



FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

Universidad Nacional de La Pampa



**“EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS A
PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES, FRENTE
AL FITOPATÓGENO FUSARIUM
GRAMINEARUM”.**



Occhipinti Angela

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA EN QUÍMICA.**

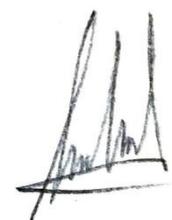
SANTA ROSA, LA PAMPA

ARGENTINA

2023

Prólogo

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciada en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en los laboratorios de Química Orgánica y Microbiología Dependiente del departamento de Química Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre el 4 de mayo de 2020 y el 4 de mayo de 2023, bajo la dirección de Scoles Gladis y bajo la codirección de Castaño Carolina.



Firma Angela Occhipinti

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las siguientes personas, animales e instituciones:

Mi Directora Gladis Scoles, Co-Directora Carolina Castaño, Silvia Pattacini y Katia Durán por todo el apoyo y cariño que me han brindado, no solo en la realización de la tesis, sino también a lo largo de la carrera.

A la Universidad Pública.

A mi familia por el apoyo incondicional.

A mi compañero de vida por todo el apoyo y cariño.

A mis mascotas por la compañía que me han dado en todas esas mañanas y tardes de escritura de tesis.

A mis amigas por todo el apoyo que me han dado.

Al INTA Anguil por brindarnos al hongo *F. graminearum* para la realización de la tesis.

Muchas gracias a todos/as por haber sido parte de este hermoso proceso y parte de mi vida.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN	8
1 Plantas aromáticas	8
1.1 Importancia de las plantas aromáticas.	8
1.2 Tratamientos post-cosecha.....	9
1.3 Extractos y preparados vegetales	12
1.4 Tamizaje fitoquímico	13
2 Nanotecnología	14
2.1 Nanopartículas	16
2.2 Nanopartículas de plata	17
2.3 Aplicaciones de Nanopartículas de Plata	18
2.4 Síntesis de nanopartículas.....	19
2.5 Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas.	22
3 Fusarium graminearum	25
3.1 Interacción Fusarium-planta	25
3.2 Defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3 Modo de acción de las nanopartículas frente a fitopatógenos.	26
HIPÒTESIS.....	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÈTODOS	28
4 Síntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales.....	28
4.1 Recolección de especies vegetales y su tratamiento:.....	28
4.2 Obtención de extractos hidroalcohólicos:	28
4.3 Tamizaje fitoquímico:.....	28
4.4 Síntesis de AgNPs:	29
4.5 Caracterización:.....	29
5 Bioensayos frente a <i>F. graminearum</i> :	30

RESULTADOS	31
6 Ensayos fitoquímicos de las especies vegetales:.....	31
7 Caracterización de las nanopartículas de plata:.....	32
8 Efecto de las AgNPs frente al hongo <i>Fusarium graminearum</i> :	34
CONCLUSIÓN	38
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
ANEXO A.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de tamaños de diferentes compuestos.	15
Figura 2: Formas típicas de nanocristales metálicos.....	16
Figura 3. Mecanismos sugeridos sobre la acción bactericida de las nanopartículas de plata en diferentes microorganismos.	17
Figura 4. Esquema de las distintas estrategias para la síntesis de nanoestructuras.	19
Figura 5. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción química en disolución de la sal AgNO_3	21
Figura 6. Espectros de absorción de las AgNPs.	33
Figura 7. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), de las diferentes AgNPs.....	34
Figura 8. AgNPs sintetizadas a partir de ácido ascórbico y citrato de potasio.....	35
Figura 9. AgNPs sintetizadas a partir de falso girasol 0,1 M	35
Figura 10. AgNPs sintetizadas a partir de pichana 10^{-2}M	35
Figura 11. AgNPs sintetizadas a partir de romero 0,1 M.	35
Figura 12. Porcentaje de crecimiento de <i>F. graminearum</i>	37
Figura 13. Porcentaje de inhibición de <i>F. graminearum</i>	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de la mezcla para la preparación de nanopartículas.	29
Tabla 2. Resultados de los ensayos fitoquímicos de las especies.	31

RESUMEN

La síntesis de nanopartículas a partir de metabolitos procedentes de extractos de vegetales es considerada un método sustentable y amigable con el medio ambiente. En este trabajo se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de las especies aromáticas romero (*Rosmarinus officinalis*); pichana (*Baccharis spartioides*) y falso girasol (*Helianthus petiolaris*), los cuales fueron los agentes reductores utilizados para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). El tamizaje fitoquímico permitió determinar presencia de terpenos, alcaloides, taninos y flavonoides. Luego de la caracterización de las AgNPs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), la cual mostró la formación de nanopartículas de morfología circular con un tamaño en el intervalo de 16,6 a 24,3 nm se analizó la actividad biológica de las mismas frente al hongo *Fusarium graminearum*, patógeno del trigo en la región Pampeana, causante de la enfermedad conocida como fusariosis de la espiga o golpe blanco. Del análisis de los resultados se concluye que las AgNPs sintetizadas a partir de las especies de falso girasol y pichana resultan potencialmente antifúngicas frente al hongo *Fusarium graminearum*.

ABSTRACT

The nanoparticles synthesis based on metabolites from vegetable extracts is considered sustainable and friendly to the environment. As a result of this project, we obtained hydroalcoholic extracts from aromatic species such as Rosemary (*Rosmarinus officinalis*); Pichana (*Baccharis spartioides*) and Fake sunflower (*Heliantus petiolaris*), which were the reducing agents used to get the silver nanoparticles synthesis (AgNPs). The phytochemical screening resulted in terpenes, alkaloids, tannins and flavonoids presence. After the AgNPs characterization through transmission electron microscopy (TEM), which showed the creation of round morphology nanoparticles, with an interval range size from 16,6 to 24,3 nm, their biological activity was analyzed against with the *Fusarium graminearum* fungus, a wheat pathogen in Pampean region, the cause of an illness known as spike fusarium or “golpe blanco”. Through the results analysis we can conclude that *Falso Girasol* and *Pichana* species AgNPs are potentially effective against *Fusarium graminearum*.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

1 Plantas aromáticas

1.1 Importancia de las plantas aromáticas.

Las hierbas o plantas aromáticas son aquellas especias cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias. Estas hierbas se utilizan como especias y condimentos por sus características organolépticas, que brindan a los alimentos y bebidas aromas, colores y sabores, que los hacen más apetitosos al olfato, vista y paladar (Hussein El-Zaeddi, 2016).

Desde hace cientos de años las plantas aromáticas fueron utilizadas como remedios para combatir distintas enfermedades y dolencias. Estas propiedades se deben principalmente a la presencia de diversos principios activos, tales como terpenos, flavonoides entre otros, en su composición (El-Zaeddi, 2016).

A continuación, una breve descripción de la composición química y características de las especies vegetales utilizadas en el presente trabajo de tesina.

El romero (*Rosmarinus officinalis L.*) pertenece a la familia *Lamiaceae*, es originario de la región mediterránea de Europa y conocido como una planta aromática y de uso medicinal. Esta planta presenta metabolitos secundarios y aceites esenciales tales como flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos, entre otros, y también es usado como condimento y aromatizante (Purca, 2013). En la actualidad es aprovechado en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética entre otras. Según Briones (2017), los subproductos más importantes del romero son su extracto acuoso y los aceites esenciales. Además, Avila-Sosa y col. (2011) expresaron que los extractos de plantas extraídos de las hojas del romero poseen compuestos y propiedades antioxidantes y antimicrobianas que fueron utilizadas en la antigüedad como medicina ancestral. (El-Zaeddi, 2016).

Helianthus petiolaris es una especie de planta norteamericana de la familia del girasol, comúnmente conocida como girasol de pradera o falso girasol, adventicia en el centro de Argentina. Según el trabajo realizado por (Bellozas Reinhard Mónica, 2015), los aceites esenciales de *Helianthus petiolaris* y pichana (*Baccharis spartioides*), pertenecientes ambas especies a la familia de Asteraceae, desde el punto de vista químico están constituidos fundamentalmente por sesquiterpenos, monoterpenos y compuestos oxigenados. Los resultados obtenidos en el espectro de masas y cromatografía en capa fina revelan la presencia de limoneno como uno de los componentes de los aceites en estudio. También se evaluó el potencial insecticida de los aceites frente al gorgojo *Tribolium castaneum*, resultando un excelente insecticida el aceite de *H. petiolaris*.

Baccharis spartioides. Comúnmente conocida como pichana, romerillo o escoba; es una especie fuertemente aromática que crece como un arbusto, llegando a medir 0,5-1,3 m de altura. En Argentina se extiende desde la provincia de Santa Cruz hasta Tucumán, principalmente en suelos secos o arenosos (Cabrera *et al.*, 2000; Van Baren *et al.*, 2002). Esta especie posee propiedades medicinales, es utilizada para el tratamiento de heridas, artritis y dolores reumáticos (Cabrera *et al.*, 2000; Van Baren *et al.*, 2002). Unas pocas especies del género *Baccharis* son conocidas por el efecto que producen los principios químicos que poseen, especialmente sustancias resinoides; de esta manera algunas tienen un uso más o menos intensivo en medicina popular, son las denominadas genericamente "carquejas" (en La Pampa se designa con ese nombre a tres especies: *Baccharis articulata*, *B. trimera* y *B. crispa*); una especie es temida por la toxicidad que causan esos principios en los animales domésticos: *B. coridifolia* (el "mío mío" o "romerillo") y otra está descrita como tóxica: *B. artemisioides* (el "romerillo blanco").

Pichana se emplea para la confección de escobas rústicas y puede utilizarse para la extracción de principios aromáticos. Por último, es necesario destacar que las tres especies estudiadas carecen de valor forrajero, ya que solo se ha detectado algún uso forrajero en *B. darwinii* (por ganado caprino) y en *B. juncea* (por ganado vacuno), pero en ambos casos se da en condiciones extremas de sobrepastoreo. (Troiani, 1985)

1.2 Tratamientos post-cosecha

Las plantas aromáticas pueden ser comercializadas frescas, enteras (como hortalizas, por ejemplo, o en macetas) o cortadas. Pero en la mayoría de los casos se las somete a

un proceso de secado, dado que esta operación representa una de las mejores alternativas de estabilización del material vegetal. Una vez desecado, existen otros procesos comunes como el troceado, despalado o limpieza, molienda, selección de calidades, descontaminación o estabilización, fraccionamiento y envasado. (Bandoni, 2002)

Desecado

Los principales objetivos del desecado son:

✚ Inhibir la destrucción enzimática, fenómeno que puede alterar sustancialmente la calidad del material por destrucción o descomposición de sus componentes. Téngase en cuenta que el desecado inhibe el proceso enzimático, pero no lo destruye, es decir que si el material se rehidrata el proceso se revierte.

✚ Estabilizar el color, el olor, el sabor, la textura, y/o la composición química. En este sentido el proceso más crítico es la melanosis o amarronamiento de las partes verdes, provocada por la destrucción de la clorofila y numerosas reacciones de oxidación generadas por las fenol-oxidasas presentes en las plantas (Jen, 1989).

✚ Reducir fletes, costos de embalaje y almacenaje.

✚ Reducir tiempos y costos de destilación, cuando el material va a ser empleado para este fin.

En general, los parámetros más importantes a tener en cuenta para optimizar un sistema de secado son:

Los principales parámetros de secado:

En todos los casos las plantas enteras o cortadas deben disponerse en capas finas entre las cuales el aire debe circular libremente. El grosor de estas capas varía de 3 cm para flores pequeñas, a 20 cm para sumidades y ramas. (Bandoni, 2002)

✚ Secado a campo: Se deja el material cortado en el lugar de la cosecha por un tiempo, permitiendo que gran parte del agua contenida en sus tejidos se evapore. (Bandoni, 2002)

✚ Secado al aire libre: sistema más primitivo y económico que actúa por simple radiación solar, pero también el menos aconsejado, no tanto por el proceso de secado en sí, sino por el deterioro que suele sufrir el material vegetal debido a la irradiación solar. Consiste en esparcir el producto a desecar sobre pisos de cemento o encima de catres,

parrillas, bandejas o bolsas, a la intemperie y durante un tiempo determinado. (Bandoni, 2002)

✚ Secado a la sombra: Es un sistema que actúa por convección de aire, el que debe estar más seco y en lo posible más caliente que el vegetal, para facilitar la evaporación. Se realiza a temperatura ambiente, pero bajo sombra o lugares cubiertos: galpones, invernaderos, graneros, etc. (Bandoni, 2002)

✚ Secado con aire caliente: Alternativa superior al caso anterior; es el agregado de un sistema de calentamiento a la entrada del aire para acelerar la evaporación de la humedad. Esto puede ser imprescindible si la humedad relativa ambiente de la región es demasiado alta, o la temperatura media demasiado baja. (Bandoni, 2002)

✚ Otros sistemas de secado: Existen otros sistemas de desecado (por liofilización, con microondas, con luz infrarroja), pero que no son comunes para el tratamiento de materiales vegetales aromáticos, por consideraciones económicas o técnicas, o por estar aún en etapa de desarrollo. (Bandoni, 2002)

Procesado de la planta desecada

Para estos tratamientos se utilizan varias técnicas, siendo las más usuales las siguientes:

✚ Despalado: Se realiza con zarandas de distintos calibres o máquinas semejantes a una trilladora. A través de la roturación de la planta y/o sacudiendo sus partes sobre el tamiz, se logra una buena separación de las partes útiles. (Bandoni, 2002)

✚ Troceado: En muchos casos el mercado o un cliente determinado exige recibir la planta entera. Pero también es muy común comercializar estos productos de otras dos maneras:

- parcialmente molidos o picados
- en polvo, o molidos con una granulometría determinada.

Estas calidades son necesarias cuando el producto va a ser usado para hacer extractos (facilitando la penetración del disolvente extractor en todos los intersticios del material vegetal), también cuando va a ser usado en la confección de mezclas de hierbas para infusión, saquitos monodosis para infusión o cápsulas con polvo de hierbas, etc. (Bandoni, 2002)

La elección del molino a emplear dependerá justamente de la dureza del material, y siempre habrá que tener en cuenta que el proceso de picado implica un recalentamiento del vegetal por la constante fricción que sufre y la rotura de los elementos celulares

donde la planta almacena sus constituyentes volátiles, con el consiguiente deterioro de sus calidades organolépticas. (Bandoni, 2002)

Existen un sinnúmero de molinos que pueden ser utilizados para estos casos, como el molino a martillo, a bolas, a clavos, a paletas, con cilindros acanalados, etc.

1.3 Extractos y preparados vegetales

Los extractos son preparaciones concentradas de consistencia líquida, semisólida y sólida, que se obtienen generalmente a partir de partes del material vegetal por acción de soluciones extractivas. (Chale, 2019)

Su preparación comprende dos operaciones principales: la obtención del líquido extractivo y su concentración. Obtenido el extracto se procede a la concentración hasta la consistencia indicada en cada caso, evitando la acción prolongada del calor. En general deberá preferirse la eliminación prolongada del disolvente por destilación a presión reducida, empleando temperaturas no mayores a 45 - 60°C. (Chale, 2019)

En algunos casos es necesario remover o extraer previamente componentes indeseables de los extractos crudos y concentrar los principios de interés. (Chale, 2019)

✚ Por su consistencia los extractos se clasifican en:

- Extractos fluidos: cuando son líquidos generalmente contienen alcohol (20-60%). Se preparan por maceración, percolación y evaporación.
- Extractos semisólidos: cuando son sólidos pero plásticos, pudiendo moldearse entre los dedos y adoptar diferentes formas.
- Extractos secos o en polvo: cuando son sólidos y en polvo fino o granulado.

La eficacia de los extractos depende de muchos factores, no todos ellos controlados totalmente; por lo que los resultados pueden ser variables, en función del estado del cultivo, las condiciones de extracción, la calidad de la planta de la cual se extrae la sustancia, etc.

✚ Podemos preparar los extractos mediante:

- Purines fermentados o en fermentación: colocando las partes de las plantas en un sacopermeable, dentro de un recipiente con agua de lluvia. Se cubre, dejando circular el

aire, removiéndose diariamente. Está listo en una o dos semanas, cuando deja de fermentar (oscuro, sin espuma). Se aplican diluidos. Si sólo se dejan 4 días al sol, el purín estará en fermentación.

- Infusión: vertiendo agua hirviendo sobre las plantas frescas o secas, dejándolas reposar 24 h.
- Decocción: se ponen las plantas a remojo durante 24 h, después se las hace hervir 20 minutos, se tapa y se deja enfriar.
- Maceración: consiste en un procedimiento sólido-líquido en el cual se coloca el materia vegetal, previamente secado o fresco, trozado o molido, en un recipiente que contiene uno o más disolventes hasta cubrir totalmente el material vegetal. Se deja en reposo a temperatura ambiente o se calienta a una temperatura adecuada durante el tiempo indicado dependiendo de la cantidad de material vegetal hasta que los componentes solubles se disuelvan. (Dobislaw, 2004). Durante la maceración se agita manualmente con frecuencia o se coloca en un equipo que presente agitación, por ejemplo, una plancha de calentamiento con agitación. (Chale, 2019).

Extracto de flores; se cortan antes de marchitarse, se humedecen y se trituran; la papilla se pasa por un tamiz fino (bolsa de tela) para extraer el líquido.

- Esencias: la extracción de aceites esenciales es más laborioso, necesiándose un alambique o destilador con arrastre de vapor. Se recogen las partes que se desean extraer y se ponen a hervir en agua, recogiendo con una campana todo el vapor, que al pasar por el alambique se irá condensando. Mediante decantación podemos separar el aceite esencial del agua.

1.4 Tamizaje fitoquímico

El objetivo del estudio o tamizaje fitoquímico preliminar es determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos. Dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico preliminar es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados.

Aunque en la actualidad existen técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos tradicionales aún constituyen una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición. Cuando se investigan muchos extractos de plantas, esto constituye una ventaja ya que permite descartar todas aquellas especies que no tienen potencial para ser utilizadas para algún beneficio biológico, quedando solamente las que sí lo tienen. El tamiz fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados de las reacciones son reportados como (+) o (-) para el metabolito de que se trate.

2 Nanotecnología

La nanotecnología fue presentada por primera vez por el físico Richard Feynmann en 1959 y se ha ido desarrollando a través de los años incorporando nuevos avances tecnológicos. (Mendoza y Rodríguez, 2007). Recientemente, la nanotecnología ha impulsado a la ciencia a desarrollar nuevas tecnologías debido a su gran aplicación en diferentes campos como química, física, ingeniería, biología, entre otros, gracias a la facilidad de que pueden ser modificadas sus propiedades incluyendo el tamaño, la forma y la carga según sea su aplicación (Camacho y Deschamps, 2013).

La nanotecnología se define como el estudio y manipulación de la materia en tamaños nanométricos. La materia se comporta de forma nueva y asombrosa cuando las dimensiones de los objetos se ven reducidos a escala nanométrica. Las propiedades intensivas de los nanomateriales cambian según su forma y tamaño, por ejemplo, el oro es un metal, dorado, que conduce el calor y la corriente y se funde a más de 1000 °C, cuando el oro se reduce a un tamaño nanométrico de unos 5nm, su color es rojo, ya no conduce tan bien la corriente y funde a 900 °C. Si se sintetizan nanopartículas de oro de 20 nm éstas son de color violeta y si son de 100 nm son de color verde, todas ellas tienen propiedades distintas según su forma y tamaño.

En la Figura 1 se muestra un esquema de tamaños de diferentes compuestos que los científicos han estudiado y trabajado durante muchos años, pudiendo observar que la nanoescala está en “el medio” entre dos escalas conocidas: la atómica y la molecular.

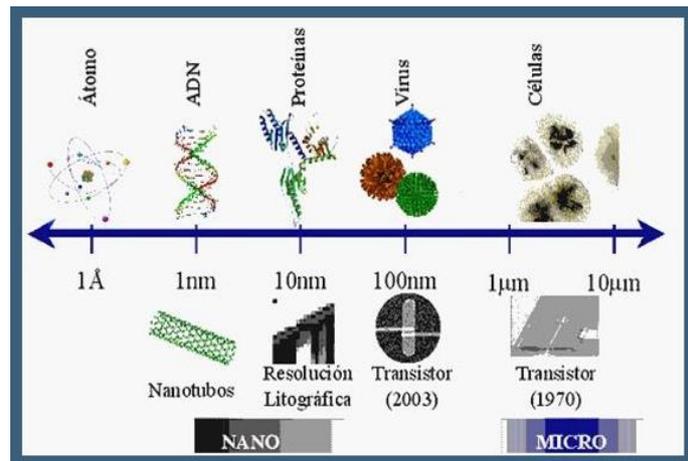


Figura 1: Esquema de tamaños de diferentes compuestos. (Nanoestructurados, 2010).

La definición de nanopartículas difiere dependiendo de los materiales, campos y aplicaciones concernientes. Con relación a sus dimensiones físicas, se definen como partículas que poseen un tamaño en un intervalo de 1 a 100 nm.

Las nanopartículas pueden clasificarse como: naturales, incidentales, de ingeniería, amorfas, cristalinas, poliméricas, o de materiales compuestos.

De acuerdo con su química predominan las nanopartículas no metálicas (por ejemplo, las de carbono), las metálicas (como las de oro Au y plata Ag), semiconductoras (como las de selenuro de cadmio CdSe) y combinadas. La forma de la nanopartícula es una característica importante que se toma en cuenta para las posibles aplicaciones en el área de la nanotecnología. En base a su forma encontramos nanopartículas esféricas, cilíndricas, en barras y plaquetas. Sus propiedades físicas están relacionadas con su tamaño y composición química. Las propiedades químicas de la superficie, incluyendo defectos e impurezas, contribuyen a su reactividad. (Díaz, 2013)

En la Figura 2 se presentan las formas típicas de diversos nanocristales metálicos.

<i>Estructura</i>	<i>Formas</i>	<i>Dibujo esquemático</i>	<i>Metales</i>
<i>Cristal único</i>	Cubo perfecto/ truncado		Pd, Ag, Au, Pt, Cu, Rh, Bi, Fe
	Octaedro perfecto/ truncado		Pd, Ag, Au, Pt
	Tetraedro perfecto/ truncado		Ag, Au, Pt, Rh
	Barra rectangular		Pd, Ag, Pt
	Barra octagonal		Pd, Au, Fe, Co, Ni
	Alambre octagonal o rectangular		Pb, In, Sn, Sb, Fe, Co
<i>Maclado individualmente</i>	Bipirámide derecha		Pd, Ag
	Rayo		Ag
<i>Maclado múltiple</i>	Decaedro		Pd, Ag, Au
	Icosaedro		Pd, Au
	Barra pentagonal maclada cinco veces		Pd, Ag, Au, Cu
	Alambre pentagonal maclado cinco veces		Ag, Cu
	Plato triangular/ hexagonal		Pd, Ag, Au, Cu, Pb, Bi, Co, Ni
	Disco		Sn, Co

Figura 2: Formas típicas de nanocristales metálicos.(Xia, 2009)

2.1 Nanopartículas

Las nanopartículas metálicas se definen como agregados aislados de átomos de metales rodeados de una cápsula protectora o estabilizadora que evita su aglomeración.(Lewis, 1993)

Son importantes desde un punto de vista teórico y práctico, ya que representan las clases de nanomateriales más prometedoras en virtud de sus propiedades optoelectrónicas, térmicas, magnéticas y su alta capacidad catalítica.

Las propiedades ópticas de las nanopartículas están en función de si la nanopartícula se comporta como semiconductor o conductora.

En la estabilización de las nanopartículas de oro y plata durante su síntesis, se han utilizado agentes estabilizantes entre los que se incluyen surfactantes y algunos polímeros. En un estudio realizado por Sato y colaboradores (1996) se demostró que el surfactante previene y evita la agregación de las nanopartículas de plata y desempeña un papel importante en la reducción de los iones de plata a plata atómica.

Actualmente existe un enorme interés en la preparación de nanopartículas metálicas que presenten formas y tamaños uniformes, lo que ha incrementado la búsqueda de nuevos procedimientos de síntesis fácilmente escalables y rentables.

2.2 Nanopartículas de plata

En los últimos años las nanopartículas de plata se han investigado ampliamente debido a la dependencia de su tamaño con las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas. En la escala nanométrica, la plata presenta inusuales propiedades físicas, químicas y biológicas, además de su actividad antimicrobiana (Chen, 2008). Actualmente la aplicación de las nanopartículas de plata se encuentra enfocada en su uso como agentes bactericidas o fungicidas en áreas tales como: la biotecnología, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, tratamiento del agua y productos de consumo a base de plata.

Debido a su fuerte actividad bactericida, las nanopartículas de plata se utilizan ampliamente en el campo biomédico para el control de infecciones (Necula, 2009), en recubrimientos de varios materiales textiles y en determinados implantes, además de usarse en el tratamiento de heridas y quemaduras, así como también se ha comercializado como un desinfectante para el agua.

En la Fig.3. se puede observar un diagrama explicativo de mecanismos sugeridos sobre la acción bactericida de las AgNPs en diferentes microorganismos. a) efecto destructivo sobre la pared celular. b) efecto de ataque a biomacromoléculas (ADN, ARN, PROTEÍNAS, etc).

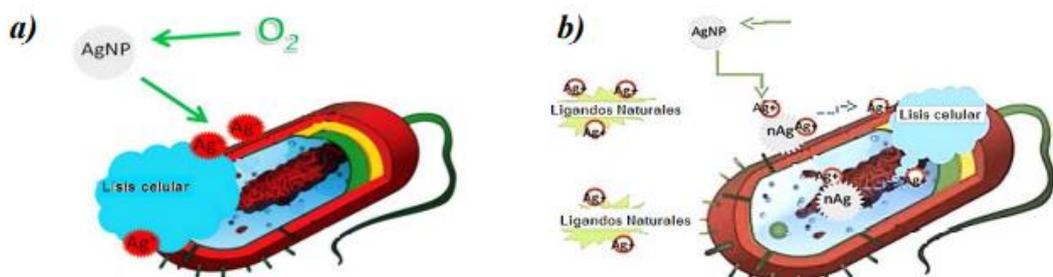


Figura 3. Mecanismos sugeridos sobre la acción bactericida de las nanopartículas de plata en diferentes microorganismos.(Díaz, 2013)

La plata es actualmente el material de nano-ingeniería más comúnmente usado para productos de consumo. Entre varios productos de consumo basados en la nanotecnología, de acuerdo con un estudio realizado por el centro de investigación Woodrow Wilson International Center for Scholars los materiales más comunes en las descripciones de un producto son la plata, seguido de carbono (por los fullerenos), zinc (óxido de zinc), titanio (óxido de titanio), sílice y oro (Kumar, 2009).

Aun con los métodos existentes para la producción de nanopartículas y materiales a base de plata, continúa la búsqueda de métodos que sean fáciles, económicos, eficientes, con buenas propiedades bactericidas y ambientalmente amigables al reducir el uso de temperaturas altas y reactivos tóxicos.

2.3 Aplicaciones de Nanopartículas de Plata

Una aplicación de las nanopartículas de plata es su uso como un catalizador. Jiang y colaboradores (Jiang, 2005) investigaron las propiedades catalíticas de las nanopartículas de plata soportadas en esferas de sílice. Las nanopartículas de plata actúan como un liberador de electrones, ayudando en la transferencia de electrones de los iones de BH_4^- a los colorantes, y por lo tanto causando una reducción de estos. Los iones del BH_4^- son nucleófilos mientras que los colorantes son electrófilos. Los iones nucleófilos pueden donar electrones a partículas metálicas, mientras que un electrófilo puede capturar electrones de las partículas de metal. Se ha demostrado que los iones del BH_4^- y los colorantes son simultáneamente absorbidos en la superficie de las partículas de plata cuando éstas se encuentran juntas.

Otros investigadores han estudiado la aplicación de las nanopartículas de plata para la fabricación de telas de algodón con un acabado textil antibacteriano (Zhang, 2009). En este estudio, la tela de algodón se trató con nanoplata coloidal mediante un método de impregnación para proporcionar propiedades antibacterianas a la tela de algodón. El tamaño de las partículas de plata preparadas en este estudio fue entre 10 - 30 nm. La solución de nanoplata coloidal mostró buena estabilidad aun después de 2 meses. Los resultados de las pruebas realizadas indicaron que la tela de algodón tratada con plata exhibió una reducción de la población de la bacteria *Staphylococcus aureus* del 99.01%, y una reducción de la bacteria *Escherichia coli* del 99.26% cuando se utilizó un material

textil tratado con un contenido de plata en el algodón de alrededor de 88 mg/kg. Otros usos de las nanopartículas de plata incluyen su aplicación a calcetines con el fin de prevenir el crecimiento de las bacterias que causan el mal olor, y también sobre una gama de productos para el cuidado de la salud, tales como vendas para quemaduras, excoriaciones y donantes de tejidos.

2.4 Síntesis de nanopartículas

Existen numerosos métodos disponibles para sintetizar nanopartículas, sin embargo, el enfoque o desafío actual se dirige hacia el control del tamaño de la nanopartícula, distribución de tamaño, morfología, cristalinidad y propiedades. Todo esto con el fin de aplicar las nanopartículas a un propósito determinado y preparar una variedad de materiales.

Las estrategias son importantes para la síntesis de nanopartículas. En la Figura 4 podemos reconocer que hay dos estrategias básicas usadas en la síntesis de nanopartículas: la ascendente y la descendente. En el enfoque ascendente las nanopartículas se construyen átomo por átomo, o molécula por molécula. La estrategia descendente consiste esencialmente en transformar objetos de la escala micrométrica a la nanométrica, donde las nanopartículas se sintetizan al romper gradualmente los materiales y transformarlos en tamaños más pequeños. (Ming, 2007)

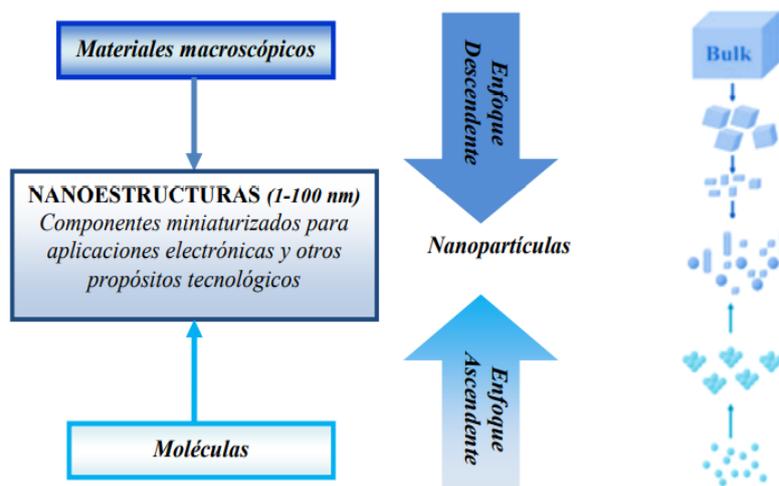


Figura 4. Esquema de las distintas estrategias para la síntesis de nanoestructuras.(Fabrizzi, 2000)

Clasificación de los métodos de síntesis:

▪ **según la fuente de energía**

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

▪ **Según la naturaleza del proceso**

En las diferentes técnicas para la preparación de nanopartículas pueden involucrarse procesos físicos, químicos, biológicos, o inclusive alguna combinación de estos.

Síntesis química de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de metales preciosos, tales como el Au, Ag, Pt y Pd, que son elementales para aplicaciones catalíticas y biomédicas, pueden prepararse mediante la adición de agentes de reducción solubles en agua a las soluciones acuosas de sus sales metálicas respectivas en presencia de un estabilizador.

La elección del agente de reducción puede afectar drásticamente la velocidad de nucleación y el crecimiento de la partícula que a su vez influye en la morfología, el tamaño de partícula y en la distribución de tamaños de estas. Los agentes de reducción que se han utilizado con mayor frecuencia para la síntesis de nanopartículas incluyen el borohidruro de sodio, hidracina, citrato de sodio y alcoholes (Nersisyan, 2003). Caswell y colaboradores (Caswell, 2003) prepararon nanoalambres cristalinos de Ag mediante la reducción de la sal de AgNO_3 , con citrato de sodio en presencia de NaOH a 100 °C. En la Figura 5 se presenta el mecanismo propuesto para la formación de las nanopartículas de plata. La cantidad de NaOH fue un factor importante para determinar la morfología del producto final.

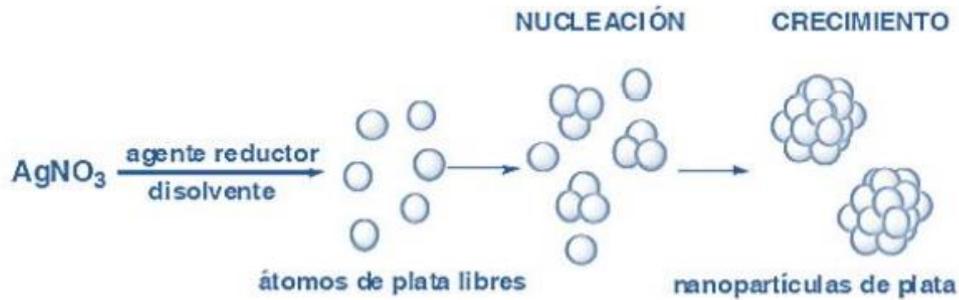


Figura 5. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción química en disolución de la sal AgNO_3 . (Monge, 2009)

El tamaño de partícula y la morfología de las nanopartículas metálicas puede controlarse mediante la elección adecuada de agentes de terminación (capping agent), así como variando la relación de las concentraciones del agente de terminación con respecto a de las sales metálicas.

El uso del método de síntesis química en medio acuoso para la preparación de nanopartículas metálicas requiere una atención especial a fin de evitar subproductos contaminantes indeseables.

En una reacción rápida y mal controlada quedan atrapadas impurezas como sales y otros productos de reacción dentro de las partículas o se forman aglomerados, en donde puede que estos no se eliminen por completo, incluso repitiendo los procedimientos de lavado. Debido a la alta reactividad de las nanopartículas metálicas, originada por su gran área superficial, se requiere tener especial cuidado durante el lavado y filtrado de las mismas para evitar una hidrólisis u oxidación indeseada. Después del secado se requiere con frecuencia de procedimientos asistidos por vacío para evitar la oxidación de los materiales.

✚ Síntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos de plantas

La síntesis de materiales a escala nanométrica es un proceso complejo y muchas veces requiere un alto consumo de reactivos químicos, lo que implica un elevado costo además del daño ambiental asociado. Para solventar estos problemas surge la biosíntesis de nanopartículas como alternativa a los métodos clásicos de síntesis. Es de gran importancia destacar el reemplazo de reactivos químicos utilizados convencionalmente en la síntesis de AgNPs, tales como el citrato de potasio y ácido ascórbico, por extractos

o aceites esenciales obtenidos a partir de plantas, que gracias a su composición química cumplen la misma función reductora de la plata e intensifican el potencial insecticida, bactericida, entre otros. Promoviendo el cuidado del medio ambiente y utilizando especies vegetales nativas o introducidas en la región, esto genera que sean de fácil acceso. La utilización de especies aromáticas en la síntesis de AgNPs se debe a su diversidad de componentes antioxidantes, que reducen la plata con estado de oxidación +1 (Ag^+) a plata con estado de oxidación 0 (Ag^0), en una reacción de redox. Uno de los pilares fundamentales de la síntesis verde es la utilización de plantas para la obtención de extractos con alto poder antioxidante como polifenoles, azúcares reducidos, bases nitrogenadas y aminoácidos; que son capaces de reducir cationes en una disolución de sal metálica. La reducción inicial de iones metálicos induce a la formación de centros de nucleación, estos centros secuestran iones metálicos adicionales y también incorporan lugares vecinos de nucleación que, a veces, conducen a la formación de nanopartículas. Además, como estas partículas están asociadas a restos orgánicos de los extractos de plantas, en ocasiones, se consigue estabilizar esas partículas de tamaño nanométrico e impedir que se agreguen (Makarov, 2014). Otra gran ventaja que presenta el empleo de métodos de química verde es la posibilidad de controlar el tamaño de las nanopartículas variando la concentración de extracto vegetal empleado sin necesidad de usar agentes surfactantes, estabilizantes o plantillas.

Los extractos de Aloe Vera, hojas de geranio, hierbas de limón, extractos de la fruta *Emblica officinalis* y caldo de las hojas del Neem han sido usados para sintetizar nanopartículas de Au (0), Ag (0) u oro/plata. Las técnicas de síntesis en este tipo de estudio implican la obtención de un extracto de la planta mediante la cocción en agua del material vegetal fresco cortado en diferentes proporciones para crear una solución acuosa o extracto la cual contiene ácidos y otros compuestos orgánicos presentes en las plantas. Este extracto se hace reaccionar con los iones de oro o de plata a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones.

2.5 Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas.

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).

La espectroscopía UV-Vis se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitudes de onda ultravioleta y visible) que pueden

absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Todas las técnicas de absorción suponen que cuando una radiación incide sobre una muestra se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transmisión entre los niveles energéticos de una sustancia: átomo, molécula o ión, pasando esta al estado excitado, el resto de la radiación es transmitida.

Los compuestos orgánicos, especialmente los que tienen un alto grado de conjugación, también absorben luz en estas regiones del espectro. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para los compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico.

Difracción de rayos X.

La técnica consiste en bombardear la muestra a estudiar con un haz de rayos X de longitud de onda λ , variando el ángulo de incidencia de los rayos en la muestra Θ .

El tamaño del cristal está definido como el dominio coherente donde se lleva a cabo la difracción de rayos X, es decir, el volumen de material en donde es posible aplicar rigurosamente la operación de simetría de traslación en el sólido cristalino, donde cada dominio tiene diferente aplicación. El tamaño de cristal generalmente se determina aplicando la ecuación de Debye-Scherrer, en el cual se debe tener en cuenta que el ensanchamiento del pico de difracción es originado por el tamaño del cristal de la muestra y por la óptica del instrumento de rayos X. Si la red cristalina está libre de deformación y los cristales predominan de manera general en la muestra entonces se puede estimar el tamaño promedio de cristal empleando la fórmula de Scherrer:

$$\beta = \frac{\kappa \cdot \lambda}{FWHM(S) \cdot \cos \theta}$$

Donde:

β : es el tamaño promedio de cristal

θ : es la posición del pico de difracción

κ : es el factor de forma del cristal y su valor es de 1.0

λ : longitud de onda de la radiación utilizada

FWHM (S): es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra.

Para calcular el tamaño del cristal se debe escoger el pico de difracción resuelto y hay que asegurarse de que el valor de FWHM (S) esté convertido a radianes para que el tamaño de cristal tome los valores de la longitud de onda del ánodo utilizado.

Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

Esta técnica permite observar el resultado de la interacción entre la radiación infrarroja y la muestra analizada. La radiación infrarroja produce transiciones entre niveles vibracionales de una molécula. Los enlaces entre los átomos de una molécula no son rígidos, sino que vibran en torno a una posición de equilibrio y la radiación infrarroja es capaz de llevar estos enlaces a niveles de energía vibracional superiores.

El espectro de infrarrojo es un dibujo compuesto por bandas o picos, en donde en el eje de las abscisas están representados todos los valores del intervalo de longitud de onda del infrarrojo medio, ya sea en número de onda (cm^{-1}) o de longitud de onda (nm). Mientras que en el eje de las ordenadas están representados los valores de la intensidad de absorción o transmisión.

En un espectro de infrarrojos se representa la frecuencia (en número de onda) frente al porcentaje de la luz transmitida (transmitancia). El porcentaje de transmitancia se define como el cociente entre la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra, I_M , y la intensidad de la luz del haz de referencia I_R multiplicado por 100.

$$\% \text{ Transmitancia} = \frac{I_M}{I_R} \times 100$$

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La microscopía electrónica de Transmisión (TEM), es una herramienta fundamental para el análisis de materiales nanométricos, ya que, permite la caracterización de materiales a partir de un haz de electrones de alta energía el cual interactúa con la muestra. Se obtiene información estructural específica de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz. El conjunto de electrones que atraviesan

la muestra son proyectados sobre la pantalla fluorescente formando una imagen visible o sobre una placa fotográfica registrando una imagen latente.

3 *Fusarium graminearum*

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular. Son considerados principalmente como hongos de campo (Sumalan et al., 2013), ya que causan un sinnúmero de enfermedades en cultivos. Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables (García et al., 2007). Desde hace años, el control de las enfermedades fúngicas ha dependido, en gran medida, de los tratamientos con agroquímicos. Sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medioambiente (Abdel-Monahim et al., 2011). Además, han dado lugar a la aparición de microorganismos altamente resistentes que conducen a enfermedades fúngicas con mayor incidencia que antes. Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini et al., 2010). Estudios alrededor del mundo revelan la actividad biológica de algunos metabolitos encontrados en las plantas que pueden ofrecer una alternativa promisoriosa para el control de plagas y enfermedades.

3.1 Interacción *Fusarium*-planta

Los hongos del género *Fusarium* son ampliamente conocidos alrededor del mundo, y se han convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos que ponen en peligro la salud de los seres humanos y de los animales. Además, incluye muchos patógenos de plantas de importancia agrícola que en conjunto ocasionan enfermedades caracterizadas por marchitez, tizones, pudriciones en cultivos ornamentales y forestales en ecosistemas agrícolas y naturales (Ma et al., 2013). Como otros fitopatógenos, este hongo emplea diversas estrategias de infección, así también, la especificidad del hospedero depende de cada especie de *Fusarium*.

Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular. Sin embargo, la colonización se restringe en cultivares tanto resistentes como susceptibles, a la región de entrada inicial del patógeno, debido a la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas. *Fusarium oxysporum*, por ejemplo, penetra inicialmente por raíz de forma asintomática; posteriormente, coloniza tejido vascular y desencadena un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de las partes aéreas de la planta. En contraste, *F. graminearum*, la principal causa de fusariosis de la espiga de cereales en todo el mundo, produce una necrosis limitada. (Ma et al., 2013). Además de la calidad comercial del trigo, la afección de *Fusarium* tiene alta incidencia en la calidad de la harina. Algunas de las características de las harinas provenientes de trigos afectados, están relacionadas con el buen nivel de proteína y alto gluten, pero muy extensibles y, en la mayoría de los casos, pegajosos.

3.2 Modo de acción de las nanopartículas frente a fitopatógenos.

Recientemente, con el rápido desarrollo de la nanotecnología, se han desarrollado nanomateriales de ingeniería como agentes antimicrobianos para controlar las enfermedades agrícolas debido a su fuerte actividad antimicrobiana.

Entre todas las nanopartículas caracterizadas, las nanopartículas de plata (AgNPs) han ganado una atención significativa debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, rentabilidad, mayor estabilidad, gran relación superficie/masa, toxicidad mínima y alta velocidad de reacción. Se producen aproximadamente 320 toneladas de AgNPs anualmente, y las AgNPs se están aplicando ampliamente en la medicina y campos agrícolas. Además, los estudios han demostrado que las dosis micromolares de AgNPs son suficientes para matar los patógenos microbianos. Se ha informado que las AgNPs exhiben una fuerte actividad antifúngica contra una amplia gama de patógenos bacterianos y fúngicos, incluyendo *Aspergillus niger*, *Fusarium spp.*, *Cándid*, *Raffaelea sp.*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Macrophomina phaseolina*. Sin embargo, los estudios de este nanomaterial contra hongos fitopatógenos productores de micotoxinas son limitados, y el efecto de las AgNPs sobre la biosíntesis de micotoxinas nocivas sigue sin estar clara.

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos de la bibliografía, los efectos inhibidores de las AgNPs sobre los micelios dependen del tamaño de las mismas, se

determinó que un tamaño de 2 nm frente a uno de 60 nm tenía un efecto inhibitorio significativamente mayor. A su vez, la tasa de germinación de los conidios disminuye significativamente con un aumento de la concentración de las AgNPs de 2 nm.

Considerando los antecedentes aquí presentados y con la finalidad de estudiar las propiedades de los principios activos de distintas especies vegetales de la Región Semiárida Pampeana, es que se postula la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS

Los nanoformulados sintetizados a partir de extractos naturales como agentes reductores, presentan actividad fungicida frente a *Fusarium graminearum*.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo de este trabajo se enfoca en la obtención de nanopartículas de plata empleando extractos vegetales de romero (*Rosmarinus officinalis*); pichana (*Baccharis spartioides*), falso girasol (*Helianthus petiolaris*) y la evaluación de su actividad biológica frente al hongo *Fusarium graminearum*.

Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar los extractos hidroalcohólicos de las especies antes mencionadas.
- Obtener y caracterizar nanopartículas de plata utilizando los extractos mencionados como agentes reductores.
- Evaluar las propiedades antifúngicas de las diferentes nanopartículas sobre el hongo *Fusarium graminearum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

4 Nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales.

4.1 Recolección de especies vegetales y su tratamiento: Se realizó la recolección de especies vegetales anteriormente mencionados, con separación de las partes u órganos de la planta, libres de enfermedades y picaduras de insectos.

El material vegetal (hojas y tallos) se secó al aire y al abrigo de la luz para su posterior molienda. Se efectuó la molienda y se guardó en recipientes herméticos, al abrigo de la luz y la humedad.

4.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos: Se pesaron 20 gr del material procesado, se agregaron 100 ml de agua destilada y 100 ml de alcohol etílico, se colocaron los extractos sobre una plancha de calentamiento a 80°C durante 3 minutos. Posteriormente se dejaron evaporar los solventes a temperatura ambiente. Se filtraron y el líquido filtrado se colocó en recipientes adecuados para su posterior utilización. (Arunachalam R., 2012)

4.3 Tamizaje fitoquímico: En el tamizaje fitoquímico se hicieron 3 réplicas para cada extracto hidroalcohólico. Se les realizó la determinación de alcaloides (ensayo de *Dragendorff* y *Mayer*), taninos (ensayo de cloruro férrico), flavonoides (ensayo de *Shinoda* triterpenos (ensayo de *Liebermann-Buchard* y *Salkowski*). Para la lectura de los resultados, expresada como concentración relativa de los metabolitos, se tuvo en cuenta la simbología siguiente: presencia como (+) o ausencia (-).

- **Determinación de Alcaloides:** 5 ml del extracto de la planta se llevaron a sequedad, luego se adicionaron 5 ml de HCl (10%) y se calentó por 10 min. Se enfrió, se filtró y se dividió el filtrado en dos tubos de ensayo. Posteriormente se agregaron unas gotas de los reactivos de reconocimiento: *Dragendorff* y *Mayer*. Una leve turbidez o precipitado (rojo a naranja, blanco a crema y marrón) evidencia la posible presencia de éstos.

- **Determinación de flavonoides:** Se colocaron en tubos de ensayo, 2 ml del extracto, algunos fragmentos de Mg y se agregó por las paredes del tubo, unas gotas de

HCl diluido. Se observó la coloración, que varía para las diferentes estructuras de amarillo, verdes y azules.

- **Determinación de Taninos:** Se evaporaron 5 ml del extracto de la planta y se disolvió el residuo en 10 ml de agua destilada. Se filtró y a 3 ml del extracto acuoso se adicionó 1 o 2 gotas de solución de cloruro férrico al 10%. Coloración azul indica posible presencia de taninos hidrolizables, y coloración verde de taninos condensados

- **Determinación de Triterpenos y Esteroides:** Se llevaron a sequedad 5 ml del extracto, se adicionaron 10 ml de cloroformo, se filtró y se dividió en dos porciones el filtrado. En cada uno de los tubos se analizó: reacción de Liebermann-Burchard. (rojas, verdes o azules) y reacción de Salkowski (agregado 1mL ác. sulfúrico conc.)

4.4 Síntesis de AgNPs a partir de extractos vegetales: En un vaso de precipitado, se agregan 4 gr de PVA (Acetato de Polivinilo) y 60 ml de agua bidestilada. Éste se coloca sobre una plancha de calentamiento con agitación constante hasta llegar a los 80°C. Una vez alcanzada dicha temperatura se agregó el AgNO₃ (se usaron diferentes concentraciones de este reactivo para las evaluaciones: 0,1M; 10⁻⁴ M). Se agregaron lentamente el AgNO₃, midiendo el pH (es necesario un pH alcalino) y si es necesario se añade solución de NH₄OH (diluido en agua bidestilada 2:8), para alcanzar el pH deseado. Por último, se adicionó el extracto y luego de unos minutos de agitación constante a 80°C se dejó reposar unas horas hasta la obtención de las AgNPs.

En la Tabla 1 se describen las proporciones y los compuestos utilizados para la síntesis de AgNPs.

Tabla 1: Composición de la mezcla para la preparación de nanopartículas.

H ₂ O bid.	60 ml
PVA	4 gr
NH ₄ OH	4 ml
AgNO ₃	8 ml
Extracto	8 ml

5 Caracterización: Las AgNPs obtenidas se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-Visible y por TEM (Microscopía electrónica de

transmisión). Esta última metodología fue realizada por el Servicio de Microscopía de la Universidad Nacional del Sur.

6 Bioensayos frente a *F. graminearum*:

✚ ***Fusarium graminearum***: La cepa de *Fusarium graminearum* sp, fue cedida gentilmente por el Dr. Ricardo Mario Comerio, perteneciente al Grupo de Protección Vegetal de la Experimental INTA Anguil. Para el crecimiento de dicho microorganismo se utilizó Agar Papa – Zanahoria (PCA, potato carrot agar), que tiene la siguiente composición: Papa 20 gr, Zanahoria 20 gr, Agar-Agar 20 gr, Agua destilada 1000 ml. Preparación: Se hierven la papa y la zanahoria en el agua destilada durante 1 hora, hasta completar el volumen de 1 litro, colar, medir el pH y luego agregar el agar y se autoclava a 121°C por 20 min. (Curello-Gutierrez and Rojas Barreto 2010).

✚ **Ensayos de inhibición de frente al hongo *Fusarium graminearum***:

La actividad antifúngica in vitro de las AgNPs sintetizadas a partir de los extractos se evaluó por el método de Difusión en agar PCA. En cada tratamiento se utilizaron 15 ml de medio y 2 ml de AgNPs. Una vez solidificado, se sembró el inóculo de *F. graminearum* en forma de discos de aproximadamente 1 cm de diámetro. Se utilizaron controles negativos, sin adición de AgNPs, y controles positivos con adición de AgNPs sintetizadas con reactivos químicos, como agentes reductores de la plata, tales como, citrato de potasio y ácido ascórbico. Se midió el crecimiento radial del hongo a las 24, 48, 72 y 96 hs, tomando como resultado el valor promedio de los datos. El ensayo se realizó por triplicado y se repitió tres veces determinándose el porcentaje de crecimiento y el porcentaje de inhibición mediante las siguientes fórmulas (Guedez, 2012):

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro del crecimiento del hongo} \\ \text{En el extracto} \times 100}{\text{Diámetro del control negativo}}$$
$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

RESULTADOS

7 Ensayos fitoquímicos de las especies vegetales:

Con el objetivo de conocer los metabolitos presentes en los extractos de las especies vegetales estudiadas, en el laboratorio se realizaron ensayos fitoquímicos, tal como se describió en la introducción.

En la tabla 2 se describen los resultados de los componentes de las especies vegetales utilizadas y las técnicas empleadas para cada determinación. La presencia o ausencia de los compuestos se describen a partir de “positivo (+) o “negativo” (-).

De acuerdo con la bibliografía descripta en la introducción, los extractos tienen diferentes compuestos orgánicos reductores lo que les confieren sus propiedades, además de la factibilidad para ser utilizados en la síntesis de AgNPs.

Tabla 2. Resultados de los ensayos fitoquímicos de las especies vegetales.

<u>Extractos vegetales</u>	Triterpenos Ensayo de Liebermann-Buchard y Salkowski	Flavonoides Ensayo de Shinoda	Taninos Ensayo con cloruro férrico	Alcaloides Ensayos Dragendorff Mayer
<i>Baccharis spartioides</i>	+	+	+	+
<i>Heliantus petiolaris</i>	+	+	+	+
<i>Rosmarinus officinalis</i>	+	+	+	+

Según (Mejía Calle, 2019) se evidencia en sus estudios sobre plantas de romero la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides y fenoles, en concordancia con los resultados aquí presentados. Respecto a los estudios realizados en pichana, Aguilar y colaboradores (2007) reportan para tres especies de dicho género vegetal (*B. Salicifolia*; *B. glutinosa* y *B. genistelloides*) un perfil fitoquímico compuesto de flavonoides, taninos, catequinas, lactonas y azúcares reductores, mientras que la presencia de alcaloides no se evidencia en dichas especies. Los resultados encontrados en este trabajo de Tesina confirman para la especie pichana la presencia de alcaloides en sus extractos. Estudios realizados sobre *H.annuus*, una variedad de falso girasol, (Dalgis 2003) reportan presencia de terpenos, flavonoides, lactonas, antocianinas y saponinas en sus extractos, en correlación con los resultados aquí reportados. Es escasa la información de extractos de pichana y falso girasol, lo que motiva aún más el estudio de estos ejemplares.

8 Caracterización de las nanopartículas de plata:

Una vez sintetizadas las AgNPs a partir de extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales ya mencionadas como agentes reductores y PVA como agente estabilizante, se procedió a corroborar la presencia de AgNPs en la formulación, mediante su caracterización por espectrofotometría UV-Vis.

En la Figura 6 se pueden observar las bandas correspondientes a las diferentes AgNPs sintetizadas. En la imagen A, se muestra el espectro de absorción de las AgNPs de pichana, cuya banda se encuentra a una longitud de onda de 430 nm. En la imagen B, se muestra el espectro de absorción de las AgNPs de falso girasol, la banda se encuentra a una longitud de onda de 440 nm. En la imagen C, se muestra el espectro de absorción de las AgNPs de romero, la banda se encuentra a una longitud de onda de 440 nm. En la imagen D, se muestra el espectro de absorción de las AgNPs del testigo (sintetizadas a partir de los agentes reductores ácido ascórbico y citrato de potasio), la banda se encuentra a una longitud de onda de 430 nm. Este comportamiento, de acuerdo con la literatura se atribuye a la excitación de los plasmones de superficie de las nanopartículas de plata, los cuales originan una fuerte dispersión de la luz mediante un campo eléctrico a longitudes de onda en el intervalo de 400 a 450 nm (Devika R., 2012).

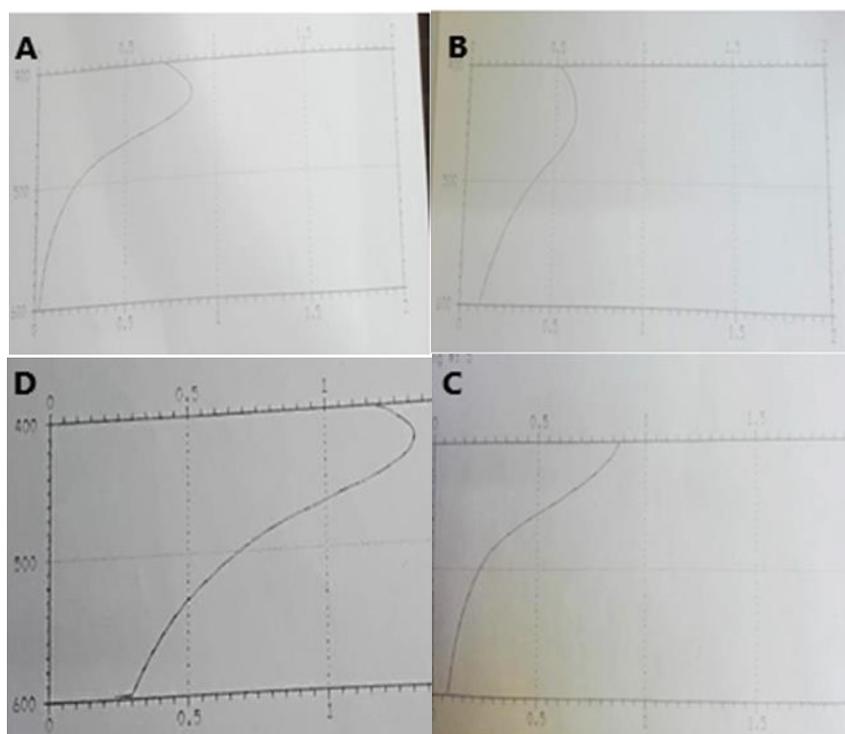


Figura 6. Espectros de absorción de las AgNPs.

En la Figura 7 se presenta una serie de imágenes obtenidas a partir de la caracterización mediante TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) para la determinación de los tamaños y formas de las AgNPs sintetizadas.

En la imagen A, se observa la muestra de AgNPs de pichana, partículas con morfologías circulares y ligeramente alargadas, bien dispersas y con alto contraste. En la imagen B se observa la muestra de AgNPs de falso girasol, las partículas halladas presentaron aspecto circular y algunas ligeramente alargadas como muestra la correspondiente imagen. En la imagen C se observa la muestra de AgNPs de romero, las partículas visualizadas en la muestra presentaron partículas de forma circular y otras ligeramente alargadas. En la imagen D, se observa la muestra de AgNPs del testigo, la muestra presentó partículas de morfología circular y mayoritariamente de pequeño tamaño.

De acuerdo con la bibliografía consultada las nanopartículas esféricas son las que presentan menor toxicidad (Elamawy-Harby, & Hendy, 2018)(Tong, 2013) y en investigaciones realizadas se ha demostrado que las nanopartículas biogénicas son menos tóxicas que las obtenidas por medios tradicionales. (Yaqoob, Umar, & Ibrahim, 2020)(Nasrullah, 2020).

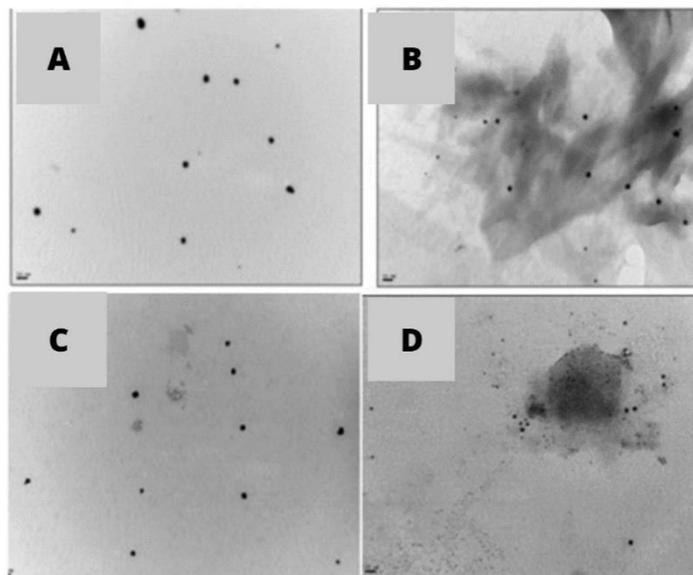


Figura 7. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), de las diferentes AgNPs.

9 Efecto de las AgNPs frente al hongo *Fusarium graminearum*:

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de inhibición del crecimiento del hongo *F. graminearum* por la acción de las AgNPs sintetizadas, mediante el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

En las Figuras 8, 9, 10 y 11 se muestran algunas de las imágenes de los ensayos realizados para la determinación cualitativa de la inhibición de crecimiento del hongo. El resto de los ensayos se presentarán en el Anexo A, al final de la tesis.

En la figura 8 se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs sintetizadas a partir de ácido ascórbico y citrato de potasio, a éste formulado lo consideramos el control, ya que se trata de AgNPs sintetizadas de manera convencional a partir de reactivos químicos. En la Figura 9 se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs sintetizadas a partir de falso girasol 0,1 M y en la Figura 10 se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs sintetizadas a partir de pichana 10^{-2} M. En la Figura 11 se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs sintetizadas a partir de romero 0,1 M.

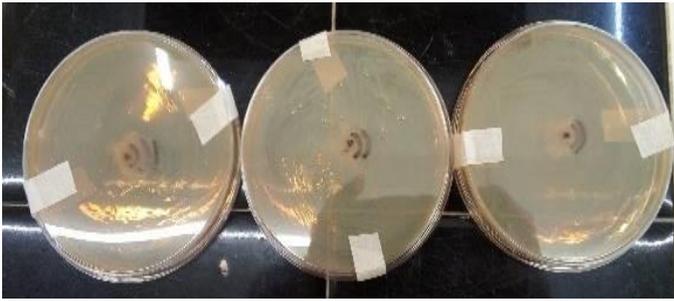


Figura 8. AgNPs sintetizadas a partir de ácido ascórbico y citrato de potasio.

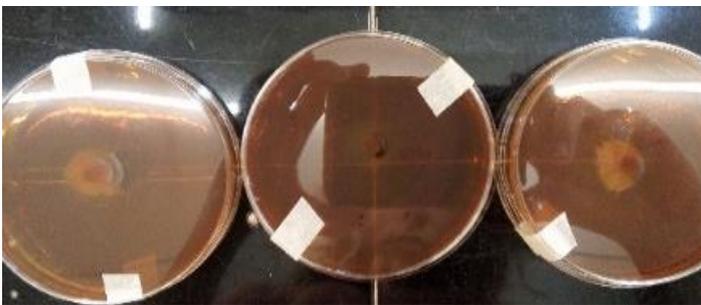


Figura 9. AgNPs sintetizadas a partir de falso girasol 0,1 M



Figura 10. AgNPs sintetizadas a partir de pichana 10^{-2} M.



Figura 11. AgNPs de sintetizadas a partir de romero 0,1 M.

Según (Jeque Mansoor, 2021) las AgNPs han mostrado inhibición del crecimiento de muchos hongos como *Aspergillus fumigates*, *A. niger*, *A. flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* y *Penicillium* especies. Según la hipótesis actual, las AgNPs actúan produciendo especies reactivas de oxígeno y radicales libres, que provocan la desnaturalización de las proteínas, el daño de la bomba de protones y del ácido nucleico, la peroxidación de lípidos y el daño de la pared celular. Por tanto, alteran la permeabilidad de la membrana celular, provocando la muerte celular.

Un estudio anterior comparó las actividades antifúngicas de las AgNPs sintetizadas mediante métodos ecológicos y químicos (Tyagi, 2020). Este estudio informó una inhibición del 100 % contra *Corynespora cassiicola* y *A. solani*, y 85% de inhibición contra *Fusarium spp.*, para AgNPs sintetizadas químicamente; por el contrario, las AgNPs sintetizadas en verde mostraron una inhibición del 90 % frente a *C. cassiicola*, una inhibición del 95 % frente a *A. solani* y una inhibición del 90 % frente a *Fusarium spp.* La actividad antifúngica de ambos tipos de nanopartículas depende de su dosis y de la especie fúngica objetivo. Además, se analizaron las toxicidades de ambos tipos de AgNPs frente a *Drosophila melanogaster*.

Se realizaron gráficos para organizar los resultados obtenidos de los distintos ensayos mencionados anteriormente. En la Figura 12 se muestra el porcentaje de crecimiento y los distintos tratamientos realizados con su concentración de AgNPs correspondientes. Las líneas anaranjadas que se observan en ambos gráficos son los valores de porcentajes óptimos de acuerdo con la bibliografía estudiada. En los resultados obtenidos se determinó que los valores porcentuales de crecimiento encontrados para el testigo y las AgNPs de romero, pichana, falso girasol fueron de 20, 95, 70, 32.

En la Figura 13, se muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento y los tratamientos con sus concentraciones al igual que en el gráfico anterior. Los valores de porcentaje de inhibición para las AgNPs de romero, pichana, falso girasol y testigo fueron: sin inhibición, 30, 67 y 70 respectivamente.

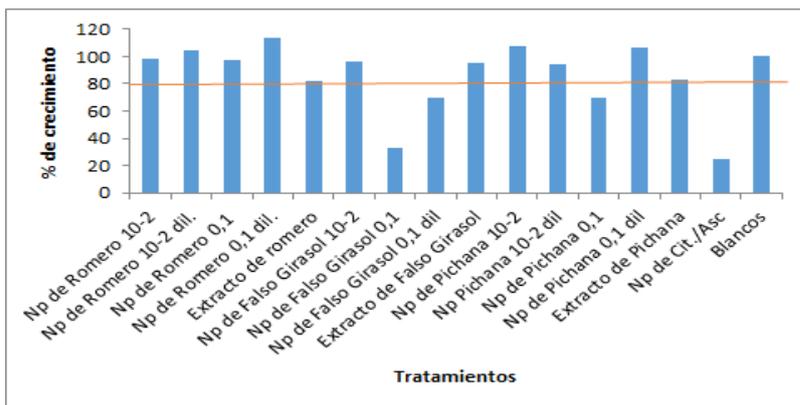


Figura 12. Porcentaje de crecimiento de *F. graminearum*.

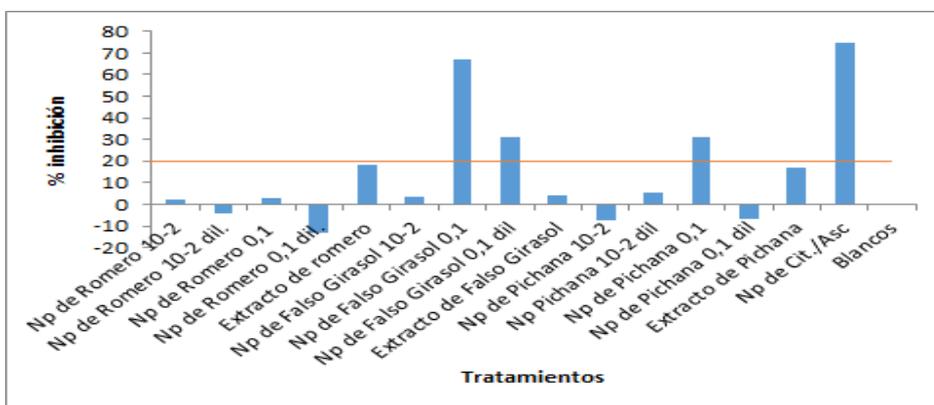


Figura 13. Porcentaje de inhibición de *F. graminearum*.

Los resultados obtenidos se evaluaron considerando activos aquellos tratamientos que presenten un porcentaje de crecimiento menor o igual al 80 % y un porcentaje de inhibición mayor o igual al 20 %, establecido de esta manera en el protocolo descrito por Martínez (1999).

Del análisis de los resultados se concluye que las AgNPs sintetizadas a partir de los extractos de las especies falso girasol y pichana resultan potenciales antifúngicos frente al hongo *Fusarium graminearum*. Si bien las AgNPs de romero no presentan evidencia de actividad antifúngica frente a *F.graminearum*, se observa una tendencia creciente de actividad antifúngica por parte del extracto hidroalcoholico de romero. Estos resultados en la actualidad están siendo evaluados mediante nuevos ensayos.

CONCLUSIÓN

La tendencia de la síntesis de AgNPs se ha enfocado recientemente en la utilización de la “química verde”, ganando popularidad debido a sus bajos costos y ser una técnica amigable con el medio ambiente. En este trabajo de Tesina, se comprobó la factibilidad de sintetizar nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales hidroalcohólicos extraídos de plantas aromáticas, algunas de ellas nativas de la Región Semiárida Pampeana. No se reportan en la actualidad trabajos en los que se sinteticen AgNPs a partir de los extractos de pichana y falso girasol. Esto es de gran relevancia dada la aplicación que podrían tener dichos productos.

Con respecto a la actividad antifúngica se obtuvieron resultados óptimos, por parte de las nanopartículas sintetizadas a partir de los extractos de falso girasol y de pichana, en comparación con las nanopartículas de plata sintetizadas con reactivos químicos. Este dato resulta prometedor dado que la fusariosis del trigo es una de las enfermedades más recurrentes en nuestra región, por lo tanto, esto refuerza la tendencia de conseguir productos amigables con el ambiente, pero sobre todo a través de un proceso sencillo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ✚ Aguilar, E.; Anaya, B.; Alarcón, J.; Tico, J. (2007). Etnobotánica, fitoquímica y farmacología de especies del género *Baccharia* (Asteraceas) utilizadas como plantas medicinales en el departamento de Ayacucho. *Ciencia e Investigación* 10. Fac. de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. ISSN 1561-0861.
- ✚ Ankamwar, C. D. , Absar, A., Murali, S. (2005). "Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.*, 1665-1671.
- ✚ Bandoni, D. A. (2002). "Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica." Buenos Aires: CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo.
- ✚ Bellozas Reinhard, M., Jofre Cora, F. , Durán, K. , Pattacini, S., Peralta, M. P. , Scoles, G. E. (2015). "Caracterización química y actividad biológica de aceites esenciales extraídos de especies de la familia de asteraceae." *DSPACE*, 23.
- ✚ Caswell, K. K. , Bender, M. C., Murphy, J. C. (2003). "Seedless, Surfactantless Wet Chemical Synthesis of Silver Nanowires". *Nano Letters.*, 667-669.
- ✚ Chale, J. E. (2019). Obtenido de <http://risisbi.uqroo.mx/bitstream/handle/20.500.12249/2245/TP339.20192245.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ✚ Chen, X., Schluesener, H. J. (2008). "Nanosilver: A nanoproduct in medical application". *Toxicology* . PubMed.
- ✚ Dalgis, A.; Romero, H. (2003). "Evaluación de la actividad herbicida por acción alelopática del extracto acuoso de las hojas de *Helianthus annuus* sobre las malezas *Bothriochloa pertusa* L., *Digitaria bicomis* L., y *Leptochloa mucronata* propias de un cultivo de *Zea maiz*." Trabajo de grado presentado en la Universidad de Sucre, Departamento de Biología.
- ✚ Devika R., E. S. (2012). "Biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando el hongo pleurotus ostreatus y su actividad antimicrobiana." *Ciencia de acceso abierto.*, 1-5.
- ✚ Diaz, M. P. (2013). Obtenido de <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/64/1/Tesis%20de%20maestria%20Marco%20Polo%20Hernandez.pdf>
- ✚ Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E., Hendi, A. A. (2018). "Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi". *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28.
- ✚ El-Zaedi, Martínez, T. J. , Sánchez, C. A. , Burló, F. , Carbonell-Barrachina, A. A. (2016). "Volatile Composition of Essential Oils from Different Aromatic Herbs Grown in Mediterranean Regions of Spain." *Foods*, 5-41. Obtenido de <https://conceptodefinicion.de/plantas-aromaticas/>

- ✚ Endo, T. , Kerman, K., Nagatani, N., Takamura, Y., Tamiya, E. (2005). Obtenido de <https://www.google.com/search?q=Endo%2C+T.%2C+Kerman%2C+K.%2C+Nagatani%2C+N.%2C+Takamura%2C+Y.+and+Tamiya%2C+E.+%E2%80%9CLabel-free+detection++of+peptide>
- ✚ Fabbrizzi, L. P., Poggi, A. . (2000). "Chemistry at the beginning of the third millennium: molecular desing".
- ✚ García, I. N. (2015). "Sìntesis verde de nanopàrticulas para la eliminaciòn de colorantes en medios acuosos." Obtenido de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14826/NeiraGarcia_Iago_TFG_2015.pdf
- ✚ Gonzalez, M. R. , Rodriguez, A. (2012). "Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis." Rev. Colomb. Biotecnol. Vol XIV. N 1, 271-284.
- ✚ Guedez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. (2012). "Evaluaciòn in vitro de aislamientos de Trichoderma harzianum para el control de Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii y Fusarium oxysporum en plantas de tomate." RVSM.
- ✚ Hebbalalu, D., Lalley, J., Nadagouda, N. M. (2013). "Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable." ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 703-712.
- ✚ Hosokam, M., Noyi, K., Naito, M., Yokoyama, T. (2007) Nanoparticle Technology Handbook. p. 5.
- ✚ Jiang, R. , Wang, T-T. , Shao, J. , Guo, S. , Wei Zhu, W. , Yu, Y-J. , Chen, S.L. , Hatano, R. (2017). "Modeling the biomass of energy crops: Descriptions, strenghts and prospective." Journal of Integrative Agriculture, 1197-1210
- ✚ Kuc J., K. (2001). "Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application." European Journal of Plant Pathology., 7-12.
- ✚ Kavitha, K. Palanivelu, V. (2005). "Degradation of nitrophenols by Fenton and photo-Fenton processes." Journal of Photochemistry and Photobiology A:, 83-95.
- ✚ Khaydarov, R. G., Khaydarov, R. A. , Gapurova O., Estrin Y. , S Evgrafova, Scheper T. , S Y Cho (2009). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by an electrochemical method". Nanostructured materials for Advanced Technological Applications, Springer Science, 215-216.
- ✚ Kim, D. K., Jules L. Hammond ,N. B. , Rafiee, S. D. , Estrela, P. (2014). "Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries." MDPI.
- ✚ Kumar, C. B., Fernandes, F. L., Suresh K. V. (2009). "Nanomateriales for the life sciences."

- ✚ Kurokawa, Y., Jimba, Y., Miyazaki, H. (2004) "Optical band structure and near-field intensity of a periodically arrayed monolayer of dielectric spheres on dielectric substrate of finite thickness," *Phys. Rev. B*, Vol. 70, No. 15, 1551171-1551179.
- ✚ Khandel, P., Yadaw, K. R., Soni, K. D., Kanwar, L., Shahi, K. S., (2006). "Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract". *Biotechnology Progress.*, 1357-1361.
- ✚ Lewis, L. N. (1993). "Chemical catalysis by colloids and clusters." *Chem. Rev.* 1993, 93, 8, 2693–2730
- ✚ Li, S. S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhanga, L., Zhanga, Q. (2007). "Green synthesis of silver nanoparticles using capsicum annuum L. extract". *Green Chemistry.*, 852-858.
- ✚ Makarov, V. V., Makarova, S. S., Love, A. J., Sinitsyna, V. O., Dudnik, A. O., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. T., Kalinina, N. O. (2014). "Biosynthesis of stable iron oxide nanoparticles in aqueous extracts of hordeum vulgare and rumex acetosa plants.". *Langmuir*, 5982-5988.
- ✚ Marković, D., Šaponjić, Z., Radoičić, M., Radetić, T., Vodnik, V., Potkonjak, B., Radetić, M. (2015). "Sonophotocatalytic degradation of dye C.I. Acid Orange 7 by TiO₂ and Ag nanoparticles immobilized on corona pretreated." *Ultrasonics Sonochemistry*, 221-229.
- ✚ Ming, T., Chang, S. (2007). "Regenerative Medicine, Artificial Cells and Nanomedicine". *World Scientific*, 1,15.
- ✚ Monge, M. (2009). "Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas". *An Quim*, 33-41.
- ✚ Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M., Kumar, R., Sastry, M. (2002). "Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*". *ChemBioChem*, 461-463.
- ✚ Nanoestructurados, M. (2010). materiales nanoestructurados. Obtenido de <https://sites.google.com/site/materialesnanoestructurados/>
- ✚ Nasrullah, M. Zareen, F. G., Hanif, M., Naz, A., Pakistan, M. Joham, S. A., Muhammad, Z. (2020). "Green and Chemical Syntheses of CdO NPs: A Comparative Study for Yield Attributes, Biological Characteristics, and Toxicity Concerns". *ACS omega.*, 5739-5747.
- ✚ Necula, B. S., Apachitei-Fratila, E. L., Zaat, J. A. S., Apachitei, L., Duszcyk, J. (2009). "In vitro antibacterial activity of porous TiO₂-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Acta Biomater.*, 3573-3580.
- ✚ Nersisyan, H., Lee, J. H., Son, H. T., Won, C. W., Maeng, D. Y. (2003). "A New and Effective Chemical Reduction Method for Preparation of Nanosized Silver Powder and Colloid Dispersion". *Mater.*, 949-956.

- ✚ Rajeswari, A. , Sujatha, D. , Balasaraswathi, K., Mani, U., Chellan, R., Asit, B. M. (2012). “Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Coccinia grandis* leaf extract and its application in the photocatalytic degradation” . *Colloids Surf B.*, 226-230.
- ✚ Sato, S. N. ,Asai, N., Yonese, M. Colloid, P. (1996). “Formation of colloidal silver in the presence of a nonionic surfactant, Surfynol 465.” *Colloid Polym Sci* 274, 889–893
- ✚ Sciencejunkies. (2008). Obtenido de <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:EspectroElectromagn%C3%A9tico.JPG>
- ✚ Shankar, S. A. , Absar, A., Murali, S. (2003). “Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles”. *Biotechnology Progres* 1., 1627-1631.
- ✚ Shankar, S. R., Rai, A., Ahmad, A., Sastry, M. (2004). “Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core -Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth”. *Journal of Colloid and interface Science* , 496-502.
- ✚ Sondi, I. Salopek-Sondi, B. (2004). “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E” *Journal of Colloid and Interface Science.*, 177-182.
- ✚ Tong, T., Anas Shereef, A., Jinsong Wu, J., Thi Thanh B. C., John J. K, Jean F. G., Gray K. (2013). “Effects of material morphology on the phototoxicity of nano-TiO₂ to bacteria”. *Environmental Science & Technology.*, 47.
- ✚ Troiani, H. O. (1985). “Las especies de *Baccharis* (compositae) de la provincia de la Pampa.” *Rev. Fac. Agronomía U.N.L.Pam*, 1-2.
- ✚ Tyagi, P. M., Preeti T, Khandoker S. S., , A. Hubbe , Pal, L. (2020). “Efectos antifúngicos de nanopartículas de plata contra varios hongos patógenos de plantas y su evaluación de seguridad en *Drosophila melanogaster*.” *Biointerfaz Res. aplicación química* 10, 6587–6596.
- ✚ Vch, W., Weinheim, K. G. A. (2008). Obtenido de <https://docplayer.net/75277362-Nanomaterials-an-introduction-to-synthesis-propertie-and-applications.html>
- ✚ Xia, Y. X., Xiong, Y., Lim, B., Skrabalak, S. (2009). “Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics?”. *Angewandte Chemie*, Vol. 48, Issue 1.
- ✚ Yaqoob, A. A., Umar, K., Ibrahim, M. N. (2020). “Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications-a review”. *Applied Nanoscience.*, 1369-1378.
- ✚ Zhang F, Wu X, Chen Y, et al (2009). “Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish”. *Fibers and Polymers.*, 496-501.
- ✚ Zhong-Jie, J. , Chun-Yan, L., Wei, L. (2005) “Catalytic Properties of Silver Nanoparticles Supported on Silica Spheres”, 1730-1735.

ANEXO A



Figura 14. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo a partir de los blancos (solo contienen el medio PDA).



Figura 15. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs de sintetizadas a partir de falso girasol 10^{-2} M.

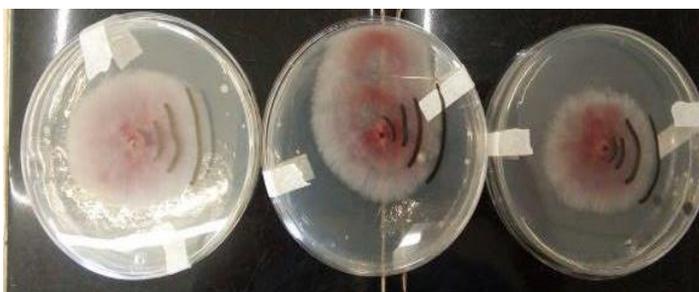


Figura 16. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con extracto hidroalcoholico de falso girasol.



Figura 17. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs de sintetizadas a partir de romero 10^{-2} M.

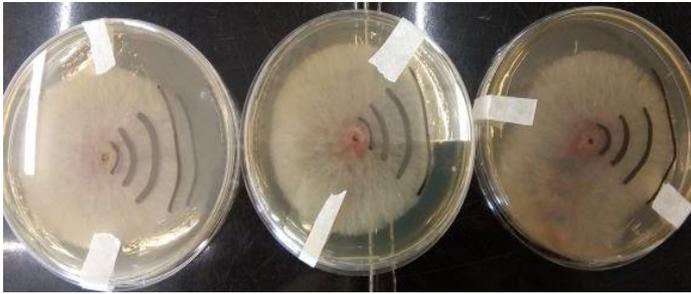


Figura 18. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con extracto hidroalcoholico de romero.



Figura 19. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con AgNPs de sintetizadas a partir de pichana 0,1 M.

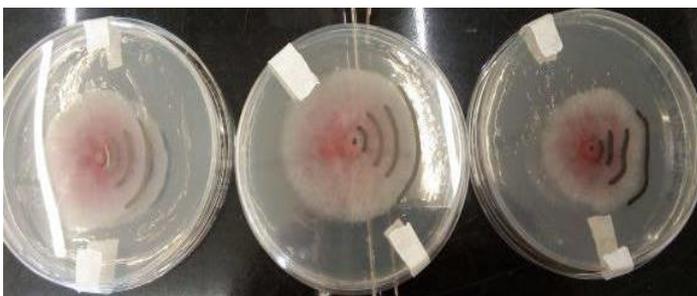


Figura 20. Se observa en la imagen el ensayo de inhibición de crecimiento del hongo con extracto hidroalcoholico de pichana.