



BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE EXTRACTO DE PEREJIL (*PETROSELINUM CRISPUS*)

¹Vicente Berenguer-Lozano, ¹Pedro Poveda-Martínez, ¹Jaime Ramis-Soriano, ²Antonio Canals Hernández, ²Paola Baile Pomares

¹Grupo de Acústica Aplicada, Universidad de Alicante, Alicante, España. ²Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología e Instituto Universitario de Materiales, Universidad de Alicante, Alicante, España
vbl10@alu.ua.es; pedro.poveda@ua.es; jramis@ua.es; a.canals@ua.es; paola.baile@ua.es

Resumen

En este trabajo se presentan resultados preliminares correspondientes a un proyecto cuyo objetivo es ensayar una metodología de biosíntesis de nanopartículas de plata y oro asistida por ultrasonidos de baja frecuencia (entre 20 y 40 kHz) empleando extractos foliares de perejil (*Petroselinum crispum*) y de alga marina. El empleo de este tipo de plantas, cuya elección viene motivada por su alta disponibilidad y amplia distribución geográfica, no solo evita utilizar agentes reductores químicos, sino que también resulta un método más económico y ecológico al utilizar materias primas renovables. Además, los ultrasonidos de baja frecuencia permiten incrementar las cinéticas de reacción en un entorno más homogéneo, reduciendo significativamente el tiempo de síntesis y haciendo de éste un proceso más eficiente en términos energéticos. Las nanopartículas de plata y oro, AgNPs y AuNPs respectivamente, pertenecen a una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología por sus exclusivas propiedades y múltiples aplicaciones. Aunque existen diversos métodos para su síntesis, la mayoría de ellos requieren el uso de reactivos químicos, en muchos casos caros y tóxicos, además de ser procesos lentos, siendo cada vez más necesario plantear nuevas alternativas más ecológicas a las ya ofrecidas por la química tradicional.

Palabras-clave: AgNPs, ecológico, perejil (*Petroselinum crispum*), ultrasonidos.

Abstract

This paper corresponding preliminary results are presented to a project which aims to test a methodology biosynthesis of nanoparticles of silver and gold assisted by low frequency ultrasound (20 to 40kHz) using leaf extracts of parsley (*Petroselinum crispum*) and algae Marina. The use of these plants, whose choice is motivated by its high availability and wide geographical distribution, not only avoid using chemical reducing agents, but is also more economical and environmentally friendly renewable raw materials using method. In addition, low frequency ultrasound allow to increase the reaction kinetics in a more homogeneous environment, significantly reducing the time of synthesis and making this process more energy efficient. Nanoparticles of silver and gold, AuNPs and AgNPs respectively, belong to one of the categories of products in the fastest growing nanotechnology industry for its unique properties and multiple applications. Although various methods for their synthesis, most of them require the use of chemical reagents, in many cases expensive and toxic besides being slow processes, becoming increasingly necessary to propose new and environmentally friendly alternatives to already offered by traditional chemistry.

Keywords: AgNPs, ecological, parsley (*Petroselinum crispum*), ultrasounds.



PACS no. 43.35.Zc

1 Introducción

La nanotecnología es un sector multidisciplinar empleado en el diseño y la manipulación de la materia con diversos fines sociales o económicos. Los progresos en este campo han posibilitado el desarrollo de herramientas, la caracterización de materiales, así como la investigación y el desarrollo de productos. Su impacto ha sido multidisciplinar y ramificado, existiendo una cooperación entre las diferentes áreas de conocimiento y extendiéndose a múltiples sectores de aplicación. En los últimos años, las nanopartículas (NPs) de metales nobles como el oro, la plata, el platino o el plomo están siendo ampliamente utilizadas en diferentes campos debido a sus propiedades antibacterianas y antioxidantes. Las NPs han sido sintetizadas de diferentes formas y tamaños mediante distintos procedimientos. Las nanopartículas de plata, AgNPs, son de aplicación en varias disciplinas incluyendo la catálisis, la fabricación de sensores, la medicina, la biología, etc, debido a sus especiales propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas [1]. Se estima que son las más comercializadas y de mayor interés económico.

Los métodos de síntesis de AgNPs son diversos [2] incluyendo métodos químicos, electroquímicos, a través de radiación gamma o por ablación láser. La síntesis de metales por métodos químicos plantea graves problemas como la alta inversión de capital, el uso de productos químicos peligrosos o la alta temperatura y presión. Por esa razón, es esencial reemplazarlos por métodos ecológicos y de bajo coste. La Química Verde o Ecológica se considera como el método más apropiado, pues se centra en la eliminación de reactivos tóxicos, empleando materias primas de origen natural y aumentando la eficiencia energética, economía y la seguridad del proceso [3]. Numerosos estudios establecen la Green synthesis como una nueva opción para la obtención de materiales a escala nanométrica. La biosíntesis implica el uso de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos así como los extractos de las plantas para conseguir la reducción de diversos tipos de iones metálicos. La utilización de los extractos de plantas como agentes reductores puede ser una vía más rápida para preparación de NPs [3]. Por tanto, la síntesis biológica de AgNPs, favorecida por la irradiación con ultrasonidos, puede ser una alternativa eficiente y respetuosa con el medio ambiente.

Actualmente existen en la literatura diversos estudios sobre la síntesis de NPs. En el caso de [4] ofrece un estudio completo de la síntesis mediada por plantas utilizando como agente oxidante AgNO_3 , haciendo especial énfasis en sus aplicaciones, por ejemplo, actividades de los antimicrobianos, antioxidantes y anticancerígenas. En concreto [3] se desarrolla un método simple para sintetizar AgNPs en disolución acuosa a través de la irradiación ultrasónica, en el proceso se utilizó una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH , 0,1 mM) con la adición de nitrato de plata (AgNO_3 , 5,88 mM) obteniendo ultrafinas AgNPs con un diámetro promedio de 8nm. En [4] se realiza el proceso de síntesis mediante el uso de la hoja de Lantana camara. En este estudio el proceso se centra principalmente en la caracterización biológica de las AgNPs obtenidas mediante irradiación por ultrasonidos. En dicho trabajo puede comprobarse como la utilización de los ultrasonidos actúa como catalizador aumentando la velocidad de reacción por medio de la cavitación. Este efecto se aprecia también en la absorbancia, que presenta un comportamiento exponencial respecto al tiempo. El trabajo concluye que el efecto sinérgico de la cavitación ultrasónica y del extracto de hoja es responsable de la formación inmediata de AgNPs. Este proceso constituye un método interesante desde el punto de vista de la Green Chemistry (CG).

Otro de los estudios describe el procedimiento empleado para la obtención biológica de AgNPs sobre hoja empleando extracto vegetal [2]. El estudio analiza la capacidad reductora del extracto de perejil



(*Petroselinum crispum*) para sintetizar AgNPs, realizando para ello un espectro de masas sobre el extracto del perejil. Se constató la naturaleza y presencia de las AgNPs sintetizadas mediante el extracto foliar de perejil a través de un espectrómetro fotoeléctrico de rayos X (XPS) y espectrofotometría UV-Vis (los resultados proporcionan picos de absorción a una longitud de onda cercana a los 400 nm).

El objetivo del presente trabajo se centra en el desarrollo de un método ecológico, rápido y eficaz para la obtención biológica de AgNPs mediante la utilización de irradiación de ultrasonidos como agente catalizador. Para tal fin se ha utilizado como agente reductor extracto foliar de perejil. Esta planta herbácea presenta propiedades antioxidantes, lo que la convierte en una buena candidata cediendo electrones al agente oxidante, el AgNO_3 . Asimismo, el perejil destaca por su fácil cultivo y su presencia en un gran número de zonas geográficas. El extracto de planta evita el uso de agentes reductores químicos, de este modo, el método propuesto cumple con una parte importante de los requisitos establecidos por la CG, centrándose en la eliminación de reactivos tóxicos. Los ultrasonidos permitirán la alteración de la planta, liberando el contenido intracelular y aumentando la productividad de los bioprocesos. El proceso tendrá lugar gracias a un fenómeno asociado a los ultrasonidos, la cavitación, en el que se producirá la formación de pequeñas burbujas y su posterior implosión en el líquido. La síntesis de nanopartículas con ayuda de los ultrasonidos se considera una síntesis ecológica.

2 Materiales y Métodos

2.1 Reactivos

En el presente trabajo se ha utilizado un procedimiento basado en [2,4] para la obtención biológica de AgNPs realizando la síntesis mediante la utilización de extracto vegetal. Para llevar a cabo la síntesis se utiliza una disolución acuosa de 10^{-3} M de AgNO_3 , preparada a partir de AgNO_3 al 99,99% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos). Como agente reductor se ha empleado el extracto de perejil (*Petroselinum crispum*), cuyas propiedades antioxidantes son capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Del mismo modo, permitirá inhibir otras reacciones de oxidación. Diversos estudios atribuyen a los polifenoles el efecto reductor de las especies vegetales. En [2] se determina de forma cualitativa los polifenoles presentes en el extracto foliar del perejil.

2.2 Instrumentación

Durante el proceso de síntesis se sonificará la mezcla de extracto de perejil y disolución de AgNO_3 mediante ultrasonidos de tipo Langevin de alta potencia. El transductor empleado presenta una frecuencia de trabajo de 24 KHz y está diseñado para su utilización en fluidos (figura 1a). El equipo de amplificación utilizado (Hielscher modelo UP 200S) permite modificar la amplitud de la señal irradiada en el líquido así como el porcentaje de ciclos de la señal emitida. El sonotrodo corresponde a la parte del conjunto oscilante que tiene contacto físico con la mezcla y será el encargado de transmitir las vibraciones hasta conseguir la cavitación deseada. Para el presente estudio se ha empleado un sonotrodo con crecimiento de la sección lineal. Se utiliza una centrifugadora (modelo Mixtasel BLT de Selecta, Barcelona) (figura 1b) para separar el sobrenadante del precipitado (AgNPs) y un espectrofotómetro UV-visible (modelo GENESYS, Thermo Scientific Inc., Waltham Estados Unidos) para detectar la presencia de AgNPs biosintetizadas (figura 1c).

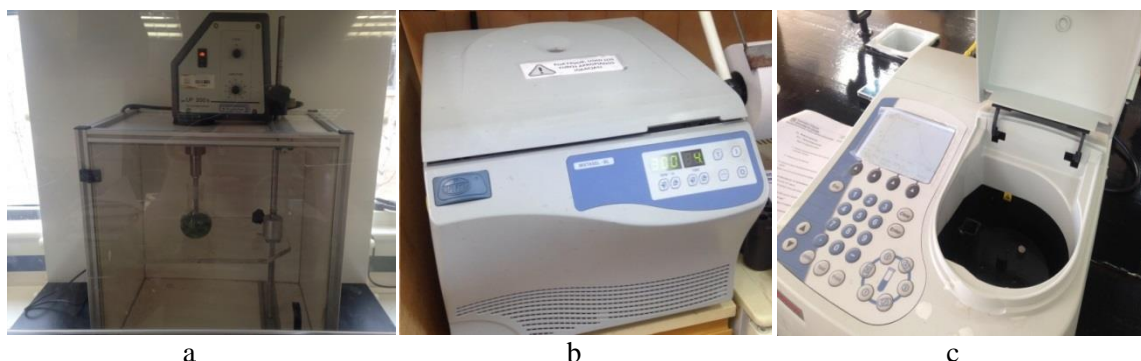


Figura 1. (a) Procesador Ultrasónico montado en el transductor Langevin fijado el sonotrodo
(b) Centrifugadora. Figura 1. (c) Espectrofotómetro UV-visible.

2.3. Parte experimental

El proceso empleado en la síntesis de las AgNPs mediante la utilización de extracto vegetal ha sido el siguiente. Para la obtención del extracto vegetal primero se lavó el perejil fresco con agua desionizada. Posteriormente se mezclaron 5 g de hojas frescas de perejil lavadas con 75 mL de agua desionizada (figura 2a). Esta mezcla se irradió con ultrasonidos durante diferentes periodos según el ensayo: 1 hora, 2 horas y 3 horas (figura 1b); con un ciclo activo de 0.5 y una amplitud al 60% (figura 2c). A continuación se filtró la mezcla resultante empleando filtros de papel con un tamaño de poro de 90 mm obteniendo el extracto vegetal. Para facilitar el proceso de filtrado de la mezcla se utilizó un dispositivo de filtración a vacío (figura 3a).

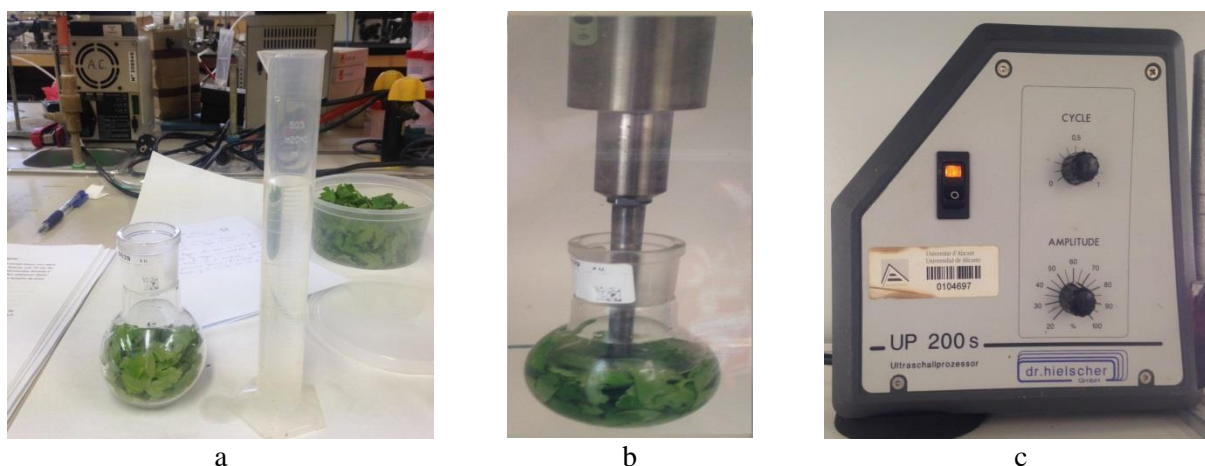


Figura 2. (a) Mezcla de 5 g de hojas frescas de perejil con 75 mL de agua desionizada.
(b) Posición del sonotrodo en la mezcla de hoja fresca con agua desionizada.
(c) Configuración del procesador ultrasónico.

Una vez obtenido el extracto (figura 3b), se preparó una disolución de 100 mL de AgNO_3 10^{-3} M. La cantidad necesaria de nitrato de plata para la disolución indicada fue calculada a partir de la siguiente expresión:

$$C = \frac{n}{V} \quad (1)$$

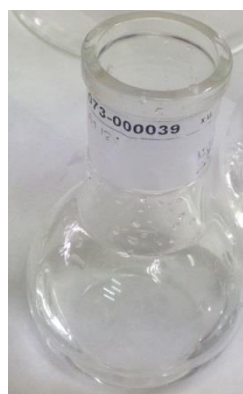
Donde C corresponde a la concentración molar (mol/L), n al número de moles (mol) y V al volumen de la disolución (L). El número de moles se obtuvo de la siguiente relación:

$$n = \frac{m}{P.M} \quad (2)$$

Donde n es el número de moles (mol), m es la masa del soluto (g) y P.M es el peso molecular del soluto (g/mol).



a



b

Figura 3. (a) Dispositivo de filtración a vacío.
(b) Aspecto del extracto después de filtrarlo.

A partir de estas expresiones, sabiendo que el peso molecular de AgNO_3 es 169,87 g/mol, para preparar una disolución con un volumen de 100 mL y una concentración de 10^{-3} M, la masa necesaria de soluto es de $1,69 \cdot 10^{-2}$ g de AgNO_3 , puesto que la masa es muy pequeña se decidió partir de una disolución más concentrada, de concentración $2,5 \cdot 10^{-2}$ M, pesándose 0,42 g de AgNO_3 para prepararla. Para obtener la disolución de 10^{-3} M se cogen 4 mL de la disolución $2,5 \cdot 10^{-2}$ M y se llevan a un volumen total de 100 mL. El siguiente paso es mezclar 40 mL de disolución AgNO_3 10^{-3} M con el extracto vegetal.

La síntesis de las AgNPs se realizó bajo condiciones previamente optimizadas en [2], donde se estudiaron volúmenes de 5 a 40 mL de extracto de perejil. En todos los casos se utilizaron 40 mL de AgNO_3 10^{-3} M, llevando las disoluciones a un mismo volumen final de 80 mL. Finalmente se decidió tomar como valor óptimo 30 mL de extracto, ya que un aumento de cantidad de extracto no mejoraba la concentración de AgNPs. De acuerdo con estos resultados, en el presente estudio se utilizaron 30 mL de extracto junto con 40 mL de AgNO_3 10^{-3} M, completando con 10 mL de agua desionizada hasta los 80 mL de volumen de disolución (figura 4a). La disolución mezclada se irradió con ultrasonidos (figura 4b): 1 hora, 2 horas y 3 horas. Se empleó un porcentaje de ciclo activo de la señal de 0.5 y una amplitud del 60% respecto del máximo permitido por el amplificador (figura 2c). Tras finalizar el proceso de sonificación (figura 4c), la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos (figura 1a y 4d). De esta forma se separó tanto las AgNPs presentes en el sobrenadante como en el precipitado para su posterior caracterización (figura 4e).

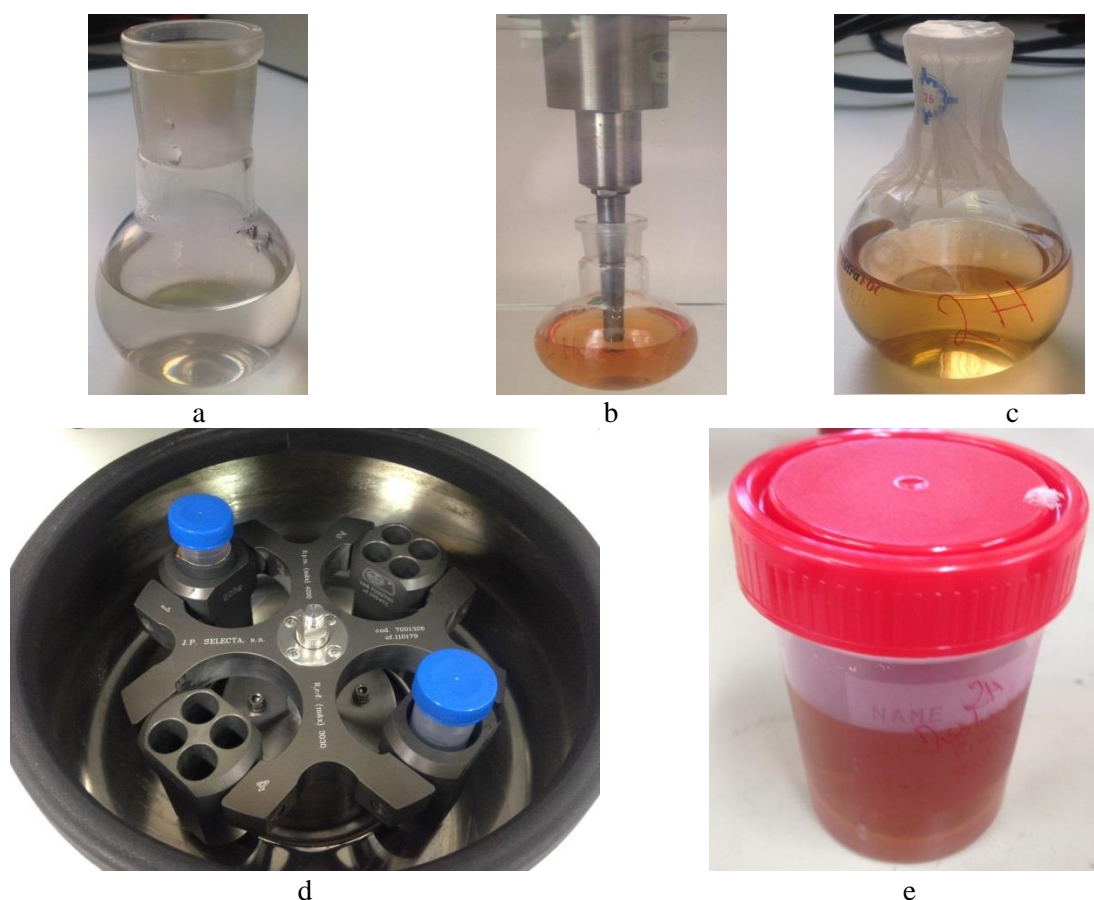


Figura 4. (a) Mezcla de 30 mL de extracto, 10 mL de agua desionizada y 40 mL de AgNO_3 10^{-3}M . (b) Posición del sonotrodo. (c) Aspecto de la muestra tras la aplicación de ultrasonidos. (d) Colocación de la muestra en la centrifugadora. (e) Aspecto tras centrifugar la muestra.

La formación de AgNPs por la reducción de Ag^+ mediante la utilización del extracto de perejil es evidente a partir del cambio de color de la mezcla debido a las propiedades ópticas de las AgNPs. Este efecto se muestra en las figuras 4a y 4b. Por otro lado la presencia de AgNPs se constató mediante espectrofotometría UV-Vis (figura 1c). Se midió la absorbancia del sobrenadante, el cual fue obtenido al centrifugar la mezcla del extracto de perejil con la disolución de AgNO_3 10^{-3}M . En estas experiencias se tomaron alícuotas de 1 mL de muestra y se diluyeron en 2 mL de agua. Se realizó un barrido de longitudes de onda entre 300 y 700 nm a las disoluciones resultantes.

3 Resultados

En primer lugar se realizó la síntesis de AgNPs empleando extracto vegetal, donde el factor principal correspondió al tiempo de irradiación con ultrasonidos. Los tiempos utilizados fueron seleccionados del trabajo referenciado anteriormente [4]. Para el presente estudio se seleccionaron tiempos de sonificación de 1h, 2h y 3h (figura 8). Las medidas con el espectrofotómetro UV-Visible se realizaron tres días después de haber acabado con el proceso experimental, tiempo durante el cual el reactivo pudo generar más concentración de NPs. Durante las pruebas se empleó un transductor de ultrasonidos

de 24 KHz, con un ciclo activo de 0.5, y una amplitud del 60 %. La utilización de ciclos de señal cortos evita el calentamiento de la muestra y los efectos derivados de ella en la reacción química estudiada.

A continuación se muestra los espectros de un barrido de longitudes de onda entre 300 y 700 nm realizado sobre las disoluciones resultantes. En la tabla 1 se observa cómo se obtiene una absorbancia mayor para una longitud de onda de 448 nm al aumentar el tiempo de irradiación. El aumento en el tiempo de sonificación de la mezcla da como resultado un mayor contenido de nanopartículas de plata metálica.

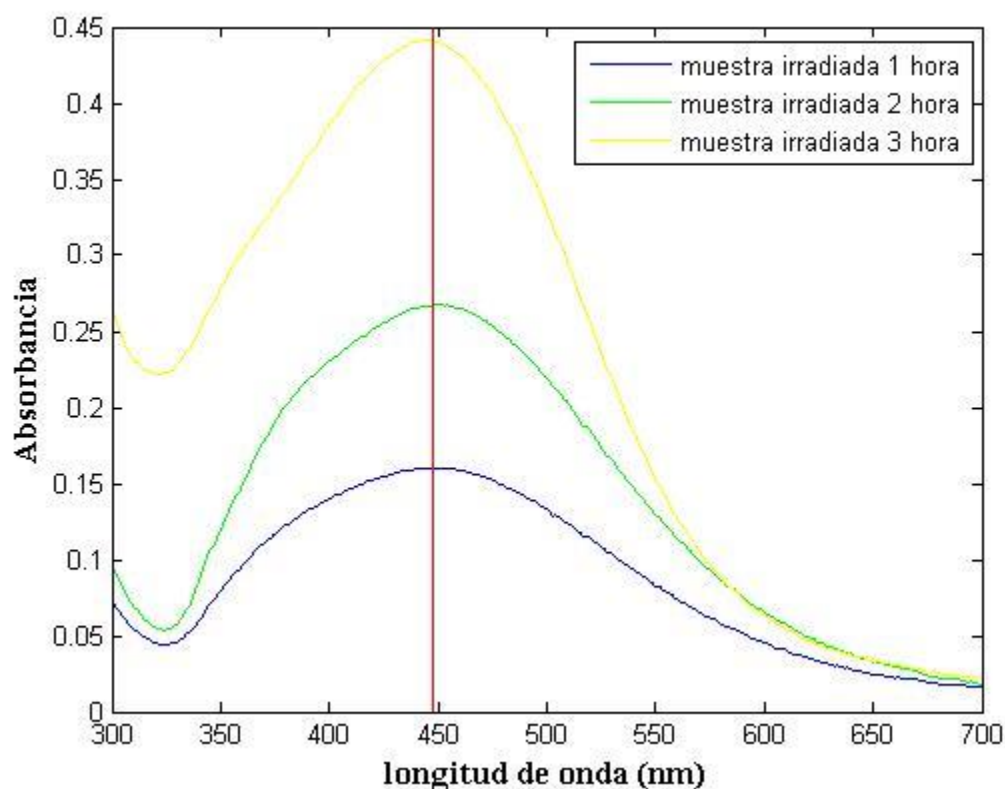


Figura 8: Espectro de las muestras irradiadas a diferentes tiempos.

Tabla 1: Valores de absorbancia obtenidos a 448 nm de las muestras irradiadas a diferentes tiempos con el ultrasonidos.

Tiempo de síntesis (horas)	Absorbancia
1	0,15
2	0,26
3	0,44



4 Conclusión

En el presente trabajo se ha constatado experimentalmente la posibilidad de utilizar extracto foliar de perejil (*Petroselinum crispum*) como agente reductor para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). A la vista de los resultados obtenidos, la aplicación de ondas ultrasónicas a la mezcla de extracto de perejil y disolución de AgNO_3 favorece la obtención de nanopartículas, permitiendo disminuir el tiempo de síntesis según los principios de la Chemistry Green. Estos estudios preliminares han permitido demostrar experimentalmente el concepto de síntesis ecológica de AgNPs. En etapas posteriores del trabajo se realizará la repetición de las medidas realizadas, llevando a cabo un proceso de optimización mediante análisis multivariante con factores como el tiempo de sonificación, la frecuencia del transductor o el % ciclo.

5 Referencias

- [1] Ill-Min, C.; Inmyoung, P.; Kim, S.; Muthu, T.; Govindasamy, R. Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Application. *Nanoscale Research Letters*, 2016, pp 11-40.
- [2] Laura, A. Biosíntesis de nanopartículas de plata asistida por microondas obtenidas a partir de extracto foliar de perejil (*Petroselinum crispum*), Trabajo de Fin de Master, Universidad Alicante, 2015.
- [3] Chaodong, H.; Lanlan, L.; Zeguo, F.; Jia, L.; Jinbao, G.; Jie, W. Formation and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution via ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol 21, 2014, pp 542-548.
- [4] Manjamadha, V.; Karuppan, M. Ultrasound assisted Green synthesis of silver nanoparticules using weed plant, *Bioprocess Biosyst Eng*, Vol 39, 2016, pp 401-411.