (anexo V).

En la figura 17a se muestra el espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata puras, en éste, se observan dos bandas; la primera (izquierda a derecha) se asigna a los compuestos fenólicos presentes del extracto acuoso de las hojas de marrubio que se encuentran adsorbidos en la superficie de las nanopartículas de plata y son los responsables de la formación y estabilización de éstas. La segunda banda que es más intensa corresponde al plasmón de resonancia superficial, ésta se encuentra alrededor de 425 nm, si bien los metabolitos secundarios adsorbidos, son los responsables de la estabilidad y carga de las nanopartículas (carga negativa), esta carga evita que se aglomeren y se mantengan a una cierta distancia entre sí mismas. En la figura 17b se muestra la micrografía obtenida por Microscopia Electrónica de Barrido que reveló que las nanopartículas de plata obtenidas son esféricas.



17a



17b

Figura 17 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de plata puras (a) y (b) micrografía de una nanopartícula observada por MEB: 10000x [Fotografía de Alejandra Sánchez, México, 2018, Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Estudios Cuautitlán]

⁸ El desarrollo matemático del método de Simpson se encuentra en el anexo VI.

5.9. ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA PURAS

La estabilidad de las nanopartículas de plata aisladas se estudió durante 28 días obteniendo espectros UV-Vis correspondientes, para lo que se utilizó como blanco una solución de AgNO_3 1 mM, y en el caso de la muestra se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a un aforo de 5 mL con agua destilada. En la figura 18 se observan los espectros UV-Vis correspondientes a 1, 14 y 28 días, observándose que en 14 días alcanza la absorbancia máxima y posterior a ese tiempo disminuye. En cuanto a la longitud de onda se presenta un ligero desplazamiento de 425 nm (día 14) a 420 nm (día 28) disminuyendo el rendimiento de 25.48 a 15.9 %. De acuerdo con los resultados obtenidos la estabilidad de las nanopartículas de plata se encuentra entre 1 y 14 días aproximadamente.

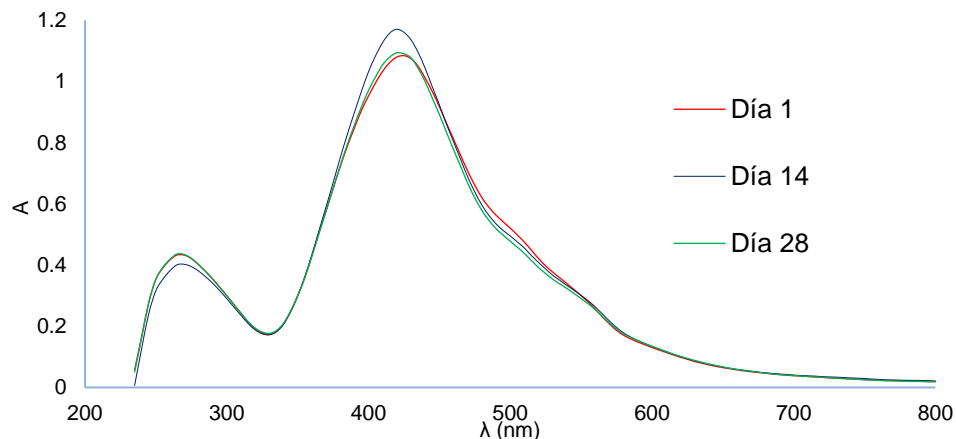


Figura 18 Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata puras para la determinación de estabilidad

5.10. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE MARRUBIO POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Los fenoles y flavonoides son metabolitos secundarios que poseen diversas actividades biológicas como la capacidad antioxidante y antiinflamatoria por mencionar algunas (**Muñoz Velázquez, Rivas y cols, 2012**). Con base en lo anterior se llevó a cabo la determinación de la capacidad reductora del extracto acuoso de las hojas de marrubio y una muestra problema de nanopartículas de plata purificadas. En la figura 19 se muestra la curva de calibración de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) utilizado como estándar, a partir de las lecturas realizadas se obtuvo la siguiente ecuación de línea recta: $y=0.1226x-0.0111$, con un coeficiente de determinación de 0.9915.

Cada muestra se ensayó por triplicado. En el caso del extracto acuoso de las hojas de marrubio se obtuvo un valor de 5.7115 mg Eq de ácido gálico por gramo de planta seca con un porcentaje de capacidad reductora de 0.5945 %. De acuerdo con Muñoz Velázquez, (2012) la yerbabuena presenta un mayor contenido de polifenoles que marrubio ($231.85 > 5.7115$), pero a su vez marrubio presenta una mayor concentración de polifenoles en comparación con el romero ($1.30 < 5.7115$) (tabla 22) Mercado, Gilberto. (2012).

Aunado a lo anterior, también se determinó la capacidad reductora de una muestra problema ensayada por triplicado de una solución de nanopartículas de plata, en este caso se obtuvo un valor de 11.26 mg EAG con un porcentaje de capacidad reductora 1.2231 %, se podría decir que los metabolitos

secundarios presentes en el extracto de las hojas de marrubio quedaron adsorbidos en las nanopartículas de plata, proporcionándole poder reductor a éstas (tabla 23).

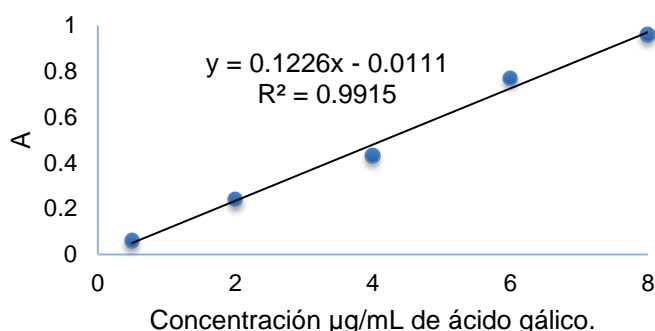


Figura 19 Curva de calibración de ácido gálico

Tabla 22 Contenido de mg de EAG/g Ps de romero, marrubio y yerbabuena.

Planta	Contenido en mg EAG/g Ps	Referencia
romero	1.30 a 1.377	Mercado Mercado, Rosa Carrillo, Wall Medrano, López Díaz, & Álvarez Parrilla (2013)
marrubio	5.7115	N. A
yerbabuena	231.85	Muñoz Velázquez E. (2012)

Tabla 23 Cuantificación de compuestos con capacidad reductora del extracto acuoso de las hojas de marrubio

Muestra	A ₁	A ₂	A ₃	A _{prom}	mg EAG/g Ps	% de capacidad reductora
Extracto acuoso de hojas de marrubio	0.253	0.336	0.25	0.269	5.7115	0.5945
AgNP's	0.266	0.270	0.260	0.265	11.26	1.2231

5.11. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE MARRUBIO, NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SOBRENADANTE

En el espectro infrarrojo (figura 20, 1a) correspondiente al extracto acuoso de las hojas de marrubio se observa la banda en 3714.68 cm^{-1} se puede asignar a la vibración de estiramiento del enlace N-H. A números de onda más bajos se encuentra una banda más ancha con una frecuencia de 2933.18 cm^{-1} que se asigna al enlace C-H tanto de C_{sp^2} , así como de C_{sp^3} . En la zona de enlaces múltiples se observa una banda a 1609.25 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de estiramiento del enlace C=O y flexión tijera del enlace N-H. A números de onda más bajos, en 1400.11 cm^{-1} se presenta una banda que se asigna a la vibración de estiramiento del enlace C-C(=O)-C, C-N y O-H. Finalmente, la banda a 1071.15 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración estiramiento asimétrico del enlace C-O, y en la tabla 24 se observan éstos grupos funcionales con su respectivo valor experimental e intervalo teórico y el tipo de vibración atribuido (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005). Los datos anteriormente mencionados concuerdan con los grupos funcionales de los metabolitos identificados en el análisis fitoquímico; fenoles, taninos, azúcares reductores, compuestos nitrogenados y flavonoides (numeral 5.5), estos datos son consistentes con lo reportado por Boujdjalal y cols, (2012).

Tabla 24 Grupos funcionales identificados en el extracto acuoso de las hojas de marrubio

Grupo funcional identificado	Frecuencia exp. cm^{-1}	Frecuencia reportada en la literatura cm^{-1}	Tipo de Vibración
N-H	3714.68	3500-3250	Estiramiento
C-H (C_{sp^3})	2933.80	2850-3000	Estiramiento
C-H (C_{sp^2})		3000-3100	
C=O	1609.25	1870-1540	Estiramiento
N-H	1609.25	1650-1580	Flexión tijera
C-C(=O)-C	1400.11	1300-1100	Estiramiento y flexión
C-N	1400.11	1342-1266	Estiramiento
O-H	1400.11	1420-1330	Flexión
C-O	1071	1260-1000	Estiramiento

En la figura 20, 2a se muestra el espectro IR correspondiente a las nanopartículas de plata. Los espectros IR del extracto de las hojas de marrubio (figura 20, 1a) y el de las nanopartículas de plata son muy similares, al comparar ambos espectros IR, las bandas del extracto con frecuencias de 1609.25, 1400.11, 1071.15 cm^{-1} se desplazan a números de onda más bajos; 1545.98, 1354.28 y 992.78 cm^{-1} en las nanopartículas de plata, con base a lo anterior, el desplazamiento de los números de onda más bajos se puede atribuir a la presencia de la plata.

En el espectro infrarrojo de las nanopartículas de plata se observa una banda a 3740 cm^{-1} que se asigna a la vibración de estiramiento del enlace N-H. A números de onda más bajos se observa una banda ancha, en 3183.91 cm^{-1} y 2912.71 cm^{-1} son atribuidos a la vibración de estiramiento del enlace C-H pertenecientes a C_{sp^2} y C_{sp^3} respectivamente. En la zona de enlaces múltiples se observa una banda a 1545.48 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración de estiramiento del enlace C=O y la vibración de flexión tijera del enlace N-H. La banda a 1354.38 cm^{-1} se asigna a la vibración de flexión del enlace O-H, estiramiento del enlace C-N, y al estiramiento y flexión del enlace C-C(=O)-C. Finalmente a 992.78 cm^{-1} se asigna a la vibración de estiramiento del enlace C-O y la flexión en el plano del enlace C-H. Con base a lo anterior, en los espectros IR se puede observar que parte de los metabolitos presentes en el extracto de las hojas de marrubio se integraron a las nanopartículas de plata (tabla 25)

Tabla 25 Grupos funcionales identificados en las nanopartículas de plata

Grupo funcional identificado	Frecuencia exp. cm^{-1}	Frecuencia reportada en la literatura cm^{-1}	Tipo de Vibración
N-H	3740.31	3500-3250	Estiramiento
C-H (C_{sp^2})	3183.91	3080-3020	Estiramiento
C-H (C_{sp^3})	2912.71	2970-2950	
C=O	1545.48	1870-1540	Estiramiento
N-H	1545.48	1650-1580	Flexión tijera
O-H	1354.38	1420-1330	Flexión
C-C(=O)-C	1354.38	1300-1100	Estiramiento y flexión
C-N	1354.38	1342-1266	Estiramiento
C-O	992.78	1260-1000	Estiramiento
C-H	992.78	1000-650	Flexión fuera del plano

En la figura (20, 3a) se muestra el espectro infrarrojo del sobrenadante, en éste se observan bandas a frecuencias a 3708.61, 2935.45, 1605.05, 1389.87 y 1064.36 cm^{-1} , acordes con las bandas presentes en el extracto y al comparar los espectros IR se observa un ligero desplazamiento a números de onda más bajos debido a la presencia de los iones de plata (tabla 26).

Tabla 26 Grupos funcionales identificados en el sobrenadante

⁹ Grupo funcional identificado	Frecuencia exp. cm^{-1}	Frecuencia reportada en la literatura cm^{-1}	Tipo de Vibración
N-H	3708.61	3500-3250	Estiramiento
C-H ($\text{C}_{\text{sp}3}$)	2935.45	2850-3000	Estiramiento
C-H ($\text{C}_{\text{sp}2}$)		3000-3100	
C=O	1605.05	1870-1540	Estiramiento
N-H	1605.05	1650-1580	Flexión tijera
O-H	1389.87	1420-1330	Flexión
C-N	1389.87	1342-1266	Estiramiento
C-C(=O)-C	1389.87	1300-1100	Estiramiento y flexión
C-O	1064.36	1260-1000	Estiramiento

5.12. APLICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PELÍCULAS COMESTIBLES

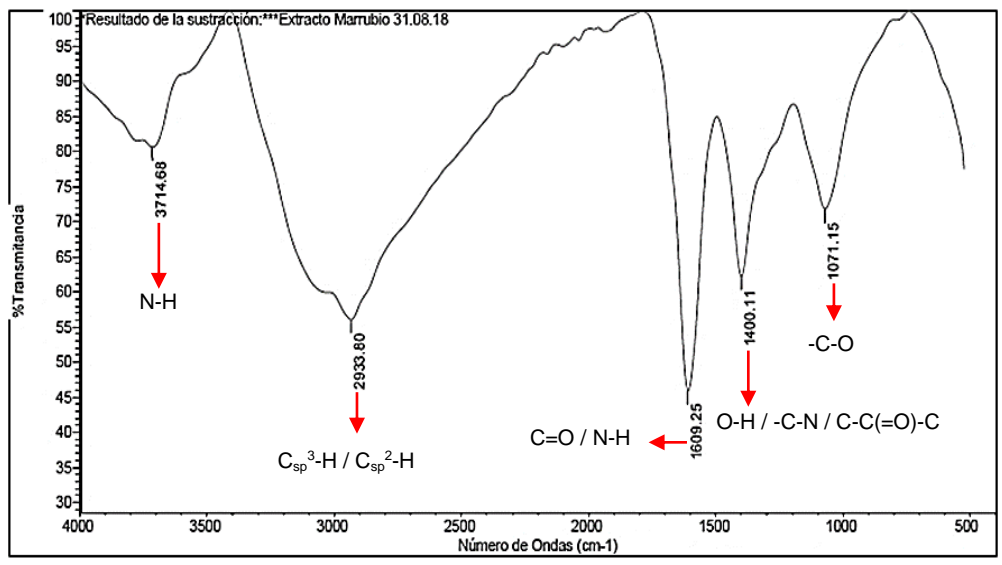
El recubrimiento comestible se obtuvo utilizando la formulación mostrada en la tabla 27 preparando la cantidad suficiente para todo el experimento. Posteriormente se colocaron trozos de manzana en tres lotes; recubrimiento con AgNP's, sin recubrimiento y recubrimiento sin AgNP's.

Tabla 27 Formulación utilizada para la obtención de películas comestibles

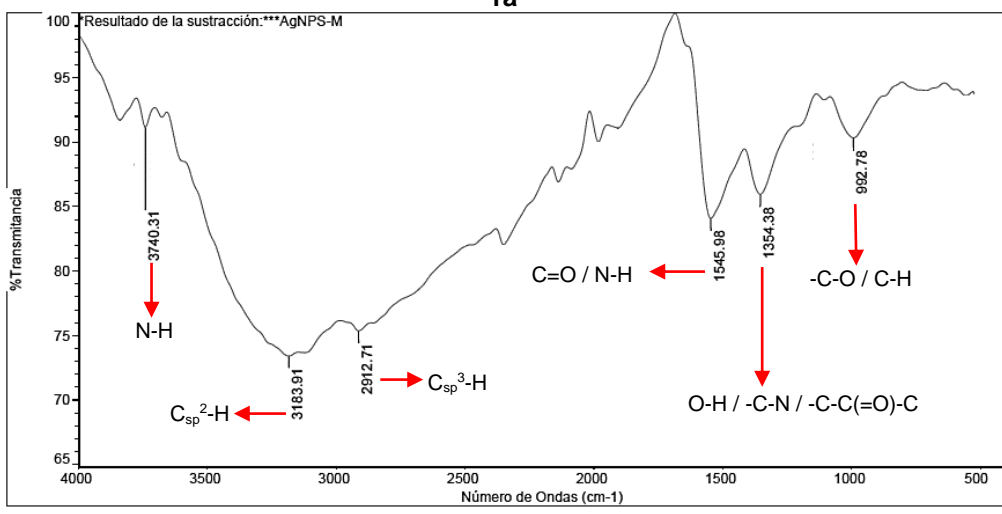
Compuesto	Peso (g)
Alginato de sodio	2
Tween 60	0.5

La película que se obtuvo con la formulación anteriormente mencionada presentó las siguientes características mediante un análisis visual y al tacto: flexibilidad, con textura, rigidez y adherencia. A la formulación se le adicionaron 25 mL de una solución de nanopartículas de plata en una concentración de 16.6270 ppm, obteniendo una película transparente con una coloración ligeramente naranja. Posteriormente se procedió a cubrir trozos de manzana con las películas. Se mantuvieron en observación durante 7 días buscando cambios en la coloración y pérdida de peso.

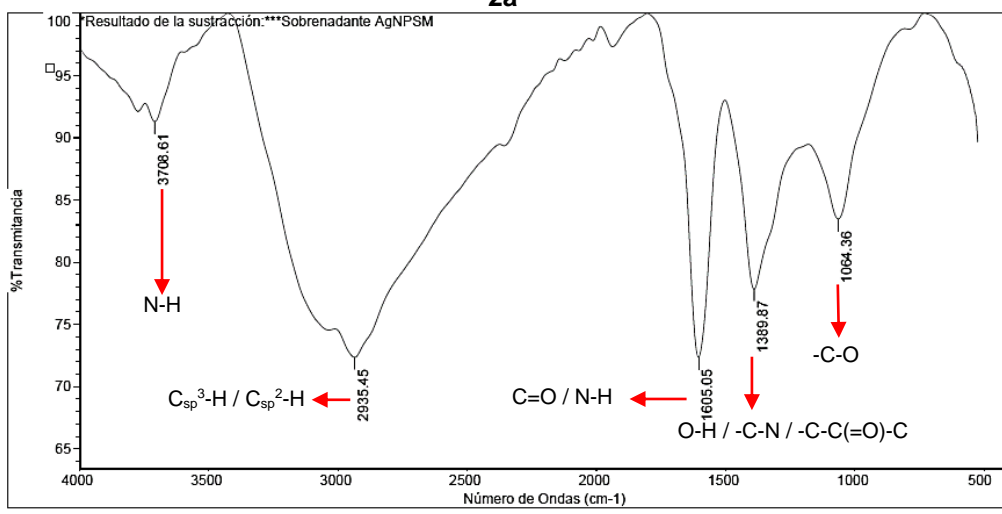
⁹ En los espectros infrarrojo del extracto acuoso de las hojas de marrubio, AgNP's y sobrenadante aparece una señal en aproximadamente 3100 cm^{-1} es asignada la vibración de estiramiento del enlace O-H de la molécula de agua presente en las muestras anteriormente mencionadas.



1a



2a



3a

Figura 20 Espectro infrarrojo del extracto acuoso de las hojas de marrubio (1a), nanopartículas de plata (2a) y sobrenadante (3a)

En la figura 21 se muestra la gráfica de pérdida de peso para dos muestras de trozos de manzana; uno con recubrimiento (color rojo) y el otro en ausencia de recubrimiento (color verde), se puede observar que la manzana con recubrimiento con nanopartículas de plata tuvo una mayor pérdida de peso en comparación con la manzana control.

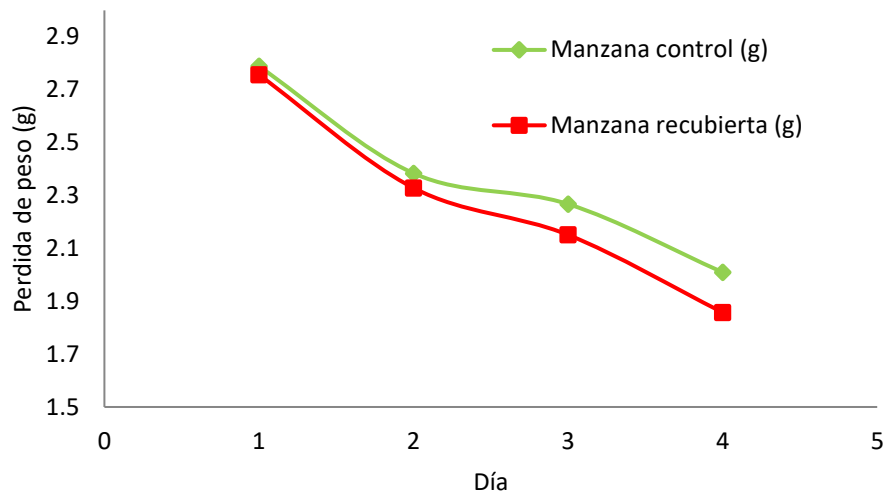


Figura 21 Pérdida de peso (g) de trozos de manzana recubiertos (rojo) y trozo de manzana control (verde)

Como se puede observar en la figura 22 (después de 7 días) los tres trozos de manzana cambiaron de color, es decir, sufrieron una oxidación. Sin embargo, al comparar los dos trozos de manzana cubiertos por la película, con la que no contiene nanopartículas de plata en su formulación, presenta una menor coloración en comparación de la que sí contiene nanopartículas de plata.

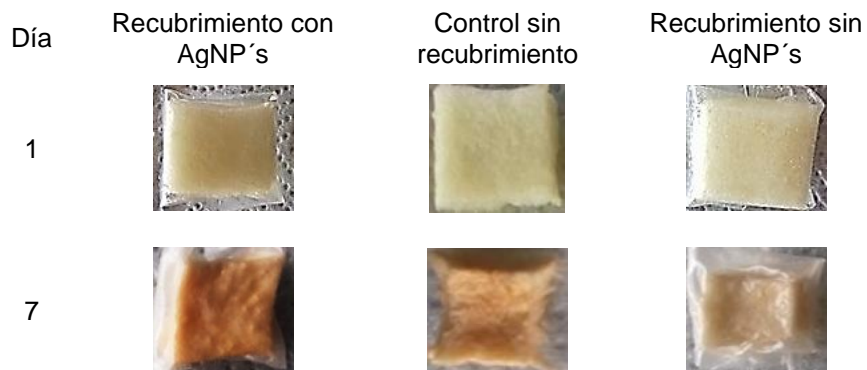


Figura 22 Serie de fotografías correspondientes a la aplicación de nanopartículas de plata en recubrimientos comestibles

A continuación, se planteará una hipótesis que puede explicar los resultados obtenidos:

Cambio de coloración en trozos de manzanas. El cambio de color puede ser el resultado de una catálisis de la reacción de conversión de polifenoles en quinonas. Primero se observa que todos los trozos de manzana se oxidaron (con recubrimiento con AgNP's, sin recubrimiento y con

recubrimiento en ausencia de AgNP's), por lo que el análisis se centrará en los que se involucraron con los recubrimientos.

Como se observa en la figura 22 los dos trozos de manzana cambiaron de color, por lo que existe la posibilidad de que los recubrimientos no actuaron como una barrera contra el aire, con este hecho se puede plantear lo siguiente: la enzima polifenoloxidasas (PPO) es la responsable del oscurecimiento en las manzanas, siendo una enzima que tiene dos sitios de unión; uno es asignado para compuestos aromáticos como los "fenólicos" y el segundo le corresponde al oxígeno. La polifenoloxidasas transfiere oxígeno y cataliza la oxidación de los fenoles a quinonas, causantes del oscurecimiento de las manzanas (ver figura 23) **(Worthington Biochemical, 2018)**.

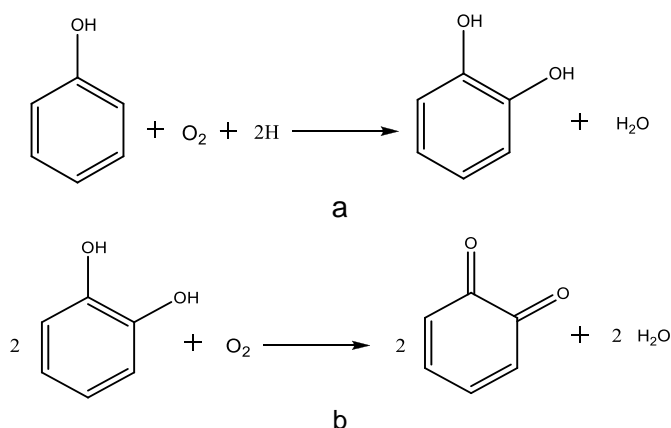


Figura 23 Oxidación de fenoles a quinonas

Dado que el trozo de manzana cubierto con la película con AgNP's sufrió una oxidación mayor, se considera que la plata está actuando como un catalizador ya que en su superficie metálica se adsorbe oxígeno molecular y en consecuencia puede oxidar a los compuestos fenólicos presentes en la superficie de la manzana. Este fenómeno se puede atribuir al tamaño de la nanopartícula y a la gran superficie de contacto (figura 24) **(Weissermel & Arpe, 1981)**.

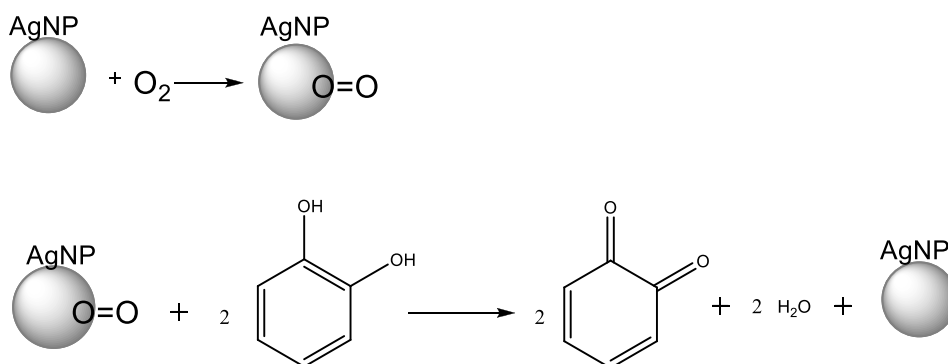


Figura 24 Reacción de fenoles a quinonas en presencia de nanopartículas de plata

En cuanto a la pérdida de peso, las manzanas son frutos vivos que después de ser recolectados respiran, es decir, toman el oxígeno del aire y eliminan CO₂. La respiración va acompañada de la pérdida de agua por transpiración de las células y un marchitamiento de los frutos. Si las

nanopartículas de plata fueron capaces de adsorber oxígeno en su superficie, entonces se catalizó la transpiración y por tanto la pérdida de peso fue evidente.

6 CONCLUSIONES

- Se realizó la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata empleando como agente reductor el extracto acuoso de las hojas de marrubio asistida por calor convencional utilizando un Diseño de Experimentos tipo Box-Behnken, obteniendo los factores que influyen en el tamaño de partícula los cuales son: la cantidad de extracto (mL) y el tiempo de reacción (t^2).
- Se evaluaron las partes aéreas de marrubio, pericón, Sta. María, ruda y semillas de chía empleando el extracto acuso como agente reductor para la obtención de nanopartículas de plata, de las cuales se seleccionó el marrubio para el monitoreo y optimización para la síntesis de nanopartículas de plata.
- Se recolectó y herborizó un ejemplar de la especie vegetal seleccionada, que fue entregado al Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y quedando bajo resguardo con el número 2517 IZTA, cuyo nombre científico es "*Marrubium vulgare* L.", conocido comúnmente como "marrubio", perteneciente a la familia Lamiaceae.
- Se realizó el tamizaje fitoquímico preliminar al extracto acuoso de las hojas de marrubio en el cual se encontraron los siguientes grupos químicos: agrupamientos lactónicos, fenoles/taninos, flavonoides, azúcares reductores y compuestos nitrogenados.
- Se optimizó y se seleccionó la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional, debido a que cumple con una buena precisión adquirida y presenta un coeficiente de determinación adecuado (R^2) de 0.8832. Este tipo de fuente de energía influye en el tamaño y forma de la nanopartícula dado que la cinética de formación de éstas es mucho más lenta que en microondas y luz infrarroja.
- La espectroscopia UV-Vis y la DLD (Dispersión de Luz Dinámica) revelaron que las nanopartículas de plata obtenidas presentan un plasmón de superficie a 425 nm con un tamaño de partícula promedio de 52.68 nm, respectivamente y mediante MEB se observó que tienen forma esférica. Así mismo, la espectroscopia infrarroja reveló que los metabolitos presentes en el extracto acuoso de las hojas de marrubio quedaron adsorbidos en la superficie de las nanopartículas de plata.
- Se determinó que las nanopartículas de plata no pueden ser utilizadas en la incorporación de recubrimientos comestibles para alimentos, debido a que posiblemente catalicen reacciones de oxidación y provoquen la senescencia del fruto más rápido.

7 PROSPECTIVAS

- Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de la especie vegetal *Marrubium vulgare L.* mediante electroforesis capilar.
- Determinar la actividad biológica del extracto acuoso de las hojas y nanopartículas de plata obtenidas a partir de la especie vegetal *Marrubium vulgare L.*
- Obtener nanopartículas de plata a partir de los diferentes extractos (hexano, acetato de etilo y etanol) de las hojas de la especie vegetal *Marrubium vulgare L.* y caracterizarlas por espectroscopia UV-Vis, Dispersión de Luz Dinámica, espectroscopia infrarroja y Microscopia Electrónica de Barrido.
- Sintetizar nanopartículas de plata empleando las condiciones obtenidas en éste trabajo de investigación y aplicarlas en una reacción de oxidación.

8 ANEXOS

I. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA
HERBARIO IZTACALA



FESI/HI/028/2016

LUIS ANGEL FLORES LINARES

Alumno de la Carrera de Química,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
P r e s e n t e

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del Proyecto de Tesis de Licenciatura “Optimización del método de síntesis de nanopartículas de plata, usando como agente reductor el extracto acuoso de *Marrubium vulgare* L. (LAMIACEAE) (Marrubio) utilizada en la medicina tradicional mexicana”, que se realiza en el Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez.

Así mismo, le informo que la planta ha sido integrada en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

Nombre Científico	Familia Botánica	Nombre Popular	No. de Registro
<i>Marrubium vulgare</i> L.	LAMIACEAE	“Marrubio”	2517 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Los Reyes Iztacala, Estado de México, 4 de agosto 2016

M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILAFRANCO
Responsable del Herbario IZTA



C.c.p.- Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez
Directora de Tesis, FES Cuautitlán, UNAM

II. MONITOREO PARA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR CALOR CONVENCIONAL

Tabla 28 Diseño experimental para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Exp	V (ml)	T (°C)	t (min)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Tabla 29 Diseño experimental de monitoreo para la obtención de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Exp	V (mL)	T (°C)	t (min)	Tamaño de Partícula (nm)
1	-1	-1	-1	76.49
2	1	-1	-1	64.47
3	-1	1	-1	88.18
4	1	1	-1	69.67
5	-1	-1	1	85.30
6	1	-1	1	98.00
7	-1	1	1	51.13
8	1	1	1	79.66

III. DISEÑOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DIFERENTES TIPOS DE ENERGÍA.

Tabla 30 Diseño experimental en términos codificados Box-Behnken para calentamiento convencional

Exp	V (mL)	T (°C)	t (min)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabla 31 Diseño experimental de optimización de síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Exp	V (mL)	T (°C)	t (min)	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	60	105	69.16	0.283
2	2	60	105	53.47	0.438
3	1	70	105	79.82	0.225
4	2	70	105	50.99	0.433
5	1	65	90	75.69	0.264
6	2	65	90	65.33	0.357
7	1	65	120	76.78	0.253
8	2	65	120	68.68	0.287
9	1.5	60	90	67.59	0.336
10	1.5	70	90	71.55	0.268
11	1.5	60	120	71.75	0.244
12	1.5	70	120	76.94	0.234
13	1.5	65	105	69.63	0.287
14	1.5	65	105	70.94	0.243
15	1.5	65	105	74.26	0.244
16	1.5	65	105	68.67	0.267
17	1.5	65	105	70.41	0.263

Tabla 32 Diseño experimental en términos codificados Box-Behnken para irradiación con microondas

Exp	V (mL)	P (w)	t (s)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabla 33 Diseño experimental de optimización de síntesis de nanopartículas de plata asistida por microondas

Exp	V (mL)	P (W)	t (s)	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	30	250	141.7	0.181
2	2	30	250	100.0	0.402
3	1	50	250	174.8	0.328
4	2	50	250	127.6	0.271
5	1	40	200	114.6	0.381
6	2	40	200	120.8	0.328
7	1	40	300	129.9	0.263
8	2	40	300	142.4	0.272
9	1.5	30	200	147.2	0.207
10	1.5	50	200	162.5	0.280
11	1.5	30	300	149.0	0.291
12	1.5	50	300	117.3	0.252
13	1.5	40	250	148.7	0.324
14	1.5	40	250	145.7	0.316
15	1.5	40	250	142.5	0.250
16	1.5	40	250	140.0	0.363
17	1.5	40	250	133.2	0.284

Tabla 34 Diseño experimental en términos codificados Box-Behnken para irradiación infrarroja

Exp	V (mL)	Voltaje (%V)	t (min)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabla 35 Diseño experimental de optimización de síntesis de nanopartículas de plata asistida por luz infrarroja

Exp	V (mL)	Voltaje (%V)	t (min)	Tamaño de partícula (nm)	PD
1	1	30	23	67.30	0.297
2	2	30	23	64.48	0.397
3	1	50	23	118.9	0.452
4	2	50	23	119.0	0.322
5	1	40	15	98.25	0.348
6	2	40	15	77.09	0.262
7	1	40	31	100.8	0.253
8	2	40	31	74.20	0.373
9	1.5	30	15	109.3	0.378
10	1.5	50	15	93.99	0.349
11	1.5	30	31	84.00	0.259
12	1.5	50	31	94.79	0.292
13	1.5	40	23	87.91	0.336
14	1.5	40	23	92.67	0.390
15	1.5	40	23	116.5	0.450
16	1.5	40	23	86.07	0.233
17	1.5	40	23	96.21	0.349

IV. ANÁLISIS ANOVA PARA LOS MÉTODOS UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DIFERENTES TIPOS DE ENERGÍA.

Tabla 36 Datos estadísticos de análisis de varianza (ANOVA) para la síntesis de nanopartículas de plata asistida por calor convencional

Análisis de Varianza (ANOVA)						
Termino	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Value	p-Value Prob>F	
Modelo	803.79	9	89.31	5.88	0.0146	significativo
A-V	495.81	1	495.81	32.64	0.0007	
B-T	37.54	1	37.54	2.47	0.1599	
C-t	24.47	1	24.47	1.61	0.245	
AB	43.16	1	43.16	2.844	0.1357	
AC	1.28	1	1.28	0.084	0.7803	
BC	0.38	1	0.38	0.025	0.8791	
A ²	63.38	1	63.38	4.17	0.0804	
B ²	52.83	1	52.83	3.48	0.1044	
C ²	93.71	1	93.71	6.17	0.042	
Residual	106.32	7	15.19			
Falta de ajuste	88.27	3	29.42	6.52	0.0509	no significativo

Tabla 37 Datos estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) para el método de síntesis de nanopartículas de plata asistida por microondas

Análisis de Varianza (ANOVA)						
Termino	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Value	p-Value Prob>F	
Modelo	2163.5	9	240.39	0.54	0.8109	no significativo
A-V	616	1	616	1.37	0.2793	
B-P	245.31	1	245.31	0.55	0.4834	
C-t	5.28	1	5.28	0.012	0.9166	
AB	7.56	1	7.56	0.017	0.9003	
AC	9.92	1	9.92	0.022	0.8859	
BC	552.25	1	552.25	1.23	0.3036	
A ²	560.24	1	560.24	1.25	0.3004	
B ²	129.23	1	129.23	0.29	0.6079	
C ²	53.36	1	53.36	0.12	0.7402	
Residual	3136.55	7	448.08			
Falta de ajuste	2996.28	3	998.76	28.48	0.0037	significativo

Tabla 38 Datos estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) para la síntesis de nanopartículas de plata asistida por luz infrarroja

Análisis de Varianza (ANOVA)						
Termino	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Value	p-Value Prob>F	
Modelo	2051.08	9	227.9	0.65	0.7316	no significativo
A-V	318.53	1	318.53	0.91	0.3721	
B-Voltaje	1290.32	1	1290.32	3.68	0.0964	
C-t	77.13	1	77.13	0.22	0.6532	
AB	2.13	1	2.13	0.006	0.94	
AC	7.4	1	7.4	0.021	0.8885	
BC	170.3	1	170.3	0.49	0.5023	
A^2	136.49	1	136.49	0.39	0.5523	
B^2	21.16	1	21.16	0.06	0.8129	
C^2	28.32	1	28.32	0.081	0.7844	
Residual	2452.04	7	350.29			
Falta de ajuste	1856.69	3	618.9	4.16	0.1011	no significativo

V. FOTOGRAFÍAS DE SOLUCIONES COLORIDAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR DIFERENTES TIPOS DE ENERGÍA.

A) SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS ASISTIDA POR CALENTAMIENTO CONVENCIONAL

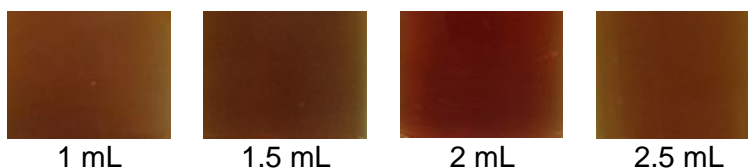


Figura 25 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)



Figura 26 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la temperatura)

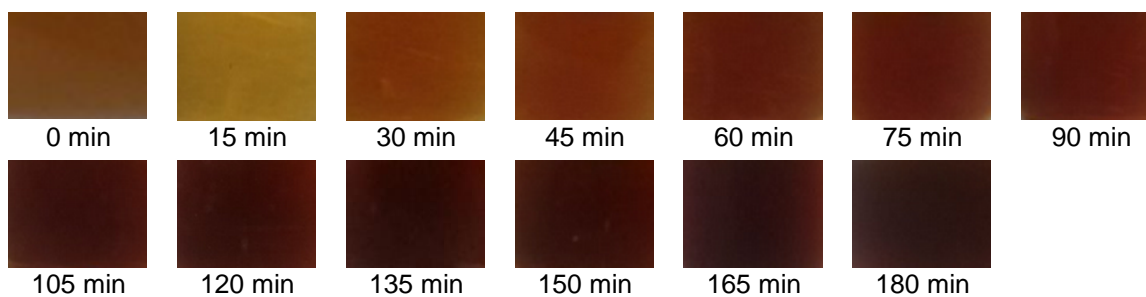


Figura 27 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)

B) SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS ASISTIDA POR IRRADIACIÓN CON MICROONDAS

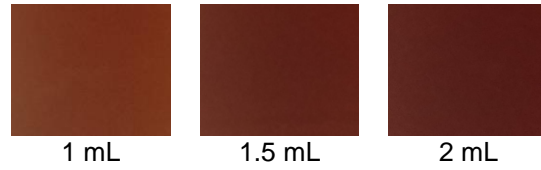


Figura 28 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)

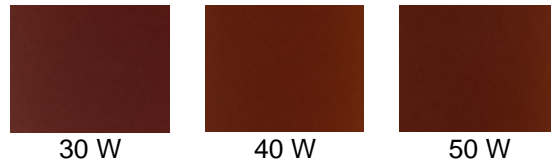


Figura 29 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la potencia)

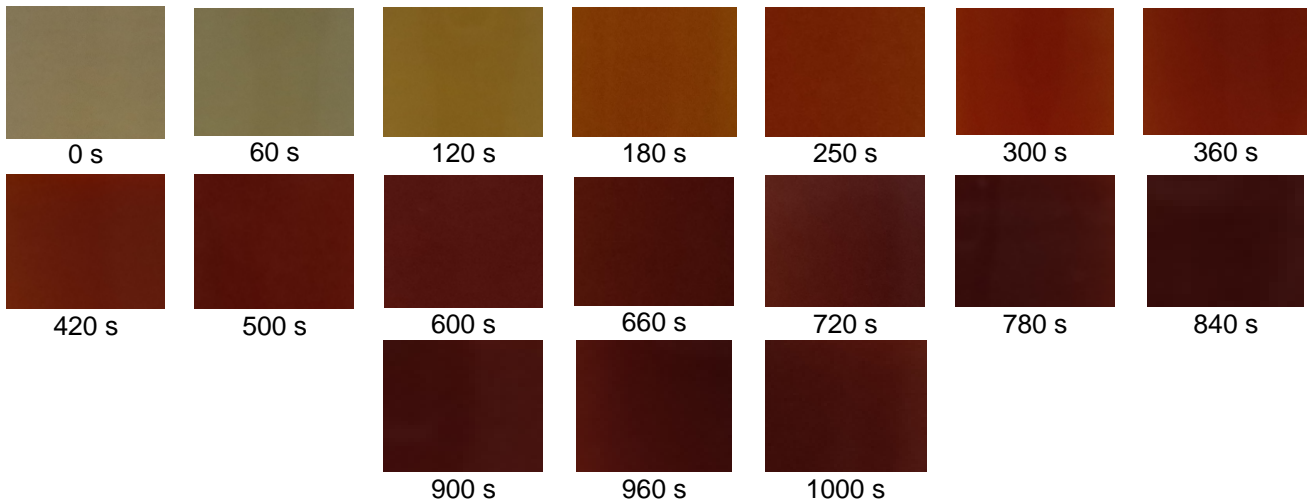


Figura 30 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)

C) SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS ASISTIDA POR IRRADIACIÓN INFRARROJA



Figura 31 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto de la cantidad de extracto)

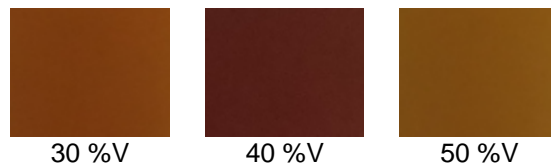


Figura 32 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del porcentaje del voltaje)

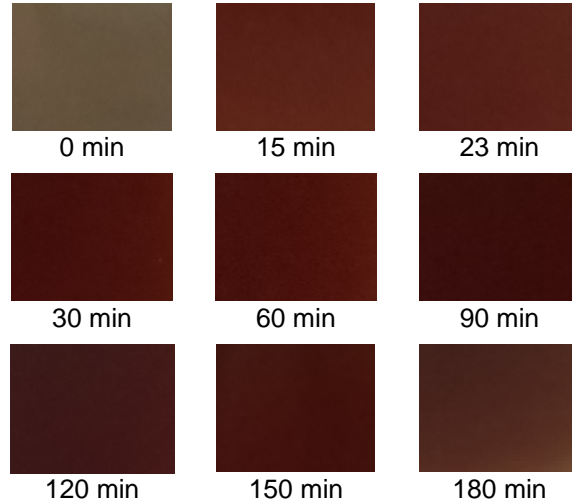


Figura 33 Serie de fotografías correspondientes a soluciones coloridas de nanopartículas de plata (efecto del tiempo de reacción)

VI. CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA METODOLOGÍA DE SIMPSON

$$dx = \frac{425 - 330}{1} = 95, \quad h = \frac{95}{2} = 47.5 \quad y \quad y_1 = 330 + 47.5 = 377.5$$

$$\int_{330}^{425} \text{sen } x \, dx = \frac{47.5}{3} [\text{sen } 330 + 4\text{sen } 377.5 + \text{sen } 425] = 25.48 \text{ U}^2 \text{ o } 25.48 \%$$

$$43.4 \text{ mgAgNO}_3 \left(\frac{37 \text{ mL}}{250 \text{ mL}} \right) = 6.4232 \text{ mgAgNO}_3$$

$$6.4232 \text{ mgAgNO}_3 \text{ RA} \left(\frac{100 \text{ mg AgNO}_3 \text{ RP}}{98 \text{ mg AgNO}_3 \text{ RA}} \right) \left(\frac{1 \text{ mmol AgNO}_3}{169.87 \text{ mg AgNO}_3 \text{ RP}} \right) \left(\frac{1 \text{ mmol Ag}^0}{1 \text{ mmol AgNO}_3} \right) \left(\frac{107.8682 \text{ mg Ag}^0}{1 \text{ mmol Ag}^0} \right) = 4.1620 \text{ mg Ag}^0$$

$$4.1620 \text{ mg Ag}^0 \left(\frac{25.28}{100} \right) = 1.0405 \text{ mg Ag}^c$$

$$1.0405 \text{ mg Ag}^0 \left(\frac{5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1}{50 \text{ mL}} \right) = 0.10405 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ mg Ag}^c$$

$$0.10405 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Ag}^c \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 104.05 \text{ ppm}$$

VII. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de Na_2CO_3 al 20%. Se pesan aproximadamente 5 gramos de carbonato de sodio y se disuelven en 25 mL de agua destilada.

Solución stock de ácido gálico 0.1 mg/mL. Se pesan 21.9 mg de ácido gálico, se disuelven en 10 mL de agua destilada, de esta solución se toman 456 μL y se aforan a 10 mL con agua destilada.

NOTA: Después de adicionar el reactivo de Folin-Ciocalteu se agitó cada sistema con un vortex durante un minuto y se dejó reposar por 8 minutos. Inmediatamente se añadió una solución acuosa de Na_2CO_3 al 20 % y se agitó por un minuto. Terminado el tiempo de agitación los sistemas se llevaron a un aforo

de 10 mL con agua destilada. Los sistemas se dejaron reposar durante 30 minutos protegido de la luz. De acuerdo con Medina, y otros, (2009) se midió la absorbancia de cada sistema a una longitud de onda de 765 nm.

VIII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS UTILIZADOS EN EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Bornträger. Se toma una porción del residuo y se disuelve en 1 mL de cloroformo, posteriormente se agrega 1 mL de hidróxido de sodio al 5%, la mezcla resultante se agita. Si la fase alcalina se colorea rosa-rojo, indica la presencia de quinonas.

Baljet. Se toma 1 mL de extracto acuoso y se le adicionan unas gotas de una mezcla recién preparada de 1 mL de Baljet (solución A) y 1 mL de Baljet (solución B). Si se observa un color o precipitado color rojo-naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos.

Espuma. A la fracción disuelta en 1 mL de etanol, se le adicionan 10 mL de agua, se tapa y se agita vigorosamente durante 2 min. La formación de espuma estable por unos minutos con una apariencia de panel de abeja se considera positiva, indicando la presencia de saponinas.

Cloruro Férrico. A 1 mL de extracto acuoso, se le adicionan unas gotas de una solución de cloruro férrico. La aparición de un color o precipitado de color verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos.

Fehling. A una porción del extracto se trata con una mezcla recién preparada de 1 mL de Fehling A y 1 mL de Fehling B. La mezcla se calienta en baño maría durante 15 a 30 min. La aparición de un color o precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores.

Shinoda. En un tubo de ensaye se colocan 2 mL de extracto diluido, se le agrega un trozo de viruta de magnesio amalgamado y se le agregan unas gotas de ácido clorhídrico concentrado (este es el Reactivo de Shinoda). La inmediata aparición de colores que van del anaranjado, rojo o violeta es indicativo de flavonas, flavononas, flavonoles o xantonas. Ocasionalmente los flavanoles, las flavanonas y flavanonoles dan colores verdes o azules.

Alcaloides. Del filtrado en ácido Clorhídrico diluido se toman 2 mL t se dividen en tres tubos de ensaye:

1. Se mezcla con una gota de reactivo de Dragendorff. Un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de alcaloides.
2. Se mezcla con una gota de reactivo de Ac. Silicotungstico. Un precipitado blanco y fino indica la presencia de alcaloides.
3. Se mezcla con una gota de reactivo de Hager. Si se observan agujas de color amarillo indican la presencia de alcaloides.

Aluminio. A 2 mL de extracto acuoso se le adicionan gotas de una solución de cloruro de Aluminio al 10 % seguido de unas gotas de hidróxido de sodio al 5%, se agita la mezcla, si un color rojo es observado la prueba indica la presencia de flavonoides.

Ninhidrina. Se añaden gotas de ninhidrina a 2 mL de extracto acuoso, la aparición de un color violeta-azuloso, indica la presencia de aminoácidos.

IX. LISTA DE EQUIPOS UTILIZADOS

Espectrofotómetro infrarrojo modelo Nicolet iS10FT con punta de diamante.

Stereo microscope modelo No. Z45V

Espectrofotómetro UV-Vis HALO XB-10 marca DYNAMICA

PowerSpin™ LX CENTRIFUGE marca UNICO®

Balanza OHAUS® HARVARD TRIP BALANCE

Microondas marca GE modelo JES1142SJ

Z-SIZER marca Malvern, Nano-ZS90

Ultracentrifuga Óptima XL-100K, Beckman Coulter, rotor SW28

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar Mendez, M. Á. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*. México D.F: IPN.
2. Ainsworth, E., & Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-876.
3. Andrade, J., Acosta, D. B., & Luna, G. (2013). Preparation and evaluation of an edible coating for tomato tree *Cyphomandra betacea* Cav. Sendt post-harvest conservation. *Ciencias Agrícolas*, 30(2), 82-83.
4. Arias Carmona, M. D. (2009). *Carecterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo*. Facultad de Farmacia: Universidad de Santiago.
5. Ávalos, H., Al, M., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1-6.
6. Ávila Zágarra, G., Gavilán García, I., & Cano Díaz, S. (2015). *Teoría y experimentos de Química Orgánica con un enfoque de Química Verde*. Distrito Federal, México: UNAM.
7. Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Madani, S., & Ruberto, G. (2012). Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83, 286-289.
8. Chowdhury, S., Yusof, F., Omer Faruck, M., & Sulaiman, N. (2016). Process optimization of silver nanoparticle synthesis using Response surface methodology. *Procedia Engineering*, 148, 992-998.
9. Cicco, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2008). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical*, 91, 107-108.
10. Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 1(3), 134.

11. Correa Cuevas, L., & Hernández Baltazar, E. (2011). El uso de las microondas en la industria farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(4), 7.
12. Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2011). Metallic nanoparticles and surface plasmons: a deep relationship. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
13. Cuadros Moreno, A., Casañas Pimentel, R., San Martín Martínez, E., & Yañes Fernandez, J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 7(4), 4314-4315.
14. Das, J., & Velusamy, P. (2013). Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Rosmarinus officinalis* L. *Materials Research Bulletin*, 48(11), 4531-4533.
15. Domínguez, A. X. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Distrito Federal: LIMUSA.
16. Duque, S. J., Osorio, G., Cuenca, J. P., & Riascos, H. (2015). Análisis UV-Vis de nanopartículas metálicas crecidas en un ambiente líquido mediante PLD. *El hombre y la máquina*, 47, 38.
17. Durán, N., Marcato, P., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., & Rai, M. (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi and plants. *Springer*, 1619.
18. Ekpenyong, M., Antai, S., Asitok, A., & Ekpo, B. (2017). Response surface modeling and optimization of major medium variables for glycolipopeptide production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 117.
19. Escalante, E. (2014). *Diseño y análisis de experimentos* (1a ed.). D. F, México: Limusa.
20. Euroresidentes. (21 de Diciembre de 2017). *Nanopartículas de plata para conservar alimentos - Nanotecnología*. Recuperado el 10 de mayo de 2018, de Euroresidentes vida inteligente: <https://www.euroresidentes.com/tecnologia/nanotecnologia/nanopartculas-de-plata-para-conservar>
21. Fernández, G. (2014). *Determinación estructural* (Vol. 2). Ovideo: Academia Minas Centro Universitario.
22. Fernández, N., Echeverría, D., Mosquera, S., & Paz, S. (2017). Estado actual del uso de recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 134-141.
23. Ferrer, F., Julián, Carrera, P., & Marcos. (1992). *Iniciación a la física*. Barcelona: Reverté.
24. Gafner, S., Wolfender, J., Nianga, M., & Hostettmann, K. (1997). Phenylpropanoid glycosides from *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry*, 44(4), 687-690.
25. Grayer, R., Bryan, S., Nigel, V., Goldstone, F., Paton, A., & Wollenweber, E. (1996). External flavones in *Sweet basil*, *Ocimum basilicum*, and related taxa. *Phytochemistry*, 43(5), 1041-1047.
26. Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseños de experimentos* (Segunda Edición ed.). Distrito Federal: McGraw Hill.
27. Gutiérrez, D., Ortiz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en mezclas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología*, 1(1), 1.

28. Ilzarbe Izquierdo, L., Tanco, M., Viles, E., & Álvarez Sánchez, M. J. (2007). Desing of experiments as a tool for process improvement. Methodology applied to a catapult. *Tecnura*, 10(20), 128.
29. Jerez, A. (2012). Secado solar de plantas medicinales. *Academia*, 11(23), 238.
30. Karadirek, Ş., Kanmaz, N., Balta, Z., Demirçivi, P., Üzer, A., Hızal, J., & Apak, R. (2016). Determinacion of total antioxidante capacity of humic acids using cuprac, Folin-Ciocalteu, noble metal nanoparticle and solid liquid extraction based method. *Talanta*, 153, 121-122.
31. Kohli Mohan, M., Ackermann Díaz, M., & Castro, M. (2003). *Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo: un enfoque multidisciplinario*. La Estanzuela, Uruguay: CIMMYT-INIA.
32. Kole, C., Kumar, S., & Mariya, K. (2016). *Plant nanotechnology principles and practices*. Switzerland: Springer.
33. Krupa Deva, N., Evy, A., & Nirmala, G. (2016). Optimization of process parameters for the microbial synthesis of silver nanoparticles using 3-level Box–Behnken Design. *Ecological Engineering*, 87, 169.
34. Kuehl, R. (2001). *Diseño de Experimentos* (2a ed.). D.F, México: Thomson Learning.
35. Lattanzio, V. (2013). *Phenolic Compounds: Introduction*. Heidelberg New York Dordrecht London: Springer.
36. Leyva Gómez, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología parasu obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigacion en Discapacidad*, 2(1), 19-20.
37. Lok Chun, N., Ho Chi, M., Chen, R., He Yu, Q., & Yu, Y. W. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Biological inorganic chemistry*, 12(4), 527-534.
38. López Téllez, G., Morales Luchie, R. A., Olea Mejía, O. F., Mendieta Sánchez, V., Varela Guerrero, V., & Vilchis Néstor, A. R. (2013). *Nanoestructuras metálicas síntesis, caracterización y aplicaciones*. Barcelona, España: Reverté.
39. López, J., Vilchis, N., Sánchez, M., & Avalos, M. (2013). Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón. *Superficies y Vacío*, 26(3), 74.
40. Magalhães, L., Santos, F., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441-442.
41. Mahdi Pourmortazavi, S., Taghdiri, M., Makari, V., & Rahimi Nasrabadi, M. (2015). Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. *Spectrochimica acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1249-1251.
42. Manahan E, S. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. D.F, Mexico: REVERTÉ.
43. Marete, E., Jacquier, C. J., & O'Riordan, D. (2009). Effects of extraction temperature on the phenolic and parthenolide contents, and colour of aqueous feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) extracts. *Food Chemistry*, 117(2), 226-227.
44. Martínez Flórez, S., González Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-272.
45. Medina Remón, A., Barrionuevo González, A., Zamora Ros, R., Andres Lacueva, C., Estruch, R., & Martínez González, M. Á. (2009). Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for

- solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenol intake. *Analytica Chimica Acta*, 634(1), 55.
46. Mercado Mercado, G., Rosa Carrillo, L., Wall Medrano, A., López Díaz, J., & Álvarez Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 39.
 47. Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Investigación química*, 105(1), 33.
 48. Montero, J. M. (02 de Octubre de 2012). *Laboratorio de Pablo Olavide*. Recuperado el 28 de Febrero de 2017, de https://www.upo.es/moleqqa/export/sites/moleqqa/documentos/JM_Oliva.pdf
 49. Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (Segunda ed.). Ciudad de México, México: LIMUSA.
 50. Montgomery, D. (2005). *Design and analysis of experiments*. Arizona: Wiley.
 51. Mosquera, E., Rosas, N., Debut, A., & Guerrero, V. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio obtenidas por el método sol-gel. *Politécnica*, 36(3), 2.
 52. Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S., & Khan, M. (2001). Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters*, 1(10), 515-519.
 53. Muñoz Velázquez, E. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 486.
 54. Muñoz Velázquez, E., Rivas Díaz, K., Flavia Loarca, G., Mendoza Díaz, S., Reynoso Camacho, R., & Ramos Gómez, M. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 486.
 55. Ondari Nyakundi, E., & Nalini Padmanabhan, M. (2015). Green chemistry focus on optimization of silver nanoparticles using response surface methodology (RSM) and mosquitocidal activity: *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy*, 149, 978-979.
 56. Organización Mundial de la Salud. (7 de Diciembre de 2010). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Medicina tradicional: definiciones : https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
 57. Osegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*, 62, 12.
 58. Pájaro Castro, N. P., & Olivero Verbel, J. T. (2011). Química verde: un nuevo reto. *Redalyc*, 21(2), 171.
 59. Prieto González, S., Garrido Garrido, G., González Lavaut, J. A., & Molina Torres, J. (2004). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *CENIC Ciencias Biológicas*, 35(1), 19-22.
 60. Ramírez Díaz, M., & Ramírez Solís, B. (2006). La nanotecnología en su impacto social. *Nanociencia*, 4(3), 867.
 61. Ríos Castro, Á., Moreno Bondi, M. C., & Simonet Suau, B. (2012). *Técnicas espectroscópicas en química analítica* (Vol. 1). Barcelona, España: Síntesis.

62. Rover, M., & Brown, R. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Analytical and applied pyrolysis*, 104, 366-367.
63. SAGARPA. (2016). Almacenamiento en México. *Claridades Agropecuarias*(271), 3. Obtenido de https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUK EwiUI9WA8vvaAhXJ6oMKHc3TAhQQFghGMAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.gob.mx%2Fcms%2Fuploads%2Fattachment%2Ffile%2F185452%2Frevista_271.pdf&usg=AOvVaw1T5cljqhMTd5ewg_JA6f6X: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/185452/revista_271.pdf
64. Shaghghi, M., Manzoori, J., & Jouyban, A. (2007). Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 108, 695-697.
65. Sharma, A., Flores, R., Cardoso, A., & Villareal, M. (2016). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Ethnopharmacology*, 208, 2.
66. Siahpoush, A., Ghasemi, N., Shams Ardakani, M., & Asghari, G. (2011). Production of chlorogenic acid in *Varthemia persica* DC (var. *persica*) callus cultures. *Reserch in Pharmaceutical Science*, 6(1), 63-69.
67. Siddiqui, M., Al-Whaibi, M., & Mohammad, F. (2015). *Nanotechnology and plant sciencies*. New York: Springer.
68. Sifontes, Á. (2014). Biosíntesis de nanomateriales: hacia el avance de la nanotecnología verde. *Nanociencias y nanotecnología*, 7(13), 56-63.
69. Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. New York: Wiley.
70. Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D., & Yang, D.-C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588- 599.
71. Singh, S., Kumar Singh, B., S.M., Y., & A.K., G. (2015). Applications of nanotechnology in agricultural and their role in disease management. *Nanoscience and Nanotechnology*, 5, 1-5.
72. Siqueiros Tarazón, A. (2004). *Aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta para el Mejoramiento de la Calidad del Aceite de Soya*. Hermosillo: Universidad de Sonora.
73. Sood, R., & Sethi Chopra, D. (2017). Metal plant frameworks in nanotechnology: an overview. *Phytomedicine*, 50, 1-32.
74. SSA. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Ciudad de México: Secretaria de Salud.
75. Stobiecki, M., & Kachlicki, P. (2006). Isolation and Identification of flavonoids. En E. Grotewold, *The Science of Flavonoids* (pág. 47). Columbus, Ohio: Springer.
76. Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. West Sussex: John Wiley & Sons.
77. Torres Osuna, L., Tapia Pérez, M. E., & Aguilar Contreras, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona.

78. Torres, L., Tapia, M. E., & Aguilar, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona.
79. Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, S. (2005). Effects of extraction solvents on concentration and activity antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Foli-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835-839.
80. UNAM. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 2 de Junio de 2017, de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
81. Valdés Fernández, D., Baños Bautista, S., Ramírez Ocampo, A., Pereira García, A., & Rodríguez Falcón, A. (2015). Eatable films and coverings: a favorable alternative in the postharvesting conservation of fruits and vegetables. *Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3), 52-54.
82. Vargas Henríquez, L., Pedraza Yapes, C., Devia Acosta, C., & Martínez Marrugo, C. (2014). Development of predictive model for surface quality in turning process for high strength steels. *Prospect*, 12(1), 60.
83. Vargas Rodríguez, Y., Obaya Valdivia, A., Lima Vargas, S., Hernández Escamilla, A., Miranda Ruvalcaba, R., & Vargas Rodríguez, G. (2016). El diagrama de flujo como semáforo de seguridad ecológica de los experimentos de laboratorio. *Educación Química*, 27(1), 31-34.
84. Vargas, Y., Obaya Valdivia, A., Vargas Rodríguez, G. I., Gómez Vidales, V., Chávez Carvayar, J. A., & García Bórques, A. (2014). *Introducción a la caracterización de materiales, nanomateriales y catalizadores*. Distrito Federal, México: Departamento de Diseño y Publicaciones.
85. Villar del Fresno, A. M. (1999). *Farmacognosia general*. España: Síntesis.
86. Weissermel, K., & Arpe, H.-J. (1981). *Productos de oxidación del etileno*. Barcelona: Editorial Reverté.
87. Worthington Biochemical, C. (21 de febrero de 2018). *Polyphenol Oxidase - Worthington Enzyme Manual*. Recuperado el 21 de junio de 2018, de <http://www.worthington-biochem.com/TY/default.html>
88. Yacuzzi, E., Martín, F., Quiñones, M., & Popovsky, M. J. (2004). El diseño experimental y los métodos de Taguchi; conceptos y aplicaciones en la industria farmacéutica. *Serie de documentos de trabajo*, 258, 1-2.
89. Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo nano*, 5(1), 73-75.
90. Zill, D. (1985). *Cálculo con geometría analítica*. D. F, México: Iberoamérica.