

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Síntesis verde de nanopartículas de plata para el estudio de su actividad fungicida frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero químico

Presentado por:

Esthefania Elizabeth Cabrera Pincay

Suanny Anahis Salcedo Cañarte

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis padres, ya que sin ellos no habría podido cumplir esta meta, su apoyo incondicional fue inspiración y me dio fuerzas para seguir en momentos de flaqueza.

También a las personas que confiaron en mí y supieron guiarme para que sea perseverante y alcance mis objetivos.

Esthefania Elizabeth Cabrera Pincay

DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación se lo dedico a Dios, por bendecirme y darme fortaleza para no derrotarme hasta cumplir cada una de las metas que me propongo. ¡Tengo fe en ti!

A mis padres Henry Salcedo Cercado y Lorena Cañarte Pinargote, bajo sus esfuerzos constantes y sacrificios, lograron darme la oportunidad de tener una educación. ¡Son mi ejemplo de superación!

A mi hermano Henry Salcedo Cañarte, por ser mi apoyo e impulsarme en cada obstáculo. ¡Eres mi inspiración!

Y a esa persona especial que celebra junto a mi cada logro y confía en mí. ¡Gracias infinitas!

Suanny Anahis Salcedo Cañarte

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial al Doctor Joel Vielma Puente, por haber confiado en nosotras para llevar a cabo este trabajo de investigación, brindarnos su apoyo incondicional y guiarnos constantemente.


A la Doctora Suanny Mosquera por su significativo aporte para mejorar la redacción del documento.

Finalmente, a la FCNM y CIBE por la colaboración de sus instalaciones y equipos, en conjunto con los docentes que nos animaron para culminar con éxito este trabajo.

Esthefania Cabrera y Suanny Salcedo

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Esthefania Elizabeth Cabrera Pincay* y *Suanny Anahis Salcedo Cañarte* damos consentimiento para que la ESPOL realiza la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Esthefania Elizabeth
Cabrera Pincay



Suanny Anahis
Salcedo Cañarte

EVALUADORES

Suanny Sophia
Mosquera Romero

Joel Eduardo
Vielma Puente

RESUMEN

El presente trabajo muestra un enfoque sencillo, fiable y ecológico para la síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de hojas de *Psidium guayaquilensis* junto al nitrato de plata como precursor acuoso. La reacción ocurre de forma espontánea, en condiciones atmosféricas. Las nanopartículas de plata poseen alto potencial para eliminar hongos, virus y bacterias. Se plantea que las nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde a partir del extracto permitan inhibir el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

Una vez realizada la síntesis química, las nanopartículas de plata se caracterizaron mediante técnicas de espectroscopia UV-visible, espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier y difracción de rayos X para lo que fue necesario un laboratorio de análisis instrumental.

Los métodos de caracterización espectroscopia UV-visible y difracción de rayos X mostraron en gráficas las bandas de absorción (425 nm) y posiciones angulares (38°, 44°, 53° y 76°) respectivamente, esperadas para el producto de síntesis, con ello se comprobó la obtención de nanopartículas de plata. Por otro lado, se evaluó la sensibilidad inhibidora de las nanopartículas de plata frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, obteniendo como resultado la inhibición del hongo al 100% al emplear una concentración de 10 ppm.

Se concluye que se obtuvieron nanopartículas de plata a partir de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis*, aplicando una metodología ecológica para llevar a cabo la síntesis química. Además, se verifica que las nanopartículas de plata en disolución exhiben una excelente actividad antifúngica contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

Palabras Clave: nanopartículas de plata, extracto de hojas, caracterización, inhibición.

ABSTRACT

*The present work shows a simple, reliable and environmentally friendly approach for the synthesis of silver nanoparticles using *Psidium guayaquilensis* leaf extract together with silver nitrate as an aqueous precursor. The reaction occurs spontaneously, under atmospheric conditions. Silver nanoparticles have a high potential to eliminate fungi, viruses and bacteria. It is proposed that the silver nanoparticles obtained by green synthesis from the extract can inhibit the fungus *Mycosphaerella fijiensis*.*

Once the chemical synthesis was completed, the silver nanoparticles were characterized by UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction techniques, for which an instrumental analysis laboratory was necessary.

*The characterization methods UV-visible spectroscopy and X-ray diffraction showed in graphs the absorption bands (425 nm) and angular positions (38°, 44°, 53° and 76°) respectively, expected for the synthesis product, thus proving the obtaining of silver nanoparticles. On the other hand, the inhibitory sensitivity of the silver nanoparticles against the fungus *Mycosphaerella fijiensis* was evaluated, obtaining as a result 100% inhibition of the fungus when using a concentration of 10 ppm.*

*In conclusion, silver nanoparticles were obtained from the leaves of the *Psidium guayaquilensis* tree, applying an ecological methodology to carry out the chemical synthesis. In addition, it is verified that silver nanoparticles in solution exhibit excellent antifungal activity against the fungus *Mycosphaerella fijiensis*.*

Keywords: *silver nanoparticles, leaf extract, characterization, inhibition.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DECLARACIÓN EXPRESA.....	V
EVALUADORES.....	VI
RESUMEN.....	VII
<i>ABSTRACT</i>	<i>VIII</i>
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IX
ABREVIATURAS.....	XII
SIMBOLOGÍA.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVI
CAPÍTULO 1.....	17
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	17
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	19
1.3. OBJETIVOS.....	20
1.3.1. Objetivo General.....	20
1.3.2. Objetivos Específicos	20
1.4. MARCO TEÓRICO	20
1.4.1. Antecedentes.....	20
1.4.2. Base teórica.....	22
1.4.2.1. Síntesis de nanopartículas	22
1.4.2.2. Métodos de caracterización de nanopartículas	22
1.4.3. Definición de términos básicos	23
1.4.3.1. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Sigatoka negra)	23
1.4.3.2. <i>Psidium guayaquilensis</i>	23
1.4.3.3. Síntesis verde.....	26

CAPÍTULO 2.....	27
2 METODOLOGÍA.....	27
2.1. OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AG-NPs).....	27
2.1.1. Preparación del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i>	27
2.1.2. Preparación de la disolución del nitrato de plata (AgNO ₃).....	27
2.1.3. Síntesis de las nanopartículas de plata (Ag-NPs).....	28
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AG-NPs).....	29
2.2.1. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis).....	30
2.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	30
2.2.3. Difracción de rayos X (DRX).....	31
2.3. EVALUACIÓN ANTIFUNGICIDA DE LAS NANOPARTÍCULAS FRENTE AL HONGO	
<i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	31
2.3.1. Cultivo del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	31
2.3.2. Inoculación del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	32
2.3.3. Prueba de sensibilidad	33
CAPÍTULO 3.....	34
3 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	34
3.1. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AG-NPs).....	34
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AG-NPs).....	38
3.2.1. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis).....	38
3.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	39
3.2.3. Difracción de rayos X (DRX).....	40
3.3. PROPIEDAD ANTIFÚNGICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA FRENTE AL HONGO	
<i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	42
3.3.1. Cultivo del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	42
3.3.2. Prueba de sensibilidad	42
3.3.2.1. Prueba de sensibilidad del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i>	42
3.3.2.2. Prueba de sensibilidad del nitrato de plata (AgNO ₃)	44
3.3.2.3. Prueba de sensibilidad de las nanopartículas de plata (Ag-NPs).....	45
3.4. ANÁLISIS DE COSTO	47
CAPÍTULO 4.....	49

4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
4.1.	CONCLUSIONES	49
4.2.	RECOMENDACIONES	50
	BIBLIOGRAFÍA.....	52

ABREVIATURAS

Ag-NPs	Nanopartículas de plata
UV-Vis	Espectroscopia UV-Visible
FT-IR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
DRX	Difracción de rayos X
FCNM	Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
CIBE	Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
LAQUINS	Laboratorio de Análisis Químico Instrumental
LEMAT	Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales

SIMBOLOGÍA

mL	Mililitros
L	Litros
h	Horas
min	Minutos
g	Gramos
mg	Miligramos
°C	Grados centígrados
M	Molar
nm	Nanómetros
ppm	Parte por millón
mbar	Milibar
rpm	Revoluciones por minuto

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 2.1 Esquema de distribución de la placa de Elisa para la prueba de sensibilidad.....	32
Ilustración 3.1 Colores visualizados en la síntesis verde de nanopartículas de plata....	34
Ilustración 3.2 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 5 mL del extracto	36
Ilustración 3.3 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 10 mL del extracto	36
Ilustración 3.4 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 25 mL del extracto	37
Ilustración 3.5 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 50 mL del extracto	37
Ilustración 3.6 Nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas en estado sólido	37
Ilustración 3.7 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata considerando la variación del volumen de extracto	38
Ilustración 3.8 Espectro UV-Visible de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)	39
Ilustración 3.9 Espectro UV-Visible (UV-Vis) del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> , nitrato de plata (AgNO ₃) 0.005 M y las nanopartículas de plata (Ag-NPs)	39
Ilustración 3.10. Espectro infrarrojo (FT-IR) de las nanopartículas de plata sintetizadas	40
Ilustración 3.11 Difractograma de rayos X de las nanopartículas de plata sintetizadas	41
Ilustración 3.12 Hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> incubado en caja Petri con medio de cultivo de agar de dextrosa de papa (PDA)	42
Ilustración 3.13 Propiedad inhibidora del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> frente al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	43
Ilustración 3.14 Bitmap de la prueba del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> frente al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	43
Ilustración 3.15 Resultados del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> frente a la cepa 2 (F5A3)	44
Ilustración 3.16 Propiedad inhibidora del nitrato de plata (AgNO ₃) frente al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	44
Ilustración 3.17 Bitmap de la prueba del nitrato de plata (AgNO ₃) frente al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	45

Ilustración 3.18 Resultados del extracto del nitrato de plata (AgNO ₃) frente a la cepa 2 (F5A3)	45
Ilustración 3.19 Propiedad inhibidora de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) frente al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	46
Ilustración 3.20 Bitmap de la prueba de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) frente al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	46
Ilustración 3.21 Resultados de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) frente a la cepa 2 (F5A3)	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Componentes químicos del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> con diclorometano	24
Tabla 1.2 Componentes químicos del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> con acetato de etilo	25
Tabla 1.3 Componentes químicos del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> con metanol...26	
Tabla 2.1 Ensayos de síntesis verde de nanopartículas de plata (Ag-NPs)	28
Tabla 2.2 Parámetros ajustados en el espectrofotómetro para la caracterización UV-Visible (UV-Vis)	30
Tabla 3.1 Bandas de absorción del espectro UV-Vis en los ensayos de la síntesis de nanopartículas de plata	35
Tabla 3.2 Bandas de absorción identificadas en el espectro FT-IR.....	40
Tabla 3.3 Determinación del tamaño promedio aproximado de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)	41
Tabla 3.4 Costos de implementación del estudio a microescala	48

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

El sector agrícola tiene un aporte significativo en la economía del Ecuador y el sector bananero genera más de 200 mil plazas de trabajo. Es mandatorio controlar las plagas que afectan la producción de esta fruta, siendo el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka Negra) uno de los principales problemas para los productores de banano. Está es la enfermedad foliar más destructiva y puede llegar a afectar al 50% del rendimiento del sembrío, además, es de fácil propagación y causa la muerte de los árboles de banano.

Los métodos convencionales de fumigación presentan desventajas tanto para el control de las plagas como para el ambiente y la salud pública. Es por lo que se hace evidente la necesidad de utilizar un nuevo producto que permita inhibir el hongo Sigatoka negra, con un bajo impacto en el ambiente y la salud. La utilización de nanopartículas metálicas se ha mostrado en los últimos tiempos, como una solución para problemas relacionados con la inhibición de hongos, virus y bacterias.

Debido a su alta efectividad para inhibir el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, según estudios previos mencionados a lo largo del desarrollo de la investigación. Se hace evidente la importancia del desarrollo de estas nuevas metodologías. Incluso, al sintetizar nanopartículas de plata el impacto ambiental es considerado mínimo gracias a que se desarrolla a temperatura y presión atmosférica. De esta forma, se plantea sintetizar nanopartículas de plata y verificar su porcentaje de inhibición contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, usando una metodología amigable con el medio ambiente.

1.1. Descripción del problema

Ecuador es uno de los mayores exportadores de banano a nivel mundial, por lo tanto, la economía del País depende de la calidad del banano y sus plantaciones. El sector bananero genera más de 200 mil plazas de trabajo. En el año 2021 Ecuador exportó 37 millones de cajas a diferentes destinos del mundo y en 11 meses del mismo año se generaron USD 3.181 millones. Sin embargo, plagas como *Mycosphaerella fijiensis*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium equiseti* son hongos que atacan las plantaciones de banano afectando la economía del País.

Una de las principales afectaciones en las plantaciones del banano es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* debido a que genera efectos destructivos en los cultivos de banano. Los principales efectos son: falta de nutrientes, bloqueo del sistema vascular y falta de agua, lo que provoca la muerte de uno o incluso cientos de ejemplares. El hongo se propaga con facilidad, ya que puede ser transportado en forma de esporas por el aire y mediante contacto directo con una superficie u objeto infectado.

Puede estar presente en herramientas de trabajo, suelo y en vehículos. Además, puede permanecer hasta tres décadas en los cultivos. Estaciones secas, temperaturas elevadas entre 24°C y 28°C, suelos mal drenados y plantaciones aireadas también favorecen su propagación. El ataque de este hongo se puede identificar cuando las hojas de los árboles de plátano o banano toman una coloración oscura (negra), lo que provoca que las hojas se marchiten y sequen en poco tiempo.

La enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* en los cultivos de banano es considerada la más importante a nivel mundial. Este hongo fue descubierto en 1912 y apareció en centro América en 1934, en la actualidad está presente en todos los países productores de esta fruta. Los productores de banano luchan para prevenir y controlar ataques por hongos en las plantaciones de la séptima fruta de mayor exportación en el país. Por lo antes mencionado es importante preservar en óptimas condiciones el medio ambiente en el que se desarrolla este producto.

Los fungicidas pueden ser sustancias tóxicas, debido a que causan contaminación en agua y suelo. La aplicación de un fungicida adecuado en zonas agrícolas es indispensable para el control de plagas, reducción de pérdidas económicas y mejorar la calidad del producto. De esta manera, es beneficioso para los agricultores el uso de un fungicida que le permita cuidar las zonas agrícolas.

Las restricciones para la solución de nanopartículas de plata son: No debe ser nocivo para la salud, no debe causar enfermedad leve o grave a la persona que lo manipule, no debe causar enfermedad en animales que frecuenten zonas agrícolas, debe ser de fácil almacenamiento y debe ser de fácil aplicación. Además, se destaca que debido a que las nanopartículas de plata son obtenidas a partir de síntesis verde su efecto contaminante será de bajo impacto.

1.2. Justificación del problema

El principal daño irreversible que afecta los cultivos de una empresa bananera ubicada en el cantón Marcelino Maridueña de la provincia del Guayas, es provocado por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. En términos generales, el hongo *Mycosphaerella fijiensis* afecta la calidad y el peso del banano por lo que es relevante investigar este fenómeno que representa pérdidas económicas.

En los cultivos de banano es indispensable evitar la disminución del rendimiento hasta en un 50% y el incremento de los costos en la producción ocasionados por la implementación de fumigaciones como para el control de plagas. Como medida alternativa para contrarrestar estas pérdidas se involucra el uso de un fungicida inorgánico y se incentiva la aplicación de herramientas que generen un menor impacto contaminante al medio ambiente.

Por estas razones, se requiere un estudio que permita obtener un fungicida inorgánico que inhiba el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis* en las hojas de las plantaciones de banano, de manera que se produzca la fotosíntesis y contenga el almidón requerido para que la fruta cumpla con las especificaciones de peso y calidad.

El presente estudio tiene como finalidad implementar el uso de nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde a partir del extracto de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis* como fungicida para eliminar el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. La ventaja de utilizar la propiedad antifúngica de las nanopartículas de plata en lugar de un fungicida orgánico consiste en aprovechar la información de estudios referentes su alta efectividad y su aplicación a bajas dosis que permite reducir costos de implementación.

Finalmente, de acuerdo con la literatura es posible la obtención de nanopartículas de plata, con una metodología confiable y amigable con el medio ambiente. Con ello, el estudio puede replicarse en diversos sectores afectados por patologías como el hongo Sigatoka negra en plantaciones de banano.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Sintetizar nanopartículas de plata a partir del extracto de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis*, para el estudio de su efecto antifúngico frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

1.3.2. Objetivos Específicos

1. Proponer una metodología de síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso de las hojas del árbol de Guayaquil *Psidium guayaquilensis*.
2. Caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas mediante las técnicas de espectroscopia UV-visible, espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (DRX), para la comparación de resultados obtenidos en la síntesis.
3. Evaluar la capacidad antifúngica de las nanopartículas de plata sintetizadas frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, mediante la cuantificación de las colonias incubadas que se eliminan in vitro.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Antecedentes

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* es causante de una grave enfermedad conocida comúnmente como Sigatoka negra, que ataca a los cultivos de banano en Ecuador y otras partes del mundo. Debido a la presencia perenne en las plantaciones de banano de esta enfermedad, en México se desarrolló una investigación para determinar los efectos en el ambiente y en la salud pública del uso de plaguicidas convencionales para el control de la Sigatoka negra. Donde se reveló que las numerosas aplicaciones de fungicidas en las plantaciones causan acumulación de sus componentes en agua, suelos y plantas (Krithiga et al., 2015).

La investigación evidenció que los métodos convencionales de fumigación presentan desventajas tanto para el control de las plagas como para el ambiente y la salud pública. Por ejemplo, el método de fumigación por aire no cubre todas las superficies donde podría reproducirse el hongo, lo que reduce su efectividad, el método de

cubrimiento del fruto con un material plástico que contiene un fungicida, generalmente clorpirifós, que evita la proliferación del hongo, pero se ha demostrado que tiene efectos neurológicos en niños y que en mujeres embarazadas expuestas se asocia con bajo peso en recién nacidos (Krithiga et al., 2015).

Se ha revelado que hongo *Mycosphaerella fijiensis* ha desarrollado resistencia a algunos fungicidas convencionales del citocromo bc1 o Qols tales como: pyraclostrobin, trifloxystrobin y azoxystrobin y se encuentran casos reportados en Ecuador, Belice, Colombia, Guatemala y Costa Rica. Por ello nace la importancia de utilizar un nuevo fungicida que pueda inhibir a la Sigatoka negra y a su vez tenga efectos despreciables en la salud y el medio ambiente (Krithiga et al., 2015).

Es importante destacar que en los últimos años el uso de nanopartículas metálicas ha formado parte esencial de las investigaciones relacionadas al campo de la agricultura como metodología para reducir la aplicación de pesticidas convencionales. Según Gumber (2019), las nanopartículas de plata (Ag-NPs) se emplean como fertilizantes sintetizados por métodos físicos, químicos o biológicos para elevar la germinación de las semillas y mejorar los pigmentos fotosintéticos (Dam et al., 2020).

Por esta razón, la nanotecnología es un área de investigación que permite la obtención de nanopartículas metálicas nobles, las nanopartículas de plata se han estudiado por su amplia eficacia en sus propiedades antibacterianas y catalíticas, alta conductividad y estabilidad química (Mahendran et al., 2022).

Es importante destacar que existen estudios rigurosos para el desarrollo de nuevas metodologías, que permitan la obtención de nanopartículas metálicas sin el uso de métodos físicos y químicos convencionales, con el objetivo de disminuir el empleo de productos químicos tóxicos. Una de estas metodologías es la síntesis verde, que consiste en la obtención de nanopartículas metálicas a partir de organismos ecológicos; por ejemplo, bacterias, hongos y plantas (Tamilarasi & Meena, 2020).

De esta manera, se han llevado a cabo estudios que demuestran la efectividad de procesos de síntesis verde en la obtención de nanopartículas metálicas. Tamilarasi (2020) desarrolló el estudio síntesis verde de nanopartículas de plata a partir del extracto de hoja *Gomphrena globosa* (Globe amaranth), afirmando que poseen una

zona de inhibición frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Mahendran (2022) indica que se puede emplear el extracto de hojas *Cissus quadrangularis* para la biosíntesis de las nanopartículas de plata, las cuales poseen propiedades antibacterianas contra *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*.

1.4.2. Base teórica

1.4.2.1. Síntesis de nanopartículas

Existen dos métodos para la obtención de nanopartículas metálicas. El método físico que consiste en la reducción del tamaño del material metálico dividiendo su tamaño en partes cada vez más pequeñas. El método químico que consiste en la nucleación y crecimiento de las nanopartículas a partir de los átomos metálicos, donde se puede controlar el tamaño y su reproducción de forma más sencilla. Por ejemplo, uno de los métodos químicos se desarrolla a partir de la reducción química de una sal metálica en contacto con un agente reductor (Gómez, 2016).

Las nanopartículas (NPs), según Dam (2020), son partículas microscópicas que han sido tema de estudio principal por sus propiedades físicas, químicas y biológicas logrando el desarrollo de la nanotecnología. El tamaño de su estructura está en un rango preferido entre 10 y 100 nm y se obtienen por métodos físicos y químicos (Kong et al., 2021). Poseen aplicaciones ambientales, electrónicas, farmacéuticas y catalíticas (Nadar et al., 2022). Son utilizadas como nanofertilizantes que son estimuladores de plantas que cumplen con la función de mejorar la pigmentación fotosintética e incrementar el crecimiento de las plantas (Dam et al., 2020).

1.4.2.2. Métodos de caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) debido a sus dimensiones poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas específicas que permiten su identificación y caracterización, utilizando el tamaño, la forma, la dispersión del tamaño y la zona superficial (Patil & Chougale, 2021). La caracterización de nanopartículas sintetizadas se efectúa mediante técnicas analíticas instrumentales UV-vis, FT-IR, SEM, TEM, XRD, entre otros métodos (Dam et al., 2020).

Los métodos de caracterización de espectroscopia UV-Visible, espectroscopia infrarroja y difracción de rayos x, permiten obtener: la longitud de onda de absorción máxima (Liu et al., 2012), la composición mediante la identificación de los grupos funcionales presentes (Patil & Chougale, 2021) y la estructura cristalina de la muestra problema respectivamente. Además, los métodos de microscopía electrónica de barrido y microscopía de transmisión por electrones permiten conocer la estructura en una imagen en tercera dimensión, el tamaño y forma de la muestra problema, respectivamente (Dahlous et al., 2019).

1.4.3. Definición de términos básicos

1.4.3.1. *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra)

Sigatoka negra es el nombre de la enfermedad foliar que se presenta en las hojas de las plantaciones de banano, ocasionada por el hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis*. Según la literatura, Sigatoka negra provoca la reducción del 38% del rendimiento de la cosecha y el 40% del tiempo de vida del banano (Oiram et al., 2019).

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* provoca lesiones necróticas que altera la fisiología del fruto, al respecto se afirma que altera la calidad del fruto al intervenir en el tiempo de maduración, disminuyendo el tiempo de exportación (Chillet et al., 2009). Adicional, presentan variaciones significativas en el peso de los racimos y el número de frutos por racimo (Irish et al., 2013).

1.4.3.2. *Psidium guayaquilensis*

Psidium guayaquilensis es una planta tropical autóctona de Guayaquil, comúnmente conocida como guayaba, perteneciente a la familia Myrtaceae (Rajput & Kumar, 2021). Planta que posee compuestos bioactivos que permiten desarrollar estudios en diversas áreas de investigación como la medicina y el desarrollo de su actividad inhibidora contra cepas bacterianas (Amadike et al., 2022).

Desde la antigüedad, se emplean las infusiones de hojas de guayaba como método de prevención y tratamiento para combatir enfermedades, aprovechando sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas y antimicrobianas (Lorena et al., 2022). Por lo tanto, al ser considerado un potenciador inmunológico involucra el estudio de sus constituyentes químicos (Huang et al., 2021).

El desarrollo del presente proyecto se establece mediante la revisión de diversas fuentes bibliográficas, en donde se han evaluado algunas metodologías para la obtención de nanopartículas de plata (Ag-NPs) a partir de organismos ecológicos. Sin embargo, para la obtención de nanopartículas de plata se requiere que la hoja del árbol posea ciertos componentes en su estructura como flavonoides, triperpenoides, meroterpenoides y carotenoides (Huang et al., 2021).

Por lo tanto, mediante un estudio previo de cromatografía de gas se analizó la preparación del extracto *Psidium guayaquilensis* en diferentes solventes polares, ya que estos solventes tienen una mejor relación masa/volumen para estos procesos de extracción, en cuyos resultados se encontró la presencia de los siguientes compuestos:

Tabla 1.1 Componentes químicos del extracto *Psidium guayaquilensis* con diclorometano

Nº	Compuesto	Área del pico (%)	Clasificación
1	Ácido benzoico	0.45	Ácidos carboxílicos aromáticos
2	Ácido bencenoacético	0.52	Ácidos carboxílicos aromáticos
3	Ácido hidrocínámico	2.86	Fenilpropanoides
4	Alfa-copaeno	1.32	Sesquiterpenos
5	Beta-elemene	0.13	Sesquiterpénicos
6	Aromadendrene	0.13	Sesquiterpenoides
7	Ciclohexeno	0.31	Hidrocarburos
8	1s,2s,5r-1,4,4 Trimetiltriciclo[6.3.1.0(2,5)]dodec-8(9)-eno	0.34	Policíclicos
9	Cariofileno	2.12	Sesquiterpenos
10	Alfa-guaieno	1.07	Sesquiterpenos
11	Trans-beta-farneseno	1.40	Sesquiterpenos
12	Alfa-cariofileno	1.29	Sesquiterpenos
13	Selina-4,11-dieno	1.80	Sesquiterpenos bicíclicos
14	Beta-selineno	4.77	Sesquiterpénicos
15	Alfa-selineno	5.34	Sesquiterpenos
16	Alfa-farneseno	0.59	Sesquiterpenos
17	Beta-bisaboleno	0.83	Sesquiterpenos
18	Delta-cadineno	2.02	Sesquiterpenos
19	Trans-gamma-bisaboleno	0.24	Sesquiterpenos
20	Cicloprop[e]azuleno	0.31	Sesquiterpenos

21	4-isopropil-1,6-dimetil-1,2,3,7,8,8a-hexahidronaftaleno	0.34	Sesquiterpenos
22	Selina-3,7(11)-dieno	0.81	Sesquiterpenoides
23	Naftalina	0.18	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
24	Óxido de cariofileno	0.18	Óxidos sesquiterpenoides
25	Guaiol	4.91	Sesquiterpenoides
26	Gamma-eudesmol	1.66	Sesquiterpenoides
27	2-Naftalenometanol	2.95	Sesquiterpenoides
28	Ácido tetradecanoico	0.66	Sesquiterpenoides
29	Ácido 2,6,10-dodecatrienoico	0.47	Sesquiterpenoides
30	Octadecano	0.15	Hidrocarburos
31	2-Hexadeceno	0.27	Sesquiterpenoides
32	Neofitadieno	3.76	Sesquiterpenoides
33	Ftalato de dibutilo	0.25	-
34	Ácido hexadecanoico	3.30	-
35	Ácido cis-vaccénico	3.27	-
36	Ácido octadecanoico	0.76	Ácidos grasos
37	Hexadecanamida	0.33	Amidas grasas
38	9-Octadecenamida	2.16	Amidas grasas
39	13-Docosenamida	2.56	Amidas grasas
40	Escualeno	0.20	Triterpenos
41	Beta-amirina	0.06	Triterpenos
42	Estigmasta-3,5-dieno	3.63	-
43	(23s)-etilcolest-5-en-3-beta-ol	1.40	-

Tabla 1.2 Componentes químicos del extracto *Psidium guayaquilensis* con acetato de etilo

Nº	Compuesto	Área del pico (%)	Clasificación
1	Alfa-copaeno	3.09	Sesquiterpenos
2	Cariofileno	6.45	Sesquiterpenos
3	(e)-Beta-Farnesene	0.74	Hidrocarburos sesquiterpénico
4	Humuleno	2.98	Sesquiterpenos
5	Beta-selineno	7.56	Sesquiterpénicos
6	Alfa-selineno	7.57	Sesquiterpenos
7	Beta-bisaboleno	0.60	Sesquiterpenos
8	Delta-cadineno	3.55	Sesquiterpenos

9	Alfa-calacoreno	0.27	Sesquiterpenoides
10	Guaiol	7.77	Sesquiterpenoides
11	Gamma-eudesmol	2.26	Sesquiterpenoides
12	Alfa-eudesmol	1.16	Sesquiterpenoides
13	Óxido de cariofileno	0.21	Óxidos sesquiterpenoides
14	Ácido 2,6,10-dodecatrienoico	0.57	Sesquiterpenoides
15	Neofitadieno	1.86	Sesquiterpenoides
16	Ácido tridecanoico	0.58	Ácidos grasos
17	9-Octadecenamida	0.79	Amidas grasas
18	2,6,10,14,18-pentametil-2,6,10,14,18-eicosapentaeno	0.16	-
19	Vitamina E	0.81	-
20	Beta-sitosterol	0.73	Fitoesteroles

Tabla 1.3 Componentes químicos del extracto *Psidium guayaquilensis* con metanol

Nº	Compuesto	Área del pico (%)	Clasificación
1	Eugenol	4.75	Sesquiterpenoides
2	Beta-selineno	0.29	Sesquiterpénicos
3	Ácido hexadecanoico	0.32	Ácidos grasos
4	Ácido octadecanoico	0.26	Ácidos grasos
5	9-Octadecenamida	0.92	Amidas grasas

Conforme los fitoquímicos activos que posee el extracto *Psidium guayaquilensis* en solventes polares, se evidencia que es viable realizar la síntesis verde de nanopartículas de plata empleando como precursor una disolución de nitrato de plata. Esta metodología de síntesis verde se fundamenta en la reducción de los iones de plata (Ag^+) a plata coloidal (Ag^0) (Tamiliarasi & Meena, 2020).

1.4.3.3. Síntesis verde

Síntesis verde es una metodología biosintética que tiene como fundamento la preparación de un compuesto químico a partir de organismos ecológicos o biológicos como extractos de hojas, algas, hongos o bacterias (Tamiliarasi & Meena, 2020). Proceso que presenta ventajas frente a otros métodos químicos convencionales, al ser rentable con el medio ambiente y fácil aplicación que requiere menos tiempo para sintetizar (Jan et al., 2021).

CAPÍTULO 2

2 METODOLOGÍA

2.1. Obtención de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

La preparación de los reactivos para la síntesis de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) fueron realizadas en las instalaciones del Laboratorio c-Sinqui de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas (FCNM), pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.1.1. Preparación del extracto *Psidium guayaquilensis*

Inicialmente se lavó con agua destilada aproximadamente 500 g de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis*, se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 días para triturarlas hasta obtener un tamaño de partícula menor a 1 mm, incrementando el área de contacto y facilitando la extracción con agua.

Para la preparación del extracto, se pesó 10 g de las hojas en un vidrio de reloj utilizando una balanza analítica RADWAG AS 220.R2, este contenido se vertió en un vaso de precipitación con 100 mL de agua destilada medidos con la ayuda de una probeta de vidrio. La muestra se calentó en la plancha de calentamiento SCIOLOGEX MS-H280-Pro durante un tiempo de 30 minutos con agitación constante, controlando con un termómetro de mercurio (-10°C a 400°C) que la temperatura se mantenga alrededor de los 65°C (Tamiliarasi & Meena, 2020).

A continuación, se utilizó papel filtro Hawach BIO-40-125 y un embudo de vidrio para filtrar la muestra antes de almacenarla a 15°C dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

2.1.2. Preparación de la disolución del nitrato de plata (AgNO₃)

Las cinco disoluciones acuosas de nitrato de plata requeridas en el experimento se prepararon a partir de una solución madre 0.1 M (AgNO₃), se empleó un vidrio de reloj junto con una espátula para pesar los 0.4448 g de nitrato de plata en estado sólido Scharlau F.W.169.87 Lot N0. 1BD0542 dentro de la balanza analítica RADWAG AS 220.R2. Se procedió a disolver con agua destilada a temperatura ambiente hasta que se diluyó completamente en un vaso de precipitación, con la finalidad de verter está

solución dentro de un matraz volumétrico de 25 mL y aforarlo con la piseta de agua destilada hasta la altura del menisco.

Seguido, se prepararon las disoluciones acuosas de nitrato de plata mediante la aplicación de cálculos estequiométricos para determinar el volumen adecuado y obtener las siguientes concentraciones: 0.001 M, 0.002 M, 0.003 M, 0.004 M y 0.005 M.

2.1.3. Síntesis de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Una vez preparado el extracto *Psidium guayaquilensis* y las diferentes disoluciones de nitrato de plata (AgNO_3), se realizó la síntesis mediante una reacción espontánea a temperatura ambiente en un matraz volumétrico de 100 mL, aplicando la metodología de mezclar diversos volúmenes de extracto como se indica en la tabla 2.1. junto con 90 mL de cada una de las concentraciones de nitrato de plata especificados en cada ensayo.

Tabla 2.1 Ensayos de síntesis verde de nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Nº Ensayo	Cantidad de extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> [mL]	Concentración del nitrato de plata (AgNO_3) [M]
1	5 mL	0.001 M
2	5 mL	0.002 M
3	5 mL	0.003 M
4	5 mL	0.004 M
5	5 mL	0.005 M
6	10 mL	0.001 M
7	10 mL	0.002 M
8	10 mL	0.003 M
9	10 mL	0.004 M
10	10 mL	0.005 M
11	25 mL	0.001 M
12	25 mL	0.002 M
13	25 mL	0.003 M
14	25 mL	0.004 M
15	25 mL	0.005 M
16	50 mL	0.001 M
17	50 mL	0.002 M
18	50 mL	0.003 M
19	50 mL	0.004 M
20	50 mL	0.005 M

Estos ensayos se realizaron en una cámara oscura para disminuir las probabilidades de la fotoactivación del nitrato de plata (AgNO_3) (Tamilarasi & Meena, 2020). Además, el resultado de la síntesis se verificó de manera cualitativa por el cambio de coloración que presenta la reducción del ion plata Ag^+ a plata coloidal Ag^0 ; sin embargo, de manera cuantitativa se usó el espectrofotómetro de UV-Vis marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer para medir la absorbancia de cada muestra a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 24 horas con los parámetros de cada 1 nm de intervalo, desde una longitud de onda de 190.00 nm hasta 600.00 nm.

Luego de este proceso, se identificó la síntesis óptima para la formación de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) a 24 horas y se la replicó a mayor volumen para obtenerlas en estado sólido. El ensayo que se replicó fue con relación a 5 mL del extracto *Psidium guayaquilensis* y 90 mL de disolución de nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M; es decir, se utilizó 1000 mL de la solución de nitrato de plata (AgNO_3) con 55 mL del extracto de hojas a temperatura ambiente.

Para separar el solvente de la muestra se empleó la destilación, a través de un rotaevaporador BUCHI R-215, se calentó la muestra a 40°C , con una presión 30 mbar y una rotación de 95 rpm; utilizando la diferencia de puntos de ebullición y logrando la reducción del volumen de agua presente en la muestra.

A continuación, se centrifugó la muestra de nanopartículas sintetizadas a 4000 rpm en un tiempo de 10 minutos, con una centrifuga BIOBASE, luego se lavó la muestra con agua desionizada para eliminar la mayor cantidad de impurezas, procedimiento que se realizó 3 veces y se llevó la muestra en un crisol a la estufa con una temperatura de 105°C durante 16 horas. Finalmente, se almacenó las nanopartículas de plata (Ag-NPs) en un recipiente para ser pesadas en la balanza analítica RADWAG AS 220.R2.

2.2. Caracterización de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Las metodologías de caracterización se evaluaron con la colaboración de diferentes laboratorios presentes en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL): las técnicas de espectroscopia UV-visible (UV-Vis) y espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químico Instrumental de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas (LAQUINS); mientras

que, la técnica de difracción de rayos X (DRX) se emitió en el Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales (LEMAT).

2.2.1. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)

La técnica de espectroscopia UV-Visible (UV-Vis) requirió la muestra de la síntesis verde de nanopartículas de plata en suspensión a temperatura ambiente. El análisis se estableció en el espectrofotómetro de UV-Vis marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer con los parámetros especificados en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Parámetros ajustados en el espectrofotómetro para la caracterización UV-Visible (UV-Vis)

Parámetro	Valor ajustado por barrido
Modo de medición	Absorbancia
Longitud de onda de inicio	190.0 nm
Longitud de onda final	600.0 nm
Velocidad de barrido	Medio
Intervalo	1.0 nm

Durante cada barrido a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 24 horas se trabajó con una celda de cuarzo y el blanco empleado fue agua destilada. Además, fue necesario preparar una disolución de la muestra y se utilizó la relación 1 mL de la muestra con 9 mL de agua destilada para evitar la sobresaturación del equipo, obteniendo la gráfica que permitió identificar los grupos funcionales presentes en la molécula.

2.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La metodología de caracterización mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se utilizó para el análisis de los grupos funcionales químicos y sus vibraciones moleculares en diferentes regiones en una medición de absorbancia. Para el análisis se necesitó la muestra de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) en estado sólido y se identificó en el espectrofotómetro de infrarrojo marca Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10.

2.2.3. Difracción de rayos X (DRX)

El análisis de difracción de rayos X (DRX) se emitió en el Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales (LEMAT), perteneciente a las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). En esta metodología se entregó una muestra en estado sólido para la realización del análisis cualitativo haciendo referencia con los patrones de difracción de rayos X para las nanopartículas de plata (Ag-NPs).

Adicional, se determinó el tamaño aproximado promedio de las nanopartículas de plata a partir de la anchura de los picos formados en el difractograma de rayos X, según la ecuación de Debye-Scherrer

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

Donde: D = diámetro promedio de las nanopartículas, k = constante, λ = longitud de onda de rayos x, β = ancho medio máximo a (111) y θ = ángulo de Bragg (Krithiga et al., 2015)

2.3. Evaluación antifúngica de las nanopartículas frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Se gestionó trabajar con el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), perteneciente a las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.3.1. Cultivo del hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Se aplicó la metodología de reproducción en placas Petri con medio de agar de dextrosa de papa (PDA). La muestra del tejido necrosado infectada con el hongo se aisló de la colección del catálogo del CIBE, se procedió en una cámara de flujo laminar a verter en una placa Petri 2 mL de la muestra del hongo suspendido con 18 mL del medio de cultivo. Se incubó estas cajas de Petri a 28°C durante 20 días, para el ensayo se utilizaron dos cepas *pseudocercospora fijiensis* (Bioquímico Farmacéutico & Alexander Carrión Abad, 2015).

Para la obtención del micelio se preparó una disolución en tubos Falcón de la muestra cultivada, se introdujo 4 rulimanes esterilizados con un diámetro de 4 mm para realizar

la trituración por agitación durante 30 minutos y finalmente se filtró con una membrana porosa de 100 µm. Una vez obtenido se contó la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) con un microscopio marca Zeiss y un lente 10X, se colocó 10 µL del filtrado en una cámara de Neuvahuer y se anotaron los resultados para cada cepa (Bioquímico Farmacéutico & Alexander Carrión Abad, 2015).

2.3.2. Inoculación del hongo *Mycosphaerella fijiensis*

La evaluación de sensibilidad se la analizó en placas de Elisa, se estableció preparar las disoluciones para 100 ppm, 31.6 ppm, 10 ppm y 3.16 ppm utilizando el análisis por cuatuplicado para cada una de las cepas. En cada pocillo de la placa de Elisa se colocó 50 µL del hongo inoculo más 200 µL de PDB a las concentraciones planteadas para evaluar como se muestra en el esquema de distribución de la ilustración 2.1. (Chong, 2016).

Distribución de la placa de 96 pocillos												
Concentración	100 ppm	31.6 ppm	10 ppm	3.16 ppm	control 1	control 2	control 3	control 4				control +
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	C1	C2	C3	C4	PDB+HONGO	PDB	-	FUNG+M+H
B	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	C1	C2	C3	C4	PDB+HONGO	PDB	-	FUNG+M+H
C	CEPA1	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	C1	C2	C3	C4	PDB+HONGO	PDB	-	FUNG+M+H
D	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	CEPA 1	C1	C2	C3	C4	PDB+HONGO	PDB	-	FUNG+M+H
E	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	-	-	-	-	PDB+HONGO	-	-	FUNG+M+H
F	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	-	-	-	-	PDB+HONGO	-	-	FUNG+M+H
G	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	-	-	-	-	PDB+HONGO	-	-	FUNG+M+H
H	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	CEPA 2	-	-	-	-	PDB+HONGO	-	-	FUNG+M+H

Ilustración 2.1 Esquema de distribución de la placa de Elisa para la prueba de sensibilidad

En las columnas 5, 6, 7 y 8 de la placa de Elisa se establecieron para realizar los controles de cada concentración, se vertió el medio PDB más concentración del producto evaluar sin incluir el inoculo del hongo *Mycosphaerella fijiensis*. En la columna 9 se depositó el control de la muestra, contiene el medio PDB más el inoculo del hongo *Mycosphaerella fijiensis* sin concentración del producto (Chong, 2016).

De igual forma, en la columna 12 se utilizó como control positivo el fungicida agrícola comercial TERN con Registro Nacional 152 – F1/NA, se selló las placas y se rotularon para incubarlas a 28°C durante 7 días. Este procedimiento se realizó para evaluar la sensibilidad del extracto *Psidium guayaquilensis*, la disolución del nitrato de plata 0.005 M y las nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas (Chong, 2016).

2.3.3. Prueba de sensibilidad

Luego de su incubación durante 7 días, mediante el uso de un lector de microplacas, marca BioTek, modelo Synergy HT se evaluó la prueba de sensibilidad para identificar la propiedad inhibidora del extracto de hojas *Psidium guyaquilensis*, la disolución del nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M y las nanopartículas sintetizadas en disolución. Esta evaluación se verificó de forma cualitativa mediante el cambio de coloración de la muestra y cuantitativa por medio de los resultados del equipo.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados de este estudio fueron analizados para la comprobación de la obtención de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) mediante la caracterización por espectroscopia UV-Visible (UV-Vis), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (DRX). Como consecuencia, establecer la validez de la hipótesis basada en la inhibición del hongo *Mycosphaerella fijiensis* in vitro por la aplicación de diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata (Ag-NPs).

3.1. Síntesis de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

En los resultados cualitativos del proceso de síntesis verde se evidenció un cambio de coloración en cada una de las reacciones como se visualiza en la ilustración 3.1. Se observó en los 20 ensayos realizados (tabla 2.1) un cambio de coloración de amarillo, característico del extracto, a amarillo verdoso; luego de media hora transcurrida cambió el color a verde olivo, color final característico de la síntesis indicativo de que ha culminado la formación de la mayor parte de las nanopartículas de plata, según la referencia bibliográfica consultada confirma la reducción del ion plata Ag^+ a plata coloidal Ag^0 (Tamilarsi & Meena, 2020).

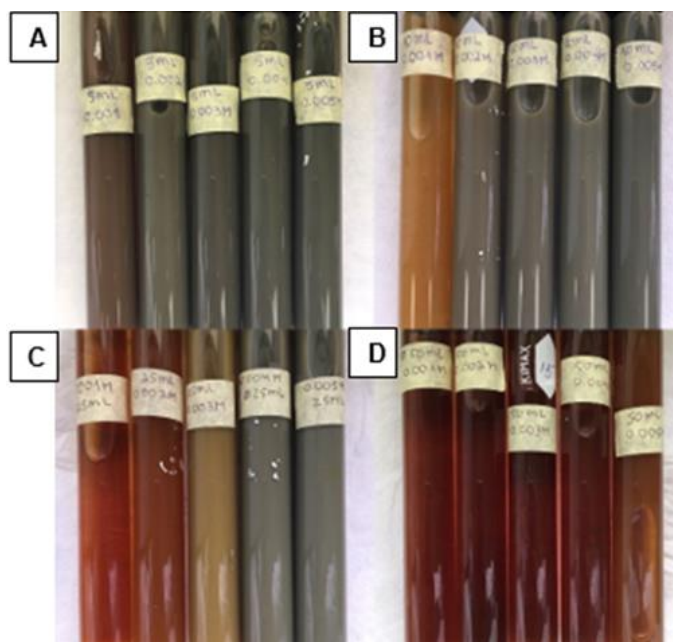


Ilustración 3.1 Colores visualizados en la síntesis verde de nanopartículas de plata

[A] 5 ml de extracto (N°ensayo 1-5), [B] 10ml de extracto (N°ensayo 6-10), [C] 25ml extracto (N°ensayo 11-15) y [D] 50 ml extracto (N°ensayo 16-20)

Adicional, los resultados para la optimización de la síntesis de manera cuantitativa mediante la identificación de la presencia de bandas de absorción características de las nanopartículas de plata estuvieron en un rango de longitudes de ondas desde 400 nm a 450 nm, durante el transcurso de 24 horas para cada uno de los ensayos propuestos como se muestra en la tabla 3.1. Con lo cual se logró la identificación que existe la presencia de una mayor absorbancia al emplear una disolución de nitrato de plata acuoso con una concentración de 0.005 M.

Tabla 3.1 Bandas de absorción del espectro UV-Vis en los ensayos de la síntesis de nanopartículas de plata

Nº Ensayo	Cantidad de extracto <i>Psidium guayaquilensis</i> [mL]	Concentración del nitrato de plata (AgNO_3) [M]	Absorbancia	Longitud de onda [nm]
1	5 mL	0.001 M	0.330	400.0 nm
2	5 mL	0.002 M	0.681	424.0 nm
3	5 mL	0.003 M	0.993	424.0 nm
4	5 mL	0.004 M	1.310	431.0 nm
5	5 mL	0.005 M	1.296	433.0 nm
6	10 mL	0.001 M	0.198	400.0 nm
7	10 mL	0.002 M	0.482	400.0 nm
8	10 mL	0.003 M	0.756	428.0 nm
9	10 mL	0.004 M	1.238	443.0 nm
10	10 mL	0.005 M	1.383	435.0 nm
11	25 mL	0.001 M	0.479	400.0 nm
12	25 mL	0.002 M	1.268	450.0 nm
13	25 mL	0.003 M	0.606	400.0 nm
14	25 mL	0.004 M	0.656	400.0 nm
15	25 mL	0.005 M	0.681	400.0 nm
16	50 mL	0.001 M	0.881	428.0 nm
17	50 mL	0.002 M	1.921	438.0 nm
18	50 mL	0.003 M	0.231	400.0 nm
19	50 mL	0.004 M	0.888	438.0 nm
20	50 mL	0.005 M	1.667	441.0 nm

De igual manera, en el estudio de la optimización de la síntesis verde a partir del extracto de hojas *Psidium guayaquilensis* se estableció que al utilizar un menor

volumen de extracto se favorece la formación de las nanopartículas de plata durante la reacción ecológica propuesta. Como resultados se reconoció la diferencia en las bandas de absorción de los espectros UV-Vis mostrados en la ilustración 3.2, ilustración 3.3, ilustración 3.4 e ilustración 3.5, correspondientes a los ensayos de 5 mL, 10 mL, 25 mL y 50 mL de extracto respectivamente; donde se verificó que la banda de absorción más prominente se formó al emplear 5 mL del extracto.

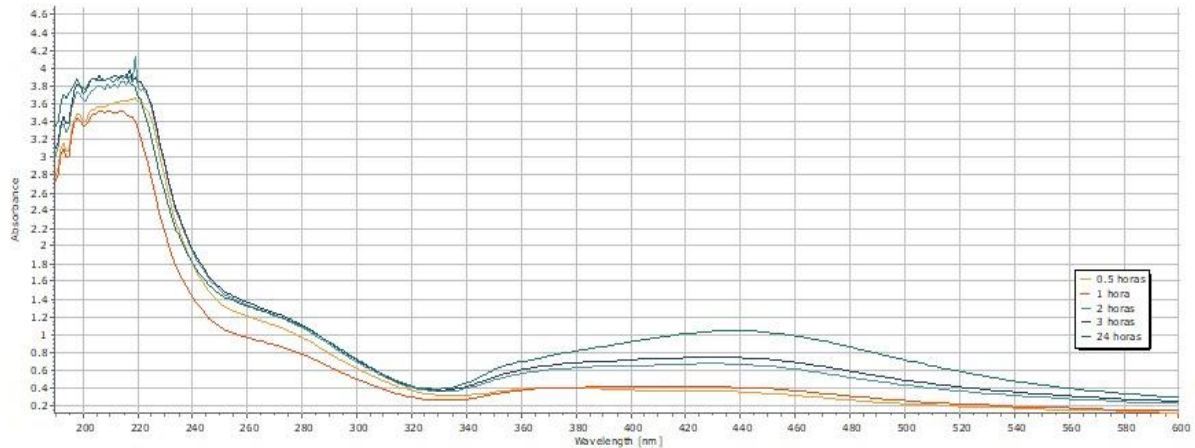


Ilustración 3.2 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 5 mL del extracto

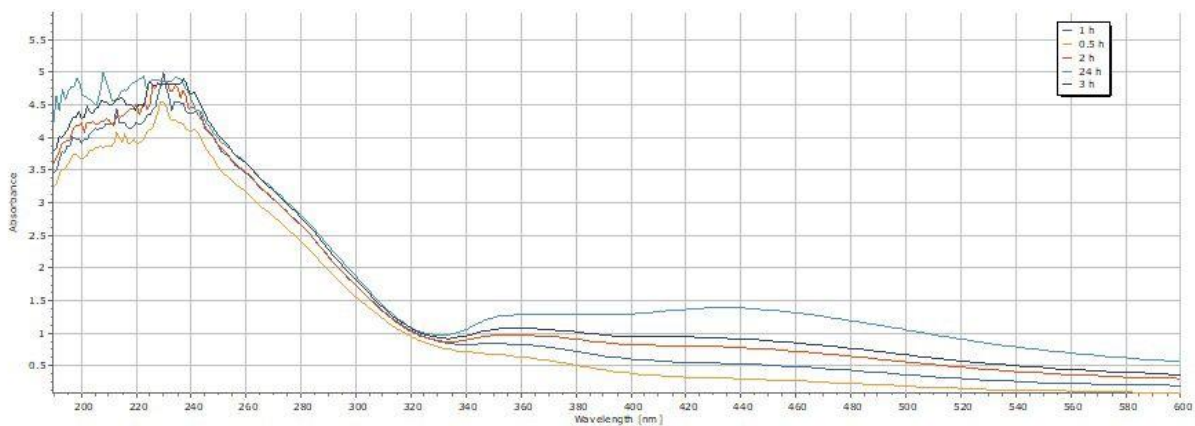


Ilustración 3.3 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 10 mL del extracto

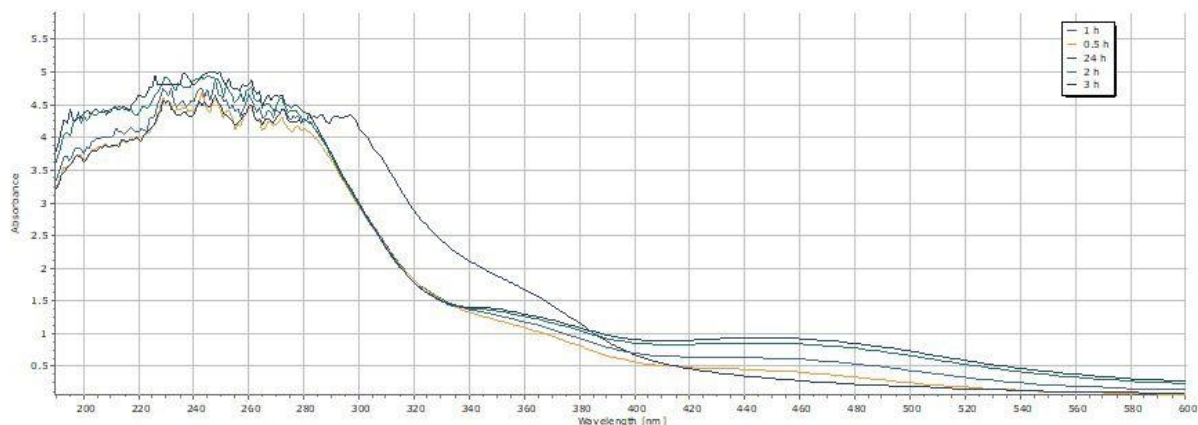


Ilustración 3.4 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 25 mL del extracto

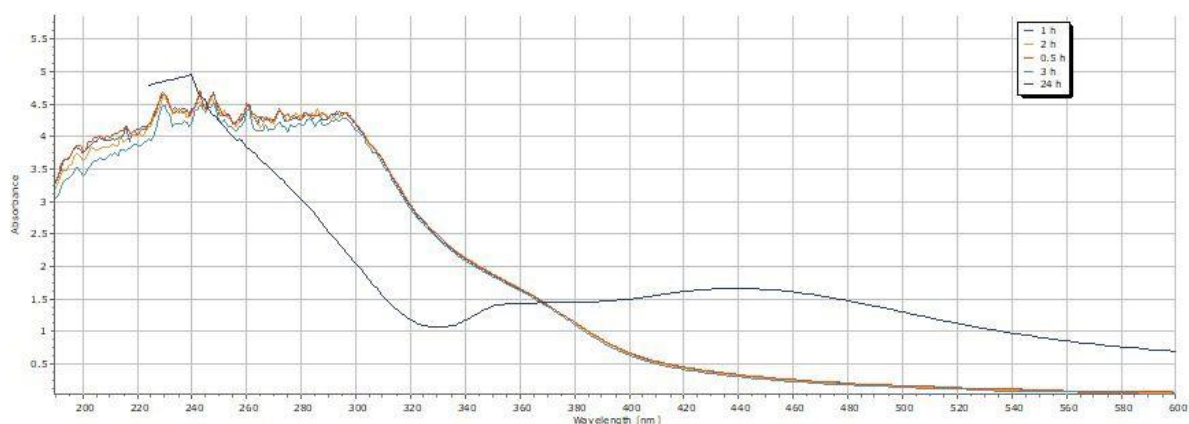


Ilustración 3.5 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata a partir de 50 mL del extracto

Una vez que se sintetizó y se corroboró la formación de las nanopartículas de plata, se cuantificó que el sólido brillante metálico obtenido, ilustración 3.6, tuvo un peso de 0.4228 g, lo cual indicó que el porcentaje de rendimiento de la síntesis verde mediante esta metodología es del 78.40% asumiendo que todo el nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M reacciona completamente en la producción de nanopartículas de plata (Ag-NPs).



Ilustración 3.6 Nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas en estado sólido

3.2. Caracterización de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Dentro del análisis, se establecieron diversas metodologías de caracterización para la identificación de la obtención de las nanopartículas, mediante el uso de instrumentos analíticos especializados que permitieron caracterizar el producto de la síntesis verde.

3.2.1. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)

En la ilustración 3.7 se encuentran los espectros UV-Visible de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas utilizando el nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M con la variación del volumen del extracto de la hoja, 5 mL, 10 mL, 25 mL y 50 mL. Se determinó que existe una mayor absorción al emplear 5 mL del extracto *Psidium guayaquilensis*; es decir, el pico de absorción disminuye con el aumento de la concentración del extracto como se indica en estudios previos realizados acerca de la síntesis de nanopartículas utilizando un extracto de hojas (Tamiliarasi & Meena, 2020).

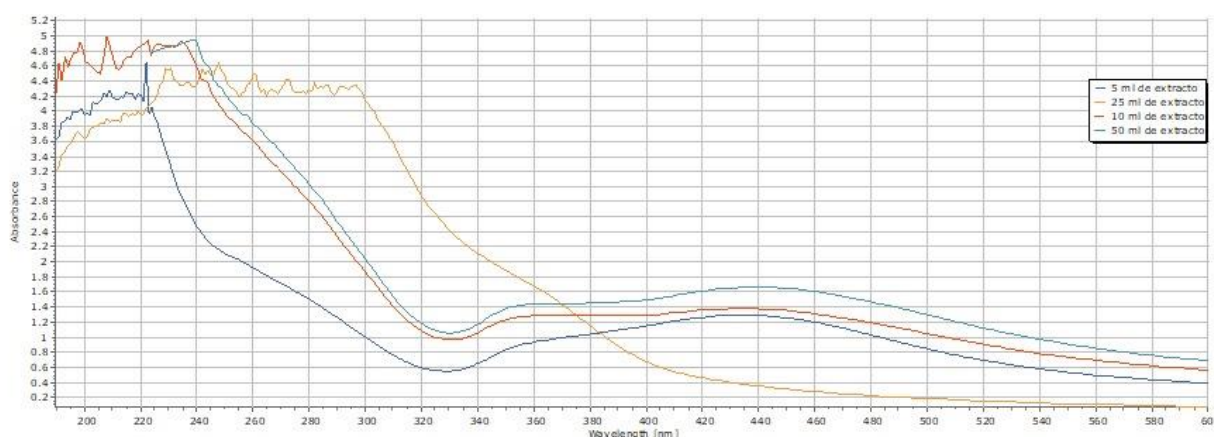


Ilustración 3.7 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata considerando la variación del volumen de extracto

Según los datos obtenidos en el espectro UV-Visible que presentó la muestra de la síntesis optimizada al utilizar 55 mL del extracto *Psidium guayaquilensis* con 1000 mL de la disolución de nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M, la característica de resonancia del plasmón superficial presentó bandas de absorción pronunciadas, cuya longitud de onda fue de 438.0 nm y la absorbancia igual a 1.046. Adicional, se analizó como incrementó el pico de absorbancia a lo largo de la longitud de onda conforme incrementa el tiempo de reacción, con lo cual se identificó el avance de formación del plasmón superficial durante la síntesis de las nanopartículas de plata (Ag-NPs).

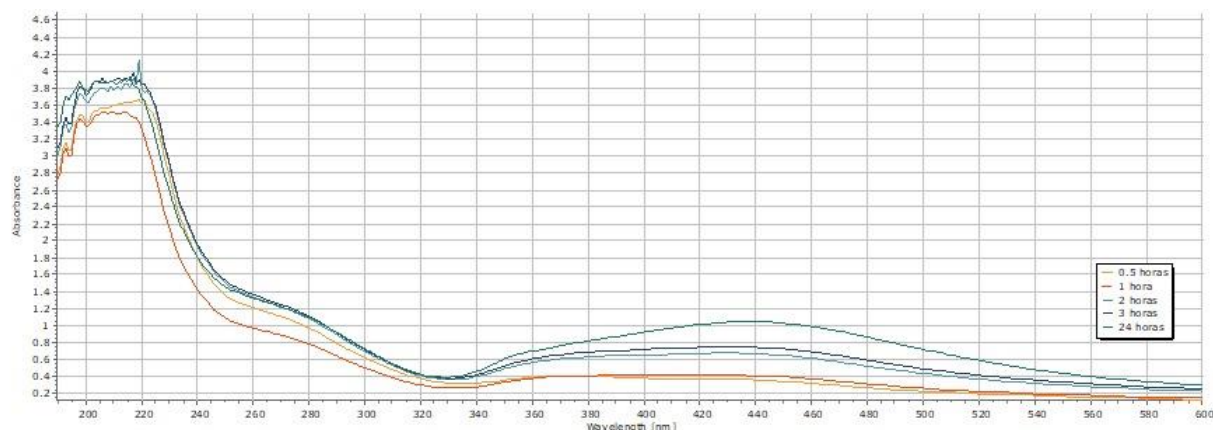


Ilustración 3.8 Espectro UV-Visible de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Por otro lado, en el espectro UV-Visible de la ilustración 3.9, se examinó que la longitud de onda y absorbancia que poseen el extracto *Psidium guayaquilensis* y el nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M son menores en comparación con las nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas. La máxima absorción se presentó 440 nm para las nanopartículas, en consecuencia, que el extracto de la hoja alarga su longitud de onda y amplía el ancho desplazándose en dirección de las otras dos concentraciones, lo cual favoreció el incremento del tamaño de la partícula (Tamilarasi & Meena, 2020).

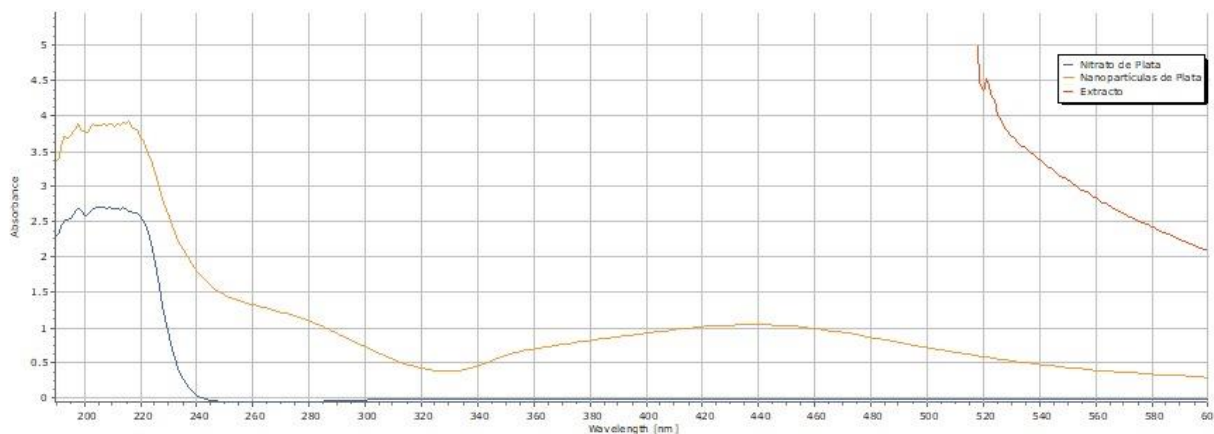


Ilustración 3.9 Espectro UV-Visible (UV-Vis) del extracto *Psidium guayaquilensis*, nitrato de plata (AgNO_3) 0.005 M y las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

3.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En el presente espectro FT-IR se determinó los grupos funcionales químicos que se encuentran en las diferentes regiones de absorbancia, se evaluó que el extracto

Psidium guayaquilensis posee en su estructura los grupos funcionales que permitieron la reducción y estabilización de las nanopartículas.

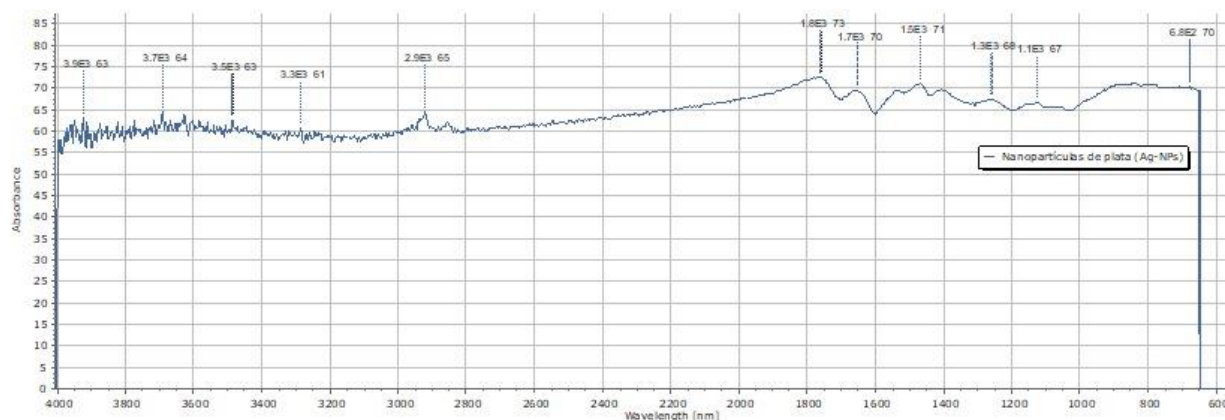


Ilustración 3.10. Espectro infrarrojo (FT-IR) de las nanopartículas de plata sintetizadas

Como resultado de este análisis, según las bandas que se observaron en el espectro FT-IR, ilustración 3.10, se pudo especificar que los grupos funcionales presentes en la muestra son los que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Bandas de absorción identificadas en el espectro FT-IR (Pérez-marroquín et al., 2021)

Nº Banda	Longitud de onda [cm^{-1}]	Absorbancia	Grupo funcional químico
1	3922 cm^{-1}	63.00	Alcoholes (O-H t)
2	3689 cm^{-1}	64.00	Aminas (N-H t)
3	3583 cm^{-1}	63.00	Amidas (N-H t)
4	3330 cm^{-1}	61.00	Alquinos (C-H t), acetilénico
5	2921 cm^{-1}	65.00	Alcanos (C-H t)
6	1803 cm^{-1}	73.00	Anhídridos (C=O t)
7	1735 cm^{-1}	70.00	Ésteres (C=O t)
8	1500 cm^{-1}	71.00	Aminas (N-H d)
9	1386 cm^{-1}	68.00	Grupo nitro (-NO ₂), alifáico
10	1132 cm^{-1}	67.00	Aminas (C-N t), alquil
11	680 cm^{-1}	70.00	Haluros de alquilo (C-Cl t)

3.2.3. Difracción de rayos X (DRX)

Se determinó la fase cristalina del sólido limpio mediante la técnica analítica de difracción de rayos X, el difractograma de la ilustración 3.11, expuso una serie de reflexiones que corresponden a cristales de la plata metálica. Las posiciones angulares

que se formaron con mayor fuerza a 2theta estuvieron localizadas en 38°, 44°, 53° y 76°, lo que corresponde a una estructura cúbica centrada en las caras de la plata elemental (Martinez et al., 2013). Lo que confirmó la presencia de las nanopartículas de plata.

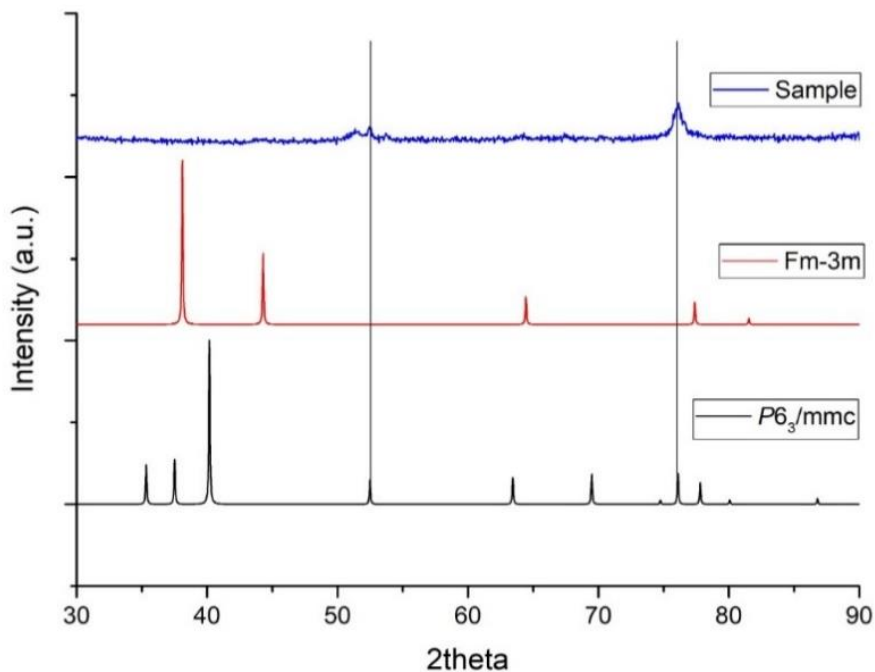


Ilustración 3.11 Difractograma de rayos X de las nanopartículas de plata sintetizadas

Mediante la ecuación de Debye-Scherrer, como se indica en la tabla 3.3, se calculó que el tamaño promedio aproximado de las nanopartículas obtenidas mediante síntesis verde fue de 29.15 nm. El tamaño obtenido estuvo dentro del rango entre 10 nm y 100 nm, el cual es esperado para las nanopartículas de plata con un alto poder contra virus, hongos y bacterias (Krithiga et al., 2015).

Tabla 3.3 Determinación del tamaño promedio aproximado de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Variable	Valor	Unidades
Constante K	0.94	-
Longitud de onda	1.54E-10	m
β	0.30	grados
2θ	38	grados
θ	19	grados
Diámetro (D)	29.15	nm

3.3. Propiedad antifúngica de las nanopartículas de plata frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

En la inhibición in vitro del hongo *Mycosphaerella fijiensis* con las nanopartículas de plata (Ag-Nps), se afirmó que la hipótesis inicial del estudio es válida. Sin embargo, los resultados de la prueba de sensibilidad fueron diferentes para cada uno de los reactivos de forma cualitativa y cuantitativa.

3.3.1. Cultivo del hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Respecto al cultivo del hongo, una vez transcurrido los 20 días de incubación dentro de las cajas Petri, se determinó que las *pseudocercosporas fijiensis* no tienen un crecimiento radial, sino que se presentan en forma de ramificaciones agrupadas como se muestra en la ilustración 3.12.



Ilustración 3.12 Hongo *Mycosphaerella fijiensis* incubado en caja Petri con medio de cultivo de agar de dextrosa de papa (PDA)

La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) determinadas en la cámara de Neuvahuer para la cepa 1, cuya nomenclatura utilizada fue F4A2 resultó igual a 9.35×10^6 (UFC/ml); mientras que, la cepa 2, con nomenclatura F5A3 fue de 1.8×10^6 (UFC/ml).

3.3.2. Prueba de sensibilidad

3.3.2.1. Prueba de sensibilidad del extracto *Psidium guayaquilensis*

La prueba de sensibilidad del extracto *Psidium guayaquilensis*, de forma cualitativa no presentó tener las características requeridas para inhibir el hongo *Mycosphaerella*

fijiensis, como resultado luego de los seis días el hongo se proliferó en los pocillos de la placa de Elisa de todas las concentraciones, 100 ppm, 31.60 ppm, 10 ppm y 3.16 ppm en mayor proporción con referencia a sus respectivos controles como se muestra en la ilustración 3.13.

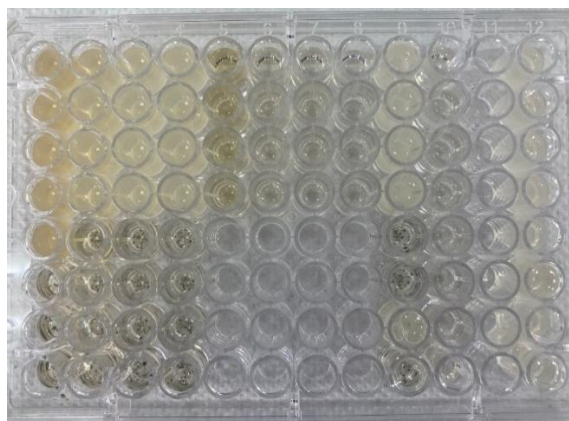


Ilustración 3.13 Propiedad inhibidora del extracto *Psidium guayaquilensis* frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

También, este resultado se visualizó en el lector de microplacas, el color rojo en las celdas de la ilustración 3.14 indican que es más prominente la presencia del hongo en las columnas donde se vertió el extracto de las hojas (1 hasta la 4) en comparación con las columnas de control (5 hasta la 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
B	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
C	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
D	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
E	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
F	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
G	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
H	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████

Ilustración 3.14 Bitmap de la prueba del extracto *Psidium guayaquilensis* frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Estos resultados se corroboraron con el análisis cuantitativo, cuyos resultados mostrados en la ilustración 3.15 especificaron que el extracto por la cantidad de proteínas y grupos funcionales que posee disminuye el poder de mortalidad del hongo; por el contrario, aumenta su proliferación pues realiza la función de concentrar más el medio de cultivo empleado (Bioquímico Farmacéutico & Alexander Carrión Abad, 2015). De manera estadística, estos datos al presentar una desviación estándar menor, se logró identificar que cada uno de los datos de forma individual se encuentran

cercanos a la media y no poseen una mayor dispersión respecto a la media de distribución.

Concentración	100 ppm	31.6 ppm	10 ppm	3.16 ppm
Réplica 1	0.6750	0.3680	0.1980	0.1370
Réplica 2	0.3540	0.2940	0.1670	0.1650
Réplica 3	0.3270	0.2070	0.1950	0.1900
Réplica 4	0.2880	0.2320	0.2390	0.1201
Promedio	0.4110	0.2753	0.1998	0.1530
Desviación estándar	0.1781	0.0718	0.0297	0.0309
%Crecimiento	178%	127%	102%	31%

Ilustración 3.15 Resultados del extracto *Psidium guayaquilensis* frente a la cepa 2 (F5A3)

3.3.2.2. Prueba de sensibilidad del nitrato de plata (AgNO_3)

Los resultados del análisis cualitativo en la prueba de sensibilidad de las diferentes concentraciones, 100 ppm, 31.60 ppm, 10 ppm y 3.16 ppm de la disolución acuosa del nitrato de plata (AgNO_3) fueron positivos, se inhibió el hongo que provoca Sigatoka negra en las plantaciones de banano como se vio en la ilustración 3.16. Esto se observó en el bitmap del lector de microplacas correspondiente a la ilustración 3.17, en donde el color azul es más prominente en los pocillos con la presencia de las disoluciones (columnas 1,2,3 y 4), en relación con las columnas del control (columnas 5,6,7 y 8).

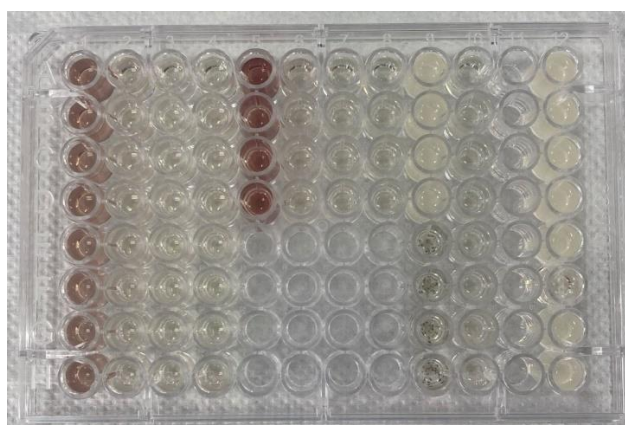


Ilustración 3.16 Propiedad inhibidora del nitrato de plata (AgNO_3) frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Ilustración 3.17 Bitmap de la prueba del nitrato de plata (AgNO_3) frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

De manera cuantitativa ilustración 3.18, se determinó que el porcentaje de inhibición decrece a medida que disminuye la concentración de la disolución utilizada para la inhibición de la cepa 2 (F5A3), perteneciente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Sin embargo, en los datos se puede visualizar que existe la contaminación de una de las muestras in vitro con lo que se generó un dato erróneo al considerar el promedio global, de esta forma es importante utilizar una mayor cantidad de réplicas para disminuir el porcentaje de error del estudio. Utilizando el análisis estadístico se determinó que los datos poseen una dispersión menor a 0.1, valor cercano a 0; por lo tanto, los datos se encuentran muy cercanos a la media.

Concentración	100 ppm	31.6 ppm	10 ppm	3.16 ppm
Réplica 1	0.0520	-0.0080	-0.0150	-0.0220
Réplica 2	0.0679	0.0150	0.0180	0.0100
Réplica 3	0.0830	0.0199	0.0450	0.0460
Réplica 4	0.0720	0.0279	0.0380	0.0530
Promedio	0.0688	0.0138	0.0215	0.0218
Desviación estándar	0.0128	0.0155	0.0269	0.0347
%Inhibición	47%	89%	84%	83%

Ilustración 3.18 Resultados del extracto del nitrato de plata (AgNO_3) frente a la cepa 2 (F5A3)

3.3.2.3. Prueba de sensibilidad de las nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Finalmente, en la evaluación cualitativa (ilustración 3.19) se obtuvo un resultado positivo a la inhibición del hongo frente a las nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas, con lo cual se afirmó la hipótesis planteada que las nanopartículas metálicas tienen propiedades antifúngicas que logran disminuir la proliferación del hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Con ello se confirmó que el precursor de la reacción es la disolución de nitrato de plata que inicialmente posee un efecto inhibitorio y al

mezclarse con el extracto *Psidium guayaquilensis* se incrementa el porcentaje de inhibición, esto se validó con los resultados del lector de microplacas (ilustración 3.20).

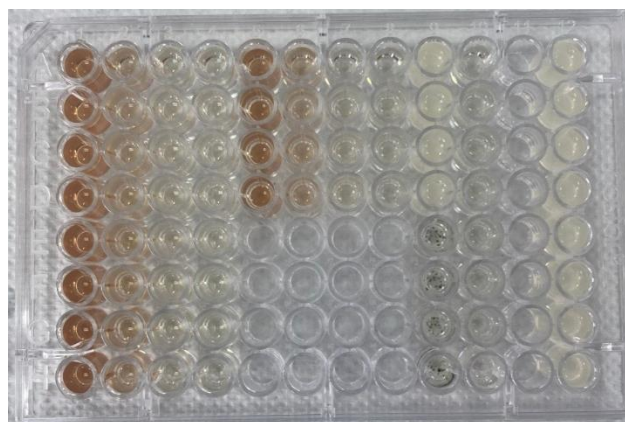


Ilustración 3.19 Propiedad inhibidora de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
B	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
C	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
D	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
E	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
F	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
G	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████
H	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████	████████

Ilustración 3.20 Bitmap de la prueba de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Según los datos obtenidos mostrados en la ilustración 3.21, se cuantificó que el porcentaje de inhibición de las nanopartículas aumenta al incrementar su concentración durante la técnica de evaluación. Sin embargo, la tendencia de los resultados presenta una inconsistencia por las pocas réplicas que fueron realizadas, teniendo en consideración que al aumentar la cantidad de datos es posible disminuir la desviación estándar de los resultados y tener un resultado más preciso.

Concentración	100 ppm	31.6 ppm	10 ppm	3.16 ppm
Réplica 1	-0.1940	-0.0340	-0.0560	-0.0020
Réplica 2	-0.0830	0.0480	0.0310	0.0069
Réplica 3	-0.1230	0.0480	0.0110	0.0460
Réplica 4	-0.1090	0.0530	0.0120	0.0590
Promedio	-0.1273	0.0288	-0.0005	0.0275
Desviación estándar	0.0475	0.0419	0.0381	0.0296
%Inhibición	228%	76%	105%	74%

Ilustración 3.21 Resultados de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) frente a la cepa 2 (F5A3)

3.4. Análisis de costo

La implementación de este proyecto se evaluó a escala de laboratorio, de tal forma que el análisis de costo está considerado a nivel microescala para corroborar la hipótesis planteada de la inhibición del hongo *Mycosphaerella fijiensis* mediante aplicación de las nanopartículas de plata (Ag-NPs) sintetizadas ecológicamente.

En cuanto a la preparación del extracto *Psidium guayaquilensis*, no representa un costo económico al utilizar como materia prima la hoja del árbol perteneciente a esta especie junto al solvente universal, agua destilada. Su metodología de obtención no representó costos significativos, al emplear la filtración como método de separación entre el sólido y el líquido.

Por otro lado, en la síntesis verde se utilizó como reactivo primordial al nitrato de plata cristalizado al ser el precursor dentro de la reacción empleada. Según, el proveedor SCIENCECompany el costo de 25 g del reactivo es \$50.00; sin embargo, para realizar el estudio se utilizó aproximadamente 1 g.

Para la identificación de las estructuras presentes en la muestra, se cotizó el valor de las caracterizaciones en las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Laboratorio de Análisis Químico Instrumental (LAQUINS) y Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales (LEMAT). Estos valores varían de acuerdo con la cantidad de análisis que se requieran en el estudio planteado como se muestra en la tabla 2.1.

Finalmente, en el proceso de evaluación de la propiedad antifúngica, se utilizó para el control positivo como reactivo el fungicida agrícola comercial TERN con un costo \$44.00. Adicional, según el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) la prueba de sensibilidad representa aproximadamente \$150.00 por la cantidad de materiales y equipos que se requieren en la evaluación; sin embargo, el costo real de estas pruebas se las cotiza usualmente en base a las descargas de ascospomad.

Tabla 3.4 Costos de implementación del estudio a microescala

Parámetro	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Reactivos:			
Nitrato de plata	25 g	\$ 50.00	\$ 50.00
Fungicida comercial TERN	1 L	\$ 44.00	\$ 44.00
TOTAL EN REACTIVOS		\$ 94.00	
Análisis:			
Caracterización Espectroscopia Uv-Vis	20	\$ 10.00	\$ 200.00
Caracterización Espectroscopia FT-IR	1	\$ 60.00	\$ 60.00
Caracterización Difracción Rayos X	1	\$ 196.00	\$ 196.00
Prueba de sensibilidad antifúngica	1	\$ 150.00	\$ 150.00
TOTAL EN ANÁLISIS		\$ 606.00	
COSTO ESTUDIO		\$ 700.00	

En relación con el valor económico que generó la exportación de banano en el año 2021 de UDS 3.181 millones, el costo de implementación del presente estudio es relevante y significativo para erradicar las plagas que disminuyen la calidad del fruto. Esta metodología difiere de las técnicas utilizadas, como el uso de fertilizantes comerciales agrícolas por los beneficios ambientales al disminuir los contaminantes que afectan la salud del ser humano.

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de un extracto de hojas de *Psidium guayaquilensis*. Se aplicaron tres métodos de caracterización, con los que se comprobó analizando sus espectros que el producto obtenido fueron nanopartículas de plata. Con ello, se logró verificar la hipótesis propuesta gracias a pruebas de sensibilidad inhibidora de las nanopartículas de plata en placas de Elisa, en el que participaron dos cepas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en disolución. Las pruebas generaron resultados positivos, ya que exhiben una excelente actividad antifúngica contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Se resalta que la metodología que se utilizó tiene un impacto ambiental mínimo debido a las condiciones en las que se realizó la síntesis.
- A partir de la metodología propuesta para la realización de una síntesis verde, se validó la rápida reacción entre el extracto de hojas de *Psidium guayaquilensis* y el precursor nitrato de plata, gracias a los cambios de coloración. Se identificó que al agregar un volumen mayor de extracto de *Psidium guayaquilensis* y una menor concentración de nitrato de plata en la mezcla de reacción, la formación de nanopartículas de plata se ve disminuida y puede incluso no reaccionar. Así mismo, al agregar un volumen menor de extracto de *Psidium guayaquilensis* y una mayor concentración de nitrato de plata en la mezcla de reacción, esta se ve favorecida. De esta manera, se escogieron las cantidades idóneas para la formación de nanopartículas de plata siendo 1000 mL de nitrato de plata y 55 mL de extracto de hojas de *Psidium guayaquilensis*. Además, se determinó que la metodología aplicada genera un porcentaje de rendimiento teórico de 78.40% con un tiempo de reacción de 24 horas, garantizando que el proceso es confiable y reproducible.
- Los métodos de caracterización para las nanopartículas de plata permitieron comparar longitud de onda, grupos funcionales, y posiciones angulares con las gráficas de espectroscopia UV-Vis, espectroscopia infrarroja de transformada de

Fourier y difracción de rayos X respectivamente. Se comparó los valores generados por cada uno de los equipos analíticos con la bibliográfica existente. De esta manera, se comprobó que todos los resultados mostraron características para las nanopartículas de plata cuyo tamaño promedio aproximado fue de 29.15 nm.

- En la prueba de sensibilidad de las nanopartículas de plata en disolución contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, se determinó que exhiben una excelente actividad antifúngica. Debido a que el análisis cuantitativo de las pruebas in vitro realizadas mostraron un porcentaje de inhibición del 74% y 105% al utilizar concentraciones de 3.16 ppm y 10 ppm, respectivamente. De esta forma, se evidencia que a partir de 10 ppm de la disolución de nanopartículas sintetizadas se puede afirmar que las colonias del hongo serán eliminadas.
- A partir del análisis económico se determinó la rentabilidad del proyecto de investigación a escala laboratorio. En la elaboración de una síntesis de nanopartículas de plata respetuosa con el medio ambiente y su posterior prueba de sensibilidad inhibidora contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Se generó un costo total de \$700 debido a que la metodología utiliza de forma innovadora las hojas de *Psidium guayaquilensis*. Por ello, fue necesario utilizar tres métodos de caracterización para comprobar la obtención del producto deseado. Sin embargo, debido a la importancia que posee el sector bananero y el beneficio de la agroindustria, se considera bajo el costo total generado por el estudio.

4.2. Recomendaciones

- Se aconseja la aplicación de la metodología descrita con la implementación de la posterior evaluación del tamaño de las nanopartículas de plata, con las técnicas de análisis instrumental microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), para conocer el tamaño real de las nanopartículas de plata obtenidas ya que de ello depende su capacidad antifúngica.
- Se invita a futuros ingenieros químicos de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas (FCNM) a seguir investigando sobre la capacidad antifúngica de las nanopartículas de plata. Evaluando a otros hongos que atacan a frutas de

importancia mundial en Ecuador como el cacao, el banano, entre otros. De esta manera se determina la aplicación que podría tener el producto sintetizado.

- Se sugiere en investigaciones venideras realizar pruebas de campo en zonas afectadas por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra). Realizar la aplicación de las nanopartículas de plata previamente sintetizadas, a las concentraciones en las que se logró un mayor porcentaje de inhibición del hongo in vitro, para estudiar el comportamiento del producto en plantaciones de banano in vivo.
- Se recomienda al momento de realizar una réplica del experimento, en la prueba de sensibilidad de las nanopartículas de plata en disolución contra hongo *Mycosphaerella fijiensis*, realizar las repeticiones necesarias, para que permitan obtener datos estadísticos confiables.

BIBLIOGRAFÍA

- Amadike, E., Emmanuel, O., Ebubechi, M., Dike, E., Chukwuebuka, B., Ibe, C., Chibueze, V., Nwabu, C., & Chinyere, O. (2022). The ethnobotanical , phytochemistry and pharmacological activities of *Psidium guajava* L . *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5), 103759. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103759>
- Bioquímico Farmacéutico, D., & Alexander Carrión Abad, B. (2015). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA "Calidad, Pertinencia y Calidez." UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO "ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL COMPLEJO ORGÁNICO ACTIVFOL.*
- Chong, P. A. (2016). *The origin, versatility and distribution of azole fungicide resistance in the banana black Sigatoka pathogen Pseudocercospora fijiensis a.*
- Dahlous, K. A., Abd-elkader, O. H., Fouda, M. M. G., Al, Z., & El-faham, A. (2019). Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Eco-friendly method for silver nanoparticles immobilized decorated silica: Synthesis & characterization and preliminary antibacterial activity. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 95, 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.07.020>
- Dam, P., Paret, M. L., Mondal, R., & Mandal, A. K. (2020). Advancement of noble metallic nanoparticles in agriculture---a promising future: A review. *PEDOSPHERE*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.06.026>
- Gómez, F. (2016). Nanopartículas metálicas y sus aplicaciones. *Revista Digital Innovación y Ciencia*, 1–11.
- Huang, J., Li, C., Ma, J., Xu, K., Chen, X., Jiang, J., & Zhang, D. (2021). Phytochemistry Chemical constituents of *Psidium guajava* leaves and their antibacterial activity. *Phytochemistry*, 186(March), 112746. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112746>
- Jan, H., Zaman, G., Usman, H., Ansir, R., Drouet, S., Gigliolo-guivarc, N., Hano, C., & Haider, B. (2021). Biogenically proficient synthesis and characterization of silver nanoparticles (Ag-NPs) employing aqueous extract of *Aquilegia pubiflora* along with

- their in vitro antimicrobial , anti-cancer and other biological applications. *Journal of Materials Research and Technology*, 15, 950–968. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.048>
- Kong, Y., Ahmad, B., Al-sadoon, M. K., & Fahad, M. (2021). Novel green synthesis , chemical characterization , toxicity , colorectal carcinoma , antioxidant , anti-diabetic , and anticholinergic properties of silver nanoparticles: A chemopharmacological study. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(6), 103193. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103193>
- Krithiga, N., Rajalakshmi, A., & Jayachitra, A. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Leaf Extracts of Clitoria ternatea and Solanum nigrum and Study of Its Antibacterial Effect against Common Nosocomial Pathogens . *Journal of Nanoscience*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/928204>
- Liu, J., Yu, S., Yin, Y., & Chao, J. (2012). Methods for separation , identification , characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*, 33, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.10.010>
- Lorena, C., Ressaissi, A., & Luísa, M. (2022). *Bioactives from Psidium guajava leaf decoction: LC-HRMS-MS-Qtof identification , bioactivities and bioavailability evaluation*. 1(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.focha.2021.100003>
- Mahendran, N., Anand, B., Rajarajan, M., Muthuvel, A., & Mohana, V. (2022). Materials Today : Proceedings Green synthesis , characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles using Cissus quadarangularis leaf extract. *Materials Today: Proceedings*, 49, 2620–2623. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.043>
- Martinez, F., Zuñiga, E., & Lafarga, A. K. (2013). Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 6(10), 101–108.
- Nadar, G., Chackaravarthi, G., Ramachandran, G., & Li, W. (2022). Journal of King Saud University – Science Synthesis of silver nanoparticle (Ag-NPs) using phytochemical rich medicinal plant Lonicera japonica for improve the cytotoxicity effect in cancer cells. *Journal of King Saud University - Science*, 34(2), 101798. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101798>

- Patil, R. B., & Chougale, A. D. (2021). Materials Today : Proceedings Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles : A brief review. *Materials Today: Proceedings*, 47, 5520–5532. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.384>
- Pérez-marroquín, X. A., García-hernández, L., Aguirre-cruz, G., & Rafael, G. (2021). *Caracterización de nanopartículas de plata sintetizadas por vía verde* Characterization of silver nanoparticles synthesized by green alternative. 7(13), 16–19.
- Rajput, R., & Kumar, K. (2021). Materials Today : Proceedings Protective effect of ethanolic extract of guava leaves (*Psidium guajava* L.) in alloxan-induced diabetic mice. *Materials Today: Proceedings*, 47, 437–439. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.617>
- Tamilarasi, P., & Meena, P. (2020). Materials Today : Proceedings Green synthesis of silver nanoparticles (Ag-NPs) using *Gomphrena globosa* (Globe amaranth) leaf extract and their characterization. *Materials Today: Proceedings*, 33, 2209–2216. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.025>