

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Síntesis a escala de laboratorio de nanopartículas de Cobre a partir de extracto de hoja de Guayaba (*Psidium guajava*) para el control de bacterias sulfato reductoras

Pablo Andrés Castellanos Pinzón, Carlos Jovany Ulloa Suárez

Trabajo de Grado para optar por el título de Ingeniero Químico

Director

Debora Nabarlatz

Ph. D. Chemical and Process Engineering

Codirector

José Gabriel López Ortiz

MSc en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físico Químicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Agradecimientos

Agradecemos a Zumotec s.a. por la disposición de los equipos y del espacio requerido para el desarrollo de este trabajo de grado, a José Gabriel López Ortiz por su guía y acompañamiento en el descubrimiento de la temática abordada, a María Fernanda por ser una maestra y guía en el vasto mundo microbiológico. También a Débora Alcida Nabarlatz en el apoyo moral y motivacional en el desarrollo del proyecto.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Tabla de Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo General	18
1.2 Objetivos Específicos.....	18
2.ESTADO DEL ARTE.....	19
2.1 Marco teórico	19
2.1.1. Síntesis de NPs.....	19
2.1.2 Hoja de guayaba y sus propiedades.	19
2.1.3 Reducción y su mecanismo de reacción.	20
2.1.4 Tamaño de partícula y uso de tensoactivos.....	21
2.1.5 Bacterias sulfato reductoras y biocorrosión.	22
2.1.6 Nanopartículas y su actividad biocida.	23
2.2. Materiales.....	24
2.3 Método	25
2.3.1 Pruebas preliminares.....	25
2.3.1.1 Estandarización del proceso de síntesis.....	25
2.3.1.2 Síntesis química para determinación del medio.	26
2.3.1.3 Síntesis con glucosa.....	26
2.3.1.4 Síntesis con glucosa y tensoactivos	27
2.3.1.5 Síntesis con extracto de hoja de guayaba.	27
2.3.2 Influencia de los parámetros durante la síntesis de NPs-Cu usando extracto de hoja de guayaba.	28
2.3.3 Caracterizaciones fisicoquímicas de la solución coloidal.....	28

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

2.3.3.1 %Conversión del precursor.	28
2.3.3.2 Cantidad de macropartículas.	29
2.3.3.3 Distribución de tamaño de partícula.....	29
2.3.3.4 Composición de la solución coloidal conteniendo NPs de cobre.....	29
2.3.4 Determinación de actividad biocida de la solución coloidal de las NPs.....	30
2.3.4.1 Time kill test.....	30
2.3.5 Análisis estadístico, obtención de la superficie de respuesta y optimización de las variables de respuesta.	32
3. RESULTADOS.....	34
3.1 Pruebas preliminares	34
3.1.1 Síntesis química de NPs-Cu para la determinación del medio de reacción.....	34
3.1.2 Síntesis de NPs-Cu con glucosa en medio acuoso: efecto del pH.	35
3.1.3 Síntesis de NPs-Cu con glucosa en medio acuoso: efecto del tensoactivo.....	35
3.1.4 Síntesis de NPs-Cu usando extracto de hoja de Guayaba.....	37
3.2. Diseño experimental Box Behnken	37
3.2.1 Análisis de la influencia de las variables en el proceso de NPsCu a partir de extracto de hoja de guayaba.....	39
4. CONCLUSIONES	43
5. RECOMENDACIONES.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
APÉNDICES.....	52

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Síntesis de nanopartículas a partir de extractos vegetales y sus condiciones de reacción	20
Tabla 2. Variables de entrada para el diseño experimental tipo <i>Box-Behnken</i>	33
Tabla 3. Resultados de la síntesis química en agua y propilenglicol usando ácido ascórbico como agente reductor para la determinación del medio de reacción	34
Tabla 4. Resultados de la síntesis de NPsCu con glucosa como agente reductor, usando agua como medio de reacción	35
Tabla 5. Evaluación de la conversión y actividad biocida de las NPsCu obtenidas mediante síntesis usando glucosa como agente reductor en medio acuoso, pH 10, adicionando diferentes tensoactivos	36
Tabla 6. Evaluación de conversión y tamaño de partículas de las NPsCu obtenidas mediante síntesis usando extracto de hoja de guayaba como agente reductor en medio acuoso, a pH 4.2 y 10	37
Tabla 7. Mejores agentes biocidas	39
Tabla G1. Ecuaciones de segundo orden para las variables de respuesta	65
Tabla H1. Valores de predicción de respuesta	66
Tabla H2. Valores obtenidos para la verificación del modelo	66

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Tabla I1. Resumen de los valores de respuestas del diseño de experimentos

67

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Reducción del ion cúprico con un aldehído en un medio alcalino	21
Figura 2. Localización del consorcio microbiano presentes en tuberías de inyección	22
Figura 3. Mecanismos de inhibición celular mediante el uso de nanopartículas de cobre	23
Figura 4. Diagrama explicativo para la metodología	25
Figura 5. Distribución de tamaño de partícula para la mejor síntesis	41
Figura 6. Gráfica de FTIR para la síntesis óptima con los respectivos picos	42
Figura A1. Metodologías para la síntesis de nanopartículas	52
Figura A2. Mecanismo de reacción general síntesis de nanopartículas	52
Figura B1. Curva de Calibración usando propilenglicol como medio de reacción	53
Figura B2. Curva de calibración usando agua como medio de reacción	53
Figura B3. Verificación del valor máximo de absorbancia del CuSO_4 usando propilenglicol como medio	54
Figura B4. Verificación del valor máximo de absorbancia del CuSO_4 usando agua como medio	54
Figura B5. Curva de calibración de las BSRs	55
Figura C1. Componentes del medio Starkey modificado	56

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Figura C2. Metodología para la neutralización	56
Figura D1. Distribución de tamaño de partícula para la síntesis con propilenglicol y agua usando ácido ascórbico como reductor para definir el medio de síntesis	57
Figura D2. Distribución de tamaño de partícula síntesis con extracto de hoja de guayaba	57
Figura E1. Estabilidad de la síntesis química usando ácido ascórbico en agua	58
Figura E2. Estabilidad de la síntesis química usando ácido ascórbico en propilenglicol	58
Figura F1. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); concentración de tensoactivo vs pH manteniendo temperatura y relación constantes	59
Figura F2. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); concentración de tensoactivo vs Relación precursor-extracto manteniendo temperatura y pH constantes	59
Figura F3. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); Relación precursor-extracto vs. pH, manteniendo temperatura y concentración de tensoactivo constantes	60
Figura F4. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); pH vs Temperatura, manteniendo relación precursor-extracto y concentración de tensoactivo constantes	60
Figura F5. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); Relación precursor-extracto vs Temperatura manteniendo pH y concentración de tensoactivo constantes	61
Figura F6. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); concentración de tensoactivo vs Temperatura manteniendo pH y relación entre reactivos constantes	61

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Figura F7. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; concentración de tensoactivo vs pH manteniendo, temperatura y relación precursor-extracto constantes	62
Figura F8. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; concentración de tensoactivo vs Relación precursor-extracto manteniendo temperatura y pH constantes	62
Figura F9. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; Relación precursor-extracto vs pH, manteniendo temperatura y concentración de tensoactivo constantes	63
Figura F10. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; Relación precursor-extracto vs temperatura, manteniendo pH y concentración de tensoactivo constantes	63
Figura F11. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; concentración de tensoactivo vs temperatura manteniendo pH y relación precursor-extracto constantes	64
Figura F12. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; pH vs Temperatura, manteniendo relación precursor-extracto y concentración de tensoactivo constantes	64
Figura G1. Mejores condiciones de síntesis	65
Figura J1. Síntesis a nivel bajo de temperatura y nivel alto y bajo de pH	68
Figura J2. Síntesis a nivel medio de temperatura y niveles alto y bajo de pH	68
Figura J3. Síntesis a nivel alto de temperatura y niveles alto y bajo de pH	68

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice A. Mecanismo de reacción para la síntesis de nanopartículas mediante el uso de extractos vegetales.....	52
Apéndice B. Curvas de calibración.....	53
Apéndice C. Determinación de la actividad biocida.....	56
Apéndice D. Distribución de tamaño de partícula.....	57
Apéndice E. Estabilidad de la solución coloidal para síntesis química	58
Apéndice F. Gráficas de contorno.....	59
Apéndice G. Obtención de las mejores condiciones.....	65
Apéndice H. Verificación del modelo en la síntesis con las mejores condiciones de reacción...	66
Apéndice I. Resumen de los valores de respuesta en el diseño experimental.....	67
Apéndice J. Influencia del pH en la concentración de la solución coloidal.....	68

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

LISTA DE ABREVIATURAS

BSRs:	Bacterias Sulfato Reductoras
CB:	Cloruro de Benzalconio
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado
DLS:	Dispersión Dinámica de Luz
FTIR:	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
LESS:	Lauril Éter Sulfato de Sodio
NPs:	Nanopartículas
Ref.	Referencia

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Resumen en español

TÍTULO: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE A ESCALA DE LABORATORIO A PARTIR DE EXTRACTO DE HOJA DE GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA*) PARA EL CONTROL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS *

AUTORES: PABLO ANDRÉS CASTELLANOS PINZÓN, CARLOS JOVANY ULLOA SUÁREZ**

PALABRAS CLAVE: NANOPARTÍCULAS, SULFATO DE COBRE, HOJA DE GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA*), TENSOACTIVO, BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS.

DESCRIPCIÓN:

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad biocida de una solución coloidal de nanopartículas (NPs) de cobre, sintetizada por un método verde que aprovecha las propiedades fisicoquímicas de un extracto vegetal de hoja de guayaba (*Psidium guajava*). Las NPs de cobre se plantean como una alternativa a los biocidas convencionales aplicados en aguas de inyección y usados para mitigar la acción de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) cuya presencia afecta la integridad de las tuberías (biocorrosión) y la calidad del crudo extraído.

En el presente trabajo se generó un procedimiento para la síntesis de NPs de cobre a partir de extracto de hoja de guayaba partiendo de una sal precursora: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; evaluando en primera instancia la influencia de variables como el medio de síntesis (agua y propilenglicol) en la estabilidad de la solución coloidal, el pH (2 a 10) en la conversión del precursor usando como agente reductor la glucosa y el extracto de hoja de guayaba, y la presencia de un agente tensoactivo (Polisorbato 80, Cloruro de benzalconio y Lauril éter sulfato de sodio) en la actividad biocida de la solución. El análisis de la posible influencia de estas variables permitió llegar a un diseño experimental tipo Box-Behnken donde se analizaron la influencia de la temperatura (30-80°C), pH (8-12), relación v/v solución de precursor-extracto (1-9) y concentración de tensoactivo (1-5) en la conversión del precursor, cantidad de macropartículas (residuos) y su actividad biocida en BSR. Por último, se caracterizaron las NPs obtenidas a las mejores condiciones de síntesis (temperatura 59.9°C, pH 9.86, relación v/v precursor-extracto de 5.44 y concentración de tensoactivo de 2.9% v/v); que mostraron una composición de óxidos de cobre, polifenoles, entre otros compuestos orgánicos, además de un tamaño característico de partícula de 11.97 nm.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: PhD. Debora Alcida Nabarlatz

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Resumen en inglés

TITLE: SYNTHESIS OF COPPER NANOPARTICLES AT LABORATORY-SCALE FROM GUAVA LEAF EXTRACTS (*PSIDIUM GUAJAVA*) TO CONTROL SULFATE-REDUCING BACTERIA GROWTH.

AUTHORS: PABLO ANDRÉS CASTELLANOS PINZÓN, CARLOS JOVANY ULLOA SUÁREZ

KEY WORDS: NANOPARTICLES, COPPER SULFATE, GUAVA LEAF (*PSIDIUM GUAJAVA*), SURFACTANT, SULFATE-REDUCING BACTERIA.

DESCRIPTION:

The aim of this study is to evaluate the biocide activity of a copper nanoparticles colloidal solution, synthesized by a green method that takes advantage of the physicochemical properties of a Guava leaf plant extract (*Psidium guajava*) as an alternative to the conventional biocides applied in water for injection (WFI) and used to mitigate the action of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB), whose presence impacts pipeline integrity (biocorrosion) and extracted crude oil quality.

In this work, a procedure for the synthesis of copper nanoparticles (NPs) was generated from Guava leaf extract starting with a precursor salt: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; firstly evaluating the influence of variables, like medium (water and propylene glycol) on the stability of the colloidal solution, pH (from 2 to 10) on the conversion of the precursor (using glucose and the guava leaf extract as reducing agent), and the presence of a surfactant agent (Polysorbate 80, Benzalkonium Chloride and Sodium Lauryl Ether Sulfate) on the solution's biocide activity.

The analysis of the potential effect of these variables allowed to create a Box-Behnken experimental design, where the influence of temperature (30-80°C), pH (8-12), precursor solution-extract ratio v/v (1-9) and surfactant concentration v/v (1-5) on the conversion of precursor, macroparticles quantity (waste) and its biocide activity on SRB were analysed (taking values of 30 and 80°C, 8 and 12, 1 and 9 & 1 and 5, respectively).

Finally, the NPs were analyzed under the best synthesis conditions of temperature (59.9°C), pH (9.86), precursor-extract ratio (v/v) (5.44) and surfactant concentration (2.9 %v/v) showing a significant amount of copper oxides, polyphenols, among other organic compounds, as well as a characteristic particle size of 11.97 nm.

* Degree work.

** Faculty of Physic-Chemical Engineering. Chemical Engineering School. Director: PhD. Debora Alcida Nabarlat

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Introducción

La corrosión es una de las principales complicaciones en la industria del petróleo debido a que afecta la integridad de las estructuras metálicas disminuyendo la vida útil de estas. En Colombia se estiman pérdidas de aproximadamente 1300 millones de dólares (valor cercano al 1.3% del producto interno bruto del país), del cual entre el 30 y 40% de éstas está relacionado con la corrosión generada por microorganismos (MIC por sus siglas en inglés) (Garnica, 2011). Este tipo de corrosión es generado principalmente por Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) presentes en el agua de inyección de pozos. El incremento de esta población de microorganismos da origen al ácido sulfúrico (H_2S), el cual es uno de los principales componentes causantes de la corrosión (Almeida, 2014). Para controlar estos microorganismos, se usan biocidas convencionales, pero su uso indebido ha generado que las bacterias hayan adquirido resistencia a éstos, una alternativa para el control de estos microorganismos es el uso de nanopartículas (NPs) metálicas como biocidas.

Este trabajo se enmarca en el desarrollo realizado por la empresa Zumotec S.A. con el apoyo de Ecopetrol a través del Concurso “Innovate 2017”, en el cual se propuso una tecnología para el control de BSR a partir de la síntesis verde de NPs de cobre en solución coloidal, utilizando como agente reductor extracto de hoja de guayaba. Para la producción de NPs de cobre se usó sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) como precursor; se realizaron pruebas preliminares, donde se estableció el medio de reacción, para posteriormente evaluar el uso de glucosa y el extracto de hoja de guayaba como agentes reductores. Se trabajó con un diseño experimental tipo *Box-Behnken* que permitió el análisis de la conversión del precursor, la cantidad de macropartículas y

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

la actividad biocida en BSR; obteniendo las mejores condiciones de síntesis, y donde adicionalmente las NPs obtenidas fueron caracterizadas en su tamaño y composición.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar a escala laboratorio la síntesis de nanopartículas de cobre a partir del extracto de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y su actividad biocida en Bacterias Sulfato Reductoras.

1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar y evaluar las variables con mayor influencia en la síntesis de nanopartículas de cobre.
- ✓ Obtener las mejores condiciones de síntesis de nanopartículas de cobre (temperatura, pH, relación v/v solución del precursor/extracto y concentración de tensoactivo) y evaluar su efecto en la conversión del precursor, cantidad de macropartículas y su actividad biocida en BSR.
- ✓ Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, obtenidas a las mejores condiciones de síntesis, evaluando el tamaño de partícula en solución coloidal, su composición.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

2. Estado del arte**2.1 Marco teórico**

2.1.1. Síntesis de NPs. Este tipo de agentes pueden ser sintetizados por múltiples metodologías físicas o químicas. De manera general, las técnicas físicas requieren de procesos con alta demanda energética mientras que las químicas necesitan de agentes reductores agresivos que producen desechos peligrosos para el ambiente (Iravani, Korbekandi, & Zolfaghari, 2016). Debido a estas dificultades, han surgido nuevos agentes que aprovechan las características fisicoquímicas de gran variedad de plantas, haciendo que esta metodología sea de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Este proceso es conocido como reducción verde, en el cual se usan extractos de plantas (de hojas, frutos, raíces, entre otros) como agentes capaces de reducir los iones de las sales del precursor (sal metálica) (Mittal, Chisti, & Banerjee, 2013). Se pueden observar las diferentes técnicas utilizadas para estas síntesis en el **Apéndice A, Figura A1**.

2.1.2 Hoja de guayaba y sus propiedades. La guayaba es una de las frutas con mayor aporte a la agroindustria en la región de Santander, donde el cultivo de esta fruta equivale al 35% de la producción nacional. En este sentido únicamente en la Hoya del río Suárez (Santander, Colombia) la producción anual se valora en más de US\$24 millones ("CADENA DE GUAYABA Indicadores e Instrumentos", 2016). La hoja del guayabo generalmente se aprovecha para la preparación de extractos, los cuales permiten obtener una variedad de sustancias que le otorgan propiedades fisicoquímicas y biológicas con múltiples aplicaciones en diversos campos como la agroindustria (insecticidas), medicina alternativa (tratamiento para la gastroenteritis, diarrea, entre otros) y bioprocesos (agente antimicrobiano) (Gutiérrez, Mitchell, & Solis, 2008).

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Estos extractos pueden tener gran variedad de componentes, por ejemplo, Mahadevan, Vijayakumar, & Arulmozhi (2017) afirman la presencia de diferentes compuestos presentes en los extractos, tales como: hidroxiflavonas e hidroxicetonas. Por otro lado, investigaciones hechas por Verma y Mehata (2016) aseguran la presencia de terpenoides y posiblemente de flavanonas, compuestos que pueden ser aprovechados para la síntesis de NPs (Mittal, Chisti, & Banerjee, 2013; Wang, Wu, Xie, Wu, & Wu, 2018).

2.1.3 Reducción y su mecanismo de reacción. Para la síntesis de NPs, se han utilizado múltiples extractos, variando condiciones como: el precursor y su concentración de este, el extracto utilizado, la relación v/v de solución del precursor y extracto, la temperatura y el tiempo de reacción. (ver **Tabla 1**). La combinación de dichas variables puede llegar a afectar las propiedades de la solución coloidal como: estabilidad, tamaño de partícula, así como sus propiedades antimicrobianas.

Tabla 1. Síntesis de nanopartículas a partir de extractos vegetales y sus condiciones de reacción

Nanopartícula	Extracto	Precursor y su concentración	Relación v/v Solución precursor/extracto	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción	Tamaño (nm)	Ref.
Cobre	Latex de hojas de <i>Calotropis procera</i>	Acetato de cobre 3 mM	1/1	Ambiente	1 min	15	Harne <i>et al.</i> (2012)
Cobre	Caldo de flores de <i>Aloe vera</i>	Acetato de cobre 5 mM	1/1	50	30 min	40	Karimi & Mohsenzadeh (2015)
Cobre	Fruta de <i>Citrus medica</i>	Sulfato de cobre 1 mM	10/1	50	15 min	54	Nagaonkar, Shende, & Rai, (2015)
Plata	Hojas de <i>Psidium guajava L.</i>	Nitrato de plata (1mM)	5	Ambiente	3 horas	30.2	Wang <i>et al.</i> (2018)

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

La presencia de diferentes compuestos como enzimas, vitaminas, proteínas, polisacáridos, terpenoides, flavonoides, cetonas y aldehídos, en los extractos, es la responsable de la reducción de iones metálicos, tal como se muestra en el **Apéndice A, Figura A2** (Wang *et al.* 2018) y además pueden estabilizar las NPs evitando su aglomeración y precipitación (Hu & Hsieh, 2016; Wang *et al.* 2018). El propósito de este trabajo es la síntesis de NPs aprovechando los compuestos como los azúcares reductores; presentes en los extractos. Estas sustancias (solo los azúcares reductores) poseen una mejor actividad reductora cuando están en medio alcalino, ya que cuando hay mayor presencia de iones OH^- , el azúcar (aldehído) permite la reducción del Cu^{2+} presente en $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Carey, 2002). Lo anteriormente mencionado se presenta en la **Figura 1**.

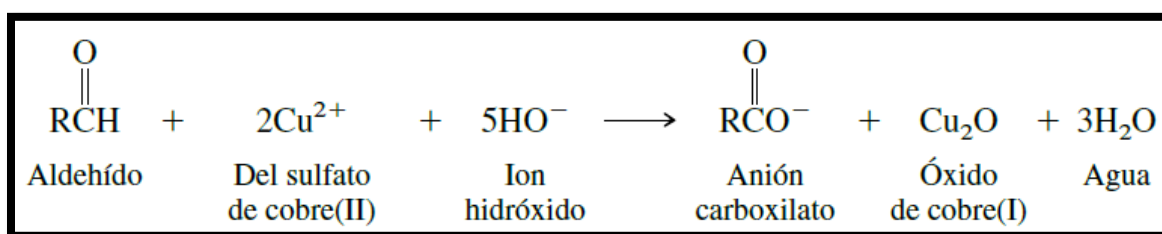


Figura 1. Reducción del ion cúprico con un aldehído en un medio alcalino (Carey, 2002)

2.1.4 Tamaño de partícula y uso de tensoactivos. Las NPs tienen la tendencia a unirse debido a las interacciones intermoleculares, generando problemas de aglomeración, causando que el tamaño promedio de partícula y su distribución puedan verse afectados (Thanh, Maclean, & Mahiddine, 2014). No obstante, estos pueden ser controlados seleccionando adecuadamente las condiciones de síntesis.

Estudios realizados por Camacho-Flores *et al.* (2015) y Quirino Barreda (2013) rectifican que las NPs metálicas pueden ser estabilizadas mediante el uso de tensoactivos en la síntesis de NPs en solución coloidal, debido a que la presencia de estos compuestos evita la aglomeración, precipitación y no permiten la degradación de NPs. Además, basados en otros estudios por Rengifo

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

(2016) que hace mención el uso Tween 80 como agente estabilizante en el proceso de síntesis de NPs.

2.1.5 Bacterias sulfato reductoras y biocorrosión. Las BSR son microorganismos anaerobios que viven en ambientes acuosos (**Figura 2**) y aprovechan los ácidos orgánicos, el hidrógeno y los sulfatos presentes en la descomposición de nutrientes produciendo sulfuros (S^{2-}) de manera que el hierro de las tuberías actúe anódicamente y complete la transferencia de electrones produciendo sulfuros de hierro (Almeida, 2014; Duque, 2007).

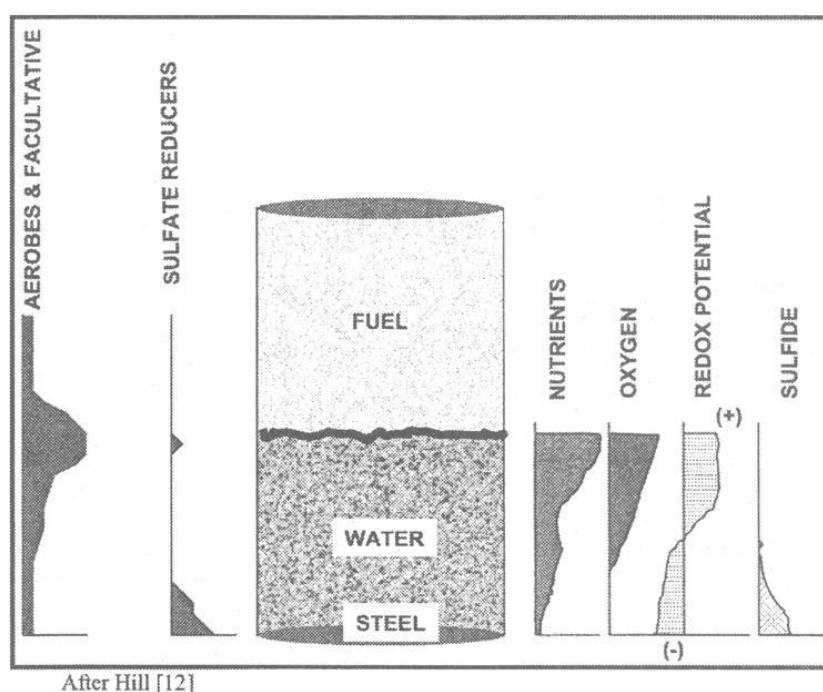


Figura 2. Localización del consorcio microbiano presentes en tuberías de inyección (Passman, 2003)

La presencia de estos microorganismos ha sido disminuida por agentes biocidas a base de glutaraldehído y sales de amonio cuaternario (Almeida, 2014), otros productos utilizados son tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS) y 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA) como es descrito en Microbial Control A part of DuPont Industrial Biosciences, (2012). Estos productos al ser desechados generan acumulación de sustancias tóxicas, que genera

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

degradación química, y conlleva a la pérdida parcial o total del suelo donde se depositen debido a la desaparición de los organismos que viven ahí, y el uso inapropiado de estos se ha ocasionado la manifestación de resistencia por parte de los microorganismos (Almeida, 2014).

2.1.6 Nanopartículas y su actividad biocida. El uso de agentes biocidas no convencionales a base de NPs ha demostrado ser un campo amplio de interés para muchos investigadores. En este sentido, se han utilizado NPs de plata y oro para generar materiales funcionalizados con propiedades antimicrobianas. Estos materiales, debido a su tamaño de partícula pueden inactivar las proteínas y enzimas conduciendo a la muerte de la célula (Das, Gang, Nath & Bhattacharjee, 2010), también estas estructuras pueden afectar el potencial electroquímico de la membrana afectando su integridad y producir estrés oxidativo (Deryabin *et al.*, 2013). Otros posibles mecanismos pueden verse en la **Figura 3**.

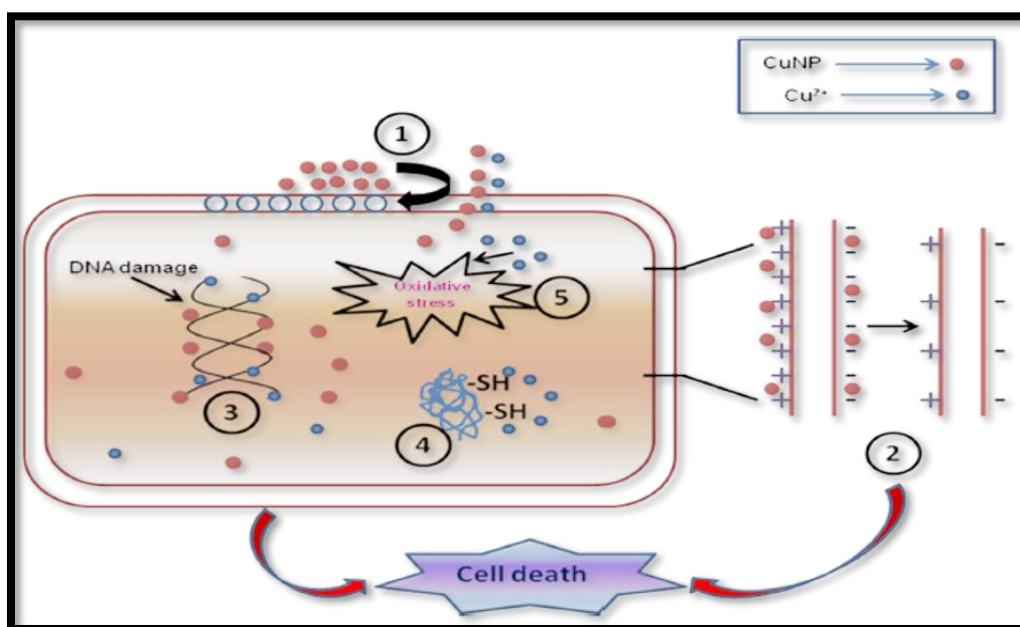


Figura 3. *Mecanismos de inhibición celular mediante el uso de nanopartículas de cobre* (Shende, Ingle, Gade, & Rai, 2015), donde: 1) La acumulación de NPs de Cu en la pared, 2) La interacción de los NPs de Cu con la membrana, 3) Daños en el ADN, 4) Interacción de Cu²⁺ que inactiva las proteínas y 5) Entrada de NPs-Cu y Cu²⁺ produce estrés oxidativo.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

2.2. Materiales

Para las reacciones de síntesis se utilizaron: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (98%), ácido ascórbico (>99%), ácido cítrico (>99%), dextrosa (98%), polisorbato 80 (Tween 80) (100%, DISAN), Cloruro de Benzalconio (CB) (80%, Conquímica), Lauril Éter Sulfato de Sodio (LESS) (28%, DISAN), hidróxido de sodio industrial (50%p/p), agua desionizada, propilenglicol (100%, Conquímica) y glutaraldehído al 2%; suministrados por Zumotec S.A.

Para la preparación del extracto de hoja de Guayaba (*Psidium guajava*), las hojas fueron recolectadas y suministradas por Zumotec S.A, provenientes de árboles con más de tres años de haber sido plantados en los municipios de Vélez y Floridablanca (Santander, Colombia). Para las extracciones se utilizó agua desionizada, ácido cítrico industrial granulado e hidróxido de sodio industrial (50%p/p) suministrados por Zumotec S.A.

Por último, los componentes para los medios: K_2PO_4 (>99%, Sharlau), NH_4Cl (>99%, Sharlau), NaCl (>99%, Sharlau), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (>99%, Sharlau), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99%, Sharlau) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (>99%, Sharlau), K_2HPO_4 (99.5%, Sharlau), CaCl_2 (99.8%, Sharlau), NaSO_4 (99.5%, Sharlau), MgSO_4 (>99.9%, Sharlau) y Lactato de sodio 50% p/p (>99%, Sharlau); que fueron suministrados por Zumotec S.A.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

2.3 Método

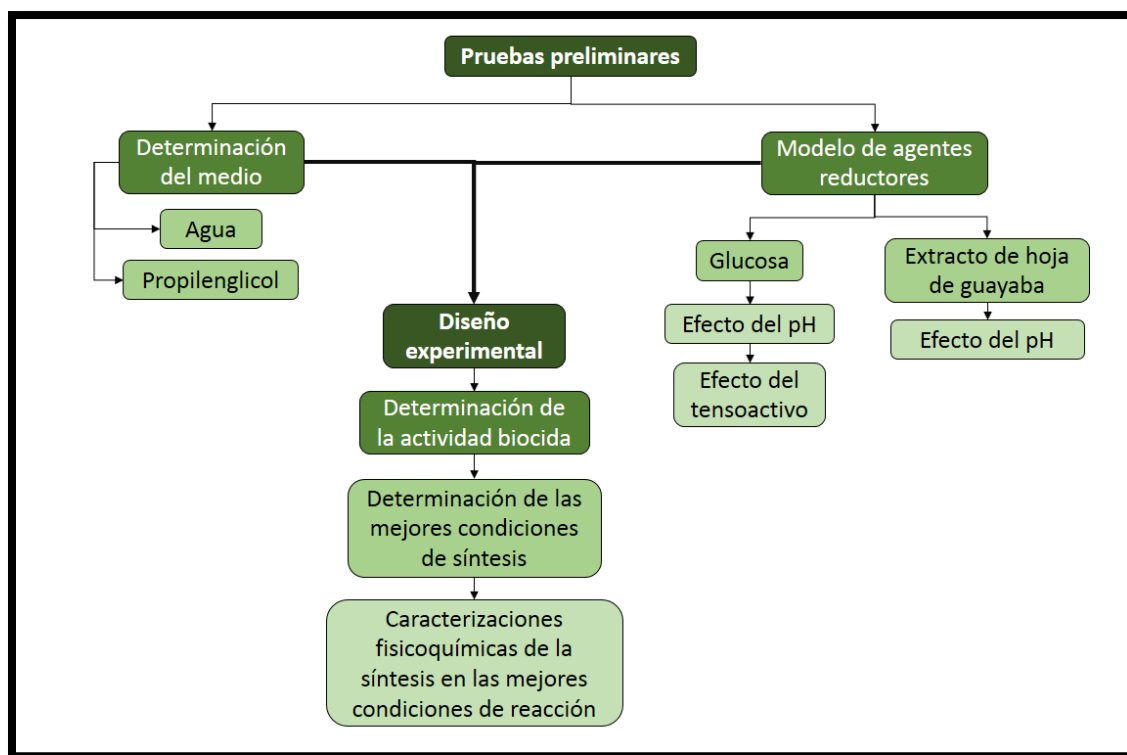


Figura 4. Diagrama explicativo para la metodología

2.3.1 Pruebas preliminares. Estas fueron realizadas con el propósito de realizar la síntesis de NPs de cobre, analizando cuáles variables son de importancia para el desarrollo del diseño de experimentos.

2.3.1.1 Estandarización del proceso de síntesis. El proceso de síntesis fue realizado (para la totalidad de las reacciones) de la siguiente manera: se prepararon las soluciones de precursor y del agente reductor, para las pruebas preliminares siempre se pesaron 5 gramos de la sal precursora y 10 gramos del agente reductor y, se disolvieron el 70 y 30 mL del medio, respectivamente. Seguidamente se precalentaron las soluciones hasta la temperatura de reacción (para las pruebas preliminares fue siempre de 80°C) bajo constante agitación de 800 rpm y se mezclaron las soluciones adicionando otros agentes (como tensoactivos) de ser necesario.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Posteriormente se reguló el pH usando soda cáustica al 50% p/v y se dejó un tiempo estándar de síntesis de 2 horas. Una vez finalizada la reacción, la solución obtenida fue llevada a temperatura ambiente y centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. Obtenido de este modo la solución coloidal de NPs (permeado) y macropartículas (precipitado). Finalmente, se procedió a realizar las pruebas de caracterización para la solución coloidal de NPs.

2.3.1.2 Síntesis química para determinación del medio. Con el fin de determinar un medio para la síntesis, se decidió trabajar con un medio inorgánico y uno orgánico, eligiendo: agua y propilenglicol, respectivamente. Para ello se usó $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como precursor, ácido ascórbico como agente reductor (Fathima, Pugazhendhi, Oves, & Venis, 2018; Jain, Jain, Kachhawah, & Devra, 2015). Las reacciones se hicieron por duplicado, una vez terminadas la solución coloidal de NPs (permeado) fue caracterizada por medio de espectrofotometría UV-vis obteniendo así la conversión del precursor e indicios de estabilidad de la solución esto mediante una prueba cualitativa de estabilidad acelerada, además un análisis DLS para conocer el tamaño de partícula en solución coloidal.

2.3.1.3 Síntesis con glucosa. Basados en los resultados de la etapa anterior, se escogió el medio de reacción, usando la misma sal precursora se escogió la glucosa agente reductor, como modelo para la síntesis con extracto de hoja de guayaba. Para evaluar la influencia del pH, este se ajustó utilizando soda cáustica NaOH al 50% p/v y ácido ascórbico (1 M), evaluando el medio ácido (pH 2), alcalino (pH 10), neutro (pH 7), y sin regular (pH 4.11). Las reacciones se hicieron por duplicado, y una vez finalizadas se estimó el % de conversión de precursor mediante espectrofotometría UV-vis.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

2.3.1.4 Síntesis con glucosa y tensoactivos. Para evaluar la influencia de los tensoactivos durante la síntesis, se evaluaron tres tipos de tensoactivos por duplicado: aniónico (LESS), iónico (CB) y no iónico (Tween 80) y, se adicionó 3% v/v (Rengifo, 2016), del tensoactivo y posteriormente se reguló el pH al valor que presentó los mejores resultados en la síntesis previa. De igual modo se determinó el porcentaje de conversión del precursor mediante espectrofotometría UV-vis, además de evaluar su actividad biocida mediante el método de *Time Kill Test*.

2.3.1.5 Síntesis con extracto de hoja de guayaba. Para evaluar la síntesis de NPs de cobre utilizando extracto de hoja de guayaba, este fue preparado de acuerdo con el procedimiento descrito por Sierra Triana, D. y Parra Moreno, J. (2018), donde la hoja se secó y molió hasta alcanzar un tamaño de partícula menor a 0.358 mm. Para la preparación del extracto, se utilizó una relación 2:1 (mL agua desionizada: g de hoja seca) y se dejó reposar durante 2 h, este proceso se denomina hinchamiento. Seguidamente, se agregó agua desionizada suficiente para completar una relación líquido/sólido igual a 12 (mL de agua desionizada/g de hoja seca) y finalmente se ajustó el pH a 4.3 con ácido cítrico 1 M. Esta mezcla se dejó en reposo durante 24 h para la obtención del extracto de guayaba, luego del cual se centrifugó a 3000 rpm por 2 min y se filtró con un papel filtro con tamaño de poro de 4-12 μm , con el fin de retirar el material vegetal no precipitado. Finalmente, el extracto obtenido se almacena bajo refrigeración.

Para la reacción de síntesis, se pesaron 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en el medio escogido hasta completar 70 mililitros de solución; además, se tomaron 30 mL de extracto, con el fin de completar un volumen de reacción de 100 mL. Se trabajaron las reacciones ajustando el pH al óptimo escogido en la etapa de síntesis con glucosa y sin regular (pH 4.2). Las reacciones se

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

hicieron por duplicado, y de manera análoga se determinaron la conversión del precursor mediante espectrofotometría UV-vis y el tamaño de partícula en solución mediante DLS.

2.3.2 Influencia de los parámetros durante la síntesis de NPs-Cu usando extracto de hoja de guayaba. La **Tabla 1** resume la influencia de variables como temperatura y relación v/v solución del precursor-extracto, y las pruebas preliminares permitieron verificar la influencia del pH en la reacción. Además, también es importante considerar que el tensoactivo va a ser un parámetro importante para la síntesis ya que podría coayudar al control del tamaño de las NPs en solución. Teniendo esto en cuenta se quiso verificar la influencia de estas 4 variables en el proceso de síntesis de NPs, el cual fue evaluado considerando las siguientes variables de salida: conversión de la sal precursora, cantidad de macropartículas y actividad biocida.

2.3.3 Caracterizaciones fisicoquímicas de la solución coloidal

2.3.3.1 %Conversión del precursor. Con el fin de estimar la concentración soluciones con concentraciones de 0.075, 0.05, 0.04, 0.025, 0.02, y 0.01 M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, evaluando la absorbancia por espectrofotometría UV-Vis (donde el blanco fue el medio de trabajo), utilizando un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 Visible. Los experimentos se realizaron variando la longitud de onda entre 300 a 1000 nm operando a una resolución de 1 nm y usando una microcelda de plástico de 4 mm.. El máximo de absorbancia (a la correspondiente longitud de onda) del precursor en solución fue tomado como indicador de la concentración del precursor generando una correlación entre las variables mediante la ley de Beer-Lambert (Skoog, Holler, & Nieman, 2001). Las gráficas, ecuaciones y coeficientes de determinación correspondientes se encuentran en el **Apéndice B, Figuras B1, B2, B3 y B4**. Estas fueron usadas para determinar la concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Para determinar la conversión de la sal precursora en la síntesis de NPs, se depositaron 2.5 mL de la solución coloidal de NPs (permeado) en una microcelda de plástico de 4 mm ($[CuSO_4]_{Final}$) y también se realizó la medición del valor máximo de absorbancia. Con el valor conocido de $[CuSO_4]_{inicial}$ y $[CuSO_4]_{Final}$ se calcula el valor de conversión mediante la **Ecuación 1**.

$$(Ecuación 1) \quad \%Conversion = \frac{[CuSO_4]_{inicial} - [CuSO_4]_{Final}}{[CuSO_4]_{inicial}} * 100.$$

2.3.3.2 Cantidad de macropartículas. Con el fin de cuantificar la cantidad de macropartículas obtenidas durante el proceso de síntesis se realizó un análisis gravimétrico. Para esto, después del proceso de centrifugación el sobrenadante se filtró usando un papel filtro de diámetro 125 mm, con una capacidad de retención promedio de 4-12 μm (peso del papel igual a 0.48 ± 0.02 g). El papel que tenía el filtrado del sobrenadante y los sólidos precipitados en la centrifugación fueron llevados a una balanza analítica donde se determinó la cantidad de macropartículas en base húmeda.

2.3.3.3 Distribución de tamaño de partícula. La distribución de los tamaños de las NPs obtenidas fue evaluada mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés), donde se depositó 1 mL de la dispersión coloidal de NPs en una celda tipo DTS0012 de poliestireno (Recencia Malvern) para luego colocarla en el equipo Zetasizer Nano ZS90-MALVERN. Se hicieron mediciones puntuales con repetición para cada muestra a 25°C, donde el agente dispersante fue agua (índice de refracción 1,33).

2.3.3.4 Composición de la solución coloidal conteniendo NPs de cobre. Para evaluar la composición de la solución obtenida luego de los experimentos, se realizó un análisis infrarrojo. Para lo cual se prepararon muestras, tomando 20 mL de la solución coloidal se llevaron a un deshidratador Avantco CFD10 de acero inoxidable, durante 4 horas a 120°C, obteniendo así un

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

semisólido. Este semisólido se lleva a un Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) marca Shimadzu modelo IRTracer-100 con sistema de Reflectancia Total Atenuada (ATR), celda de diamante y selenuro de cinc.

2.3.4 Determinación de actividad biocida de la solución coloidal de las NPs.

2.3.4.1 Time kill test. La actividad biocida de las diferentes muestras (síntesis con glucosa y tensoactivos, y las reacciones del diseño de experimentos) fue evaluada con la cepa ATCC 19858 (*Desulfotomaculum nigrificans*), suministrada por el Instituto Colombiano de Petróleo (ICP). Se usó la metodología descrita en el *Time Kill Test* (ASTM International (s.f.)), en el medio *Starkey* modificado (Passman, 2003) (**Apéndice C, Figura C1**).

El inóculo se preparó agregando 5 mL de la cepa (almacenada a 6°C) a 50 mL del medio, el cual fue puesto en incubación a 37 °C por 24 horas; tiempo necesario para obtener una concentración de microorganismos de 10^6 bacterias en 55 ml = 18182 bacterias/ml (control positivo o inóculo). Para la preparación del medio, se agregan los componentes (**Apéndice C, Figura C1**), se ajustó el pH a 7.5 (NaOH al 10% p/v), luego se dosificó en volúmenes de 9.0 mL en frascos de vidrio con tapón de caucho y agrafes de aluminio. Se desplazó el oxígeno del recipiente inyectando una aguja sola y otra conectada al sistema de gases que inyectó N₂, permitiendo así un ambiente anaerobio, posteriormente los frascos pasan a un autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

Los agentes biocidas no convencionales (soluciones coloidales de NPs) y el glutaraldehído (para fines comparativos) van a ser evaluados a una concentración de 200 ppm (0,2 mL de agente/10 mL de muestra), valor al que se agregan los agentes convencionales en aguas de

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

inyección. El inóculo fue puesto en contacto con la solución coloidal de NPs (agente biocida) al agregar 1 mL de este a un recipiente de vidrio (con el medio y el agente biocida), que luego fue llevado a incubación por 1 hora a 37 °C, este frasco será conocido como muestra continua, es decir esta muestra siempre estuvo en contacto con el agente biocida a la concentración evaluada (200 ppm). La metodología tiene un procedimiento para inactivar el agente biocida conocido como neutralización, el cual se hace mediante las diluciones seriadas de la muestra continua iniciando una hora después de entrar en contacto el agente biocida con el inóculo (t_0): se toma 1 mL de la muestra continua y este es pasado a otro recipiente (con el medio utilizado), 2 horas después se toma 1 mL de la muestra anterior pasándolo a otro frasco (con el medio utilizado), las siguientes diluciones se hacen de manera similar, pero en tiempos de 4, 24, 48, 72 horas y 8 días como se resume en el **Apéndice C, Figura C2**.

El parámetro de reducción de la población microbiana se obtuvo por duplicado comparando la concentración microbiana del control positivo y de la muestra continua en t_0 (es decir 1 hora después de haber entrado en contacto el agente biocida), usando un parámetro conocido como *RL* (este es determinado mediante la ecuación 2):

(Ecuación 2)

$$\log_{10} RL = \log_{10} Control\ positivo - \log_{10} Continua \quad \text{ASTM International (s.f.)}$$

Cuyo correspondiente valor de porcentaje de reducción fue calculado de la siguiente manera:

(Ecuación 3)

$$\%Reducción = 100 * (1 - 10^{-RL})$$

ASTM International (s.f.)

La cuantificación de los microorganismos fue aproximada mediante la medición de la absorbancia (medida en el equipo Spectronic Genesys 5 UV-Visible) a 600 nm usando como blanco el medio más el agente biocida en la concentración correspondiente, para ello se requirió

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

de una curva de calibración de la cepa: sabiendo que la concentración microbiana inicial corresponde a 18182 *bacterias/ml*, con esta concentración y las diluciones respectivas se midió la absorbancia (por duplicado), generando la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = 3.118 * 10^{-6}[\text{Concentración microbiana en UFC/ml}] + 6.157 * 10^{-3}$$

$$R^2 = 0.958$$

Las gráficas correspondientes a este procedimiento se encuentran en el **Apéndice B, Figura B5**.

2.3.5 Análisis estadístico, obtención de la superficie de respuesta y optimización de las variables de respuesta. Se utilizó un diseño experimental tipo Box-Behnken, con 4 variables: temperatura, pH, relación v/v solución del precursor/extracto y concentración v/v de tensoactivo teniendo en cuenta 3 niveles (**Tabla 2**), generando 54 puntos que incluyen 1 réplica.

Los datos experimentales fueron analizados por medio de una Regresión de Superficie de Respuesta (RSM por sus siglas en inglés) (Box & Wilson, 1951) que se ajustó a una ecuación polinomial de segundo orden; para la maximización del % de conversión y de la actividad biocida, y la minimización de la cantidad de macropartículas se empleó el software estadístico Minitab 18. Además, con el fin de corroborar el ajuste del modelo obtenido mediante RSM, se elaboraron 2 pruebas adicionales en el punto óptimo. Se evaluó un intervalo de confianza del 95% con el fin de verificar la reproducibilidad con datos reales generados.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Tabla 2. Variables de entrada para el diseño experimental tipo Box-Behken

Factores continuos	Valor bajo	Valor medio	Valor alto
Temperatura	30°C	55 °C	80°C
pH	8	10	12
Relación v/v solución del precursor/extracto	1	5	9
Concentración v/v Tensoactivo	1	3	5

Para estos experimentos, se consideró la concentración de la sal precursora (0.2 M) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ constante para todas las reacciones (antes de ser mezclada), así como un volumen de reacción constante de 100 mL (considerado como la suma de la solución del precursor, el extracto y el tensoactivo). Además, el pH fue regulado con NaOH 50% p/v, y las condiciones de agitación y tiempo de reacción se mantuvieron constantes y en los valores descritos en el apartado 2.3.1.1.

Una vez realizados los 54 puntos, la solución coloidal se caracterizó mediante espectrofotometría UV-Vis para determinar la conversión del precursor, se evaluó su actividad biocida mediante el método *Time Kill Test* (ASTM International (s.f.)) y se pesó la cantidad de macropartículas después de la centrifugación y filtración.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

3. Resultados**3.1 Pruebas preliminares**

3.1.1 Síntesis química de NPs-Cu para la determinación del medio de reacción. En la **Tabla 3**, se resumen los resultados obtenidos para cada medio trabajado: Porcentaje de conversión, actividad biocida (de la solución coloidal más diluida) y tamaño de partícula.

Tabla 3. Resultados de la síntesis química en agua y propilenglicol usando ácido ascórbico como agente reductor para la determinación del medio de reacción

Medio	Conversión $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (%)	Tamaño promedio de partícula (nm)
H_2O	93.05 ± 0.017	21.56
Propilenglicol	80.06 ± 0.016	66.30

Se puede observar que la conversión del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se encuentra entre 80% y 93% para propilenglicol y agua, respectivamente. Esta diferencia puede deberse a la solubilidad del precursor, y del agente reductor en los medios (0.33 g/mL para el agua y 0.05 g/mL para el propilenglicol).

Además, como se puede apreciar en el **Apéndice D, Figura D1**, cuando se utiliza agua como medio se obtienen 2 tamaños de partícula y solo uno para el propilenglicol, esto se debe al efecto que tienen los grupos hidroxilo (del medio orgánico) en la dispersión de las NPs, estos grupos ayudan a que el tamaño de partícula sea definido otorgando estabilidad a la solución y evitando la oxidación (Jain, Jain, Kachhawah, & Devra, 2015). Esta última característica es verificada en las pruebas de estabilidad realizadas (por 1 mes) (**Apéndice E, Figuras E1 y E2**), ya que para el

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

propilenglicol los cambios del espectro visible son cualitativamente menores que para las reacciones llevadas a cabo en agua. Se escogió agua como medio, ya que, aunque se presentó una menor estabilidad de la solución coloidal, este medió proporcionó una mejor conversión y un menor tamaño de partícula (factor que mejoraría la actividad biocida de la solución coloidal).

3.1.2 Síntesis de NPs-Cu con glucosa en medio acuoso: efecto del pH. En la **Tabla 4**, se resumen los resultados del porcentaje de conversión del precursor obtenidos al realizar la síntesis con glucosa como agente reductor ajustando el pH del medio de reacción.

Tabla 4. Resultados de la síntesis de NPs-Cu con glucosa como agente reductor, usando agua como medio de reacción

pH	Conversión CuSO ₄ *5H ₂ O (%)
2	17.82 ± 0.37
4.11	20.93 ± 1.94
7	44.87 ± 0.22
10	93.81 ± 0.32

Los resultados indican que al aumentar el pH se aumenta el grado de conversión del precursor, pasando de 17.82 ± 0.37 % de conversión a pH 2, hasta 93.81 ± 0.32% a pH 10. De esta manera se comprobó lo descrito por Carey, (2002) el cual hace mención que un medio alcalino favorece la reacción de reducción del sulfato de cobre usando como reductor un aldehído (en este caso glucosa).

3.1.3 Síntesis de NPs-Cu con glucosa en medio acuoso: efecto del tensoactivo. En la **Tabla 5** se muestran los resultados de la conversión del CuSO₄*5H₂O al realizar la síntesis usando glucosa como azúcar reductor en medio acuoso, ajustando el pH con un medio alcalino y

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

adicionando diferentes tensoactivos: aniónico (LESS), iónico (CB) y no iónico (Tween 80) a la reacción como agente estabilizante.

Tabla 5. Evaluación de la conversión y actividad biocida de las NPsCu obtenidas mediante síntesis usando glucosa como agente reductor en medio acuoso, pH 10, adicionando diferentes tensoactivos

Tensoactivo	Conversión CuSO ₄ *5H ₂ O (%)	Actividad biocida (RL)
LESS	97.51 ± 1.8	0.957 ± 0.006
CB	96.73 ± 0.2	0.963 ± 0.028
Tween 80	97.54 ± 0.4	0.971 ± 0.041

Condiciones de reacción: 5 g de CuSO₄*5H₂O, 10g de ácido ascórbico y 3 ml del respectivo tensoactivo en 100 mL de agua desionizada, manteniendo una agitación constante de 800 rpm a una temperatura de 80°C durante 2 h

Se puede decir que la conversión no sufre cambios independientemente del tensoactivo que se agregue, lo cual es de esperar ya que los tensoactivos son simplemente aditivos que se agregan para estabilizar la solución. En cuando a la actividad biocida tampoco se presentaron cambios significativos, comparado a cuando no se agregaron estos agentes. Ahora bien, para escoger el tensoactivo a utilizar se hizo la siguiente consideración: los tensoactivos aniónicos y catiónicos (LESS y CB, respectivamente) además de ser usados como estabilizantes y surfactantes, presentan actividad antimicrobiana (Azanza JR, 2003) generando incertidumbre al momento de medir la actividad biocida de la solución coloidal obtenida, ya que no se sabría si dicha actividad es debida a los agentes estabilizantes o a la solución en sí. En cambio, el Tween 80 (tensoactivo no iónico) no presenta actividad biocida por sí solo, entonces para la reacción que se preparó con este agente la actividad biocida era debida a los demás componentes en la mezcla, esta fue la razón por la que se escogió este tensoactivo.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

3.1.4 Síntesis de NPs-Cu usando extracto de hoja de Guayaba. Basados en los resultados obtenidos en la síntesis de NPs-Cu con glucosa, se decidió evaluar el efecto del pH a dos niveles (sin control de pH, y pH 10) en la síntesis de NPs-Cu usando extracto de hoja de guayaba como agente reductor. Para esto midió el porcentaje de conversión del precursor y el tamaño promedio de partícula (nm), resultados que se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Evaluación de conversión y tamaño de partícula de las NPs_{Cu} obtenidas mediante síntesis usando extracto de hoja de guayaba como agente reductor en medio acuoso, a pH 4.2 y 10

pH	Conversión CuSO ₄ *5H ₂ O (%)	Tamaño promedio de partícula (nm)
4.2 (sin regular)	9.09 ± 1.26	1152.70
10	87.31 ± 3.6	288.20

Para la síntesis de NPs a partir de extractos, el efecto del pH es reconocido, el aumento de este puede favorecer la reducción lo que lleva al aumento de las NPs generadas (Guo, Li, Yang, & Liu, 2015; Velmurugan et al., 2014) y también favorece la formación de NPs más pequeñas (Iravani & Zolfaghari, 2013; Kim et al., 2016). Para esta síntesis se confirma la importancia del pH por el aumento de la conversión del precursor de 9.09 ± 1.26 a $87.31 \pm 3.6\%$, también se verifica la disminución del tamaño de NPs de 1152.7 a 288.2 nm (los análisis por DLS se muestran en el **Apéndice D, Figura D2**).

3.2. Diseño experimental *Box Behnken*

Las mejores condiciones de síntesis de NPs-Cu usando como agente reductor las hojas de guayaba y tween 80 como agente estabilizante fueron determinadas mediante análisis de superficie de respuesta como se muestran en el **Apéndice F, Figuras F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9**,

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

F10, F11 y F12. Donde se analizó la influencia de las variables temperatura, pH, concentración de tensoactivo y relación (v/v) solución del precursor-extracto, esto con el propósito de verificar el rango de las variables de entrada en donde se podría encontrar las mejores condiciones de síntesis.

Con las gráficas de contorno se puede predecir los rangos de valores en los que se encuentra la mejor síntesis. Estos valores se encuentran cerca de los puntos medios de cada una de las gráficas de contorno, encontrándose en valores de temperatura entre 50°C-60°C, pH entre 9 y 10, relación solución del precursor/extracto entre 5 y 6, y la concentración v/v de tensoactivo con un valor entre 2 y 4%. Lo anteriormente descrito se pudo rectificar mediante la obtención de un modelo de superficie de respuesta de segundo orden, en el cual se obtuvieron los valores de: temperatura de 59.8 °C, pH de 9.86, relación volumétrica precursor/extracto de 5.44 y una concentración de tensoactivo igual a 2.9% v/v, los cuales permiten obtener una conversión del precursor cercana al 100%, 5.99 gramos de macropartículas y un RL (actividad biocida) de 15.57 (Para apreciar la gráfica de los mejores valores y los modelos de segundo orden obtenidos **ver Apéndice G, Figura G1 y Tabla G1**). Además, con el fin de verificar el modelo obtenido se realizó una reacción de síntesis de NPsCu usando las condiciones obtenidas en este. Obteniendo de este modo un 99.17% de conversión del precursor, 7.59 g de macropartículas y un RL (Actividad biocida) igual a 15.2; verificando así la validez del modelo obtenido, ya que las variables de respuesta están en intervalos de 95% de confianza (**ver Apéndice H, Tablas H1 y H2**).

En la **Tabla 7**, se muestra las reacciones de síntesis de NPs-Cu realizadas durante el diseño de experimentos las cuales presentan una mejor actividad biocida, es decir su actividad biocida es superior a la del glutaraldehído (agente biocida comúnmente utilizado para el control de BSR en pozo). Además de ver las demás variables de respuesta % Conversión de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y Cantidad

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

de micropartículas (g). Cabe resaltar que las condiciones de reacción se encuentran dentro del rango óptimo establecido anteriormente mediante el análisis superficie (gráficas de contorno). (Para ver todos los resultados del diseño ver **Apéndice I, Tabla I1**).

Tabla 7. Mejores agentes biocidas

Reacción	*Condiciones de Reacción	% Conversión CuSO ₄ *5H ₂ O	Cantidad de micropartículas (g)	Actividad biocida (RL)
		Promedio	Promedio	Promedio
6	30-10-1-3	96.92 ± 1.19	39.33 ± 2.49	8.05 ± 0.07
16	55-10-9-1	99.58 ± 0.37	9.15 ± 1.05	5.32 ± 0.02
17	55-8-1-3	97.32 ± 0.12	22.82 ± 0.31	5.34 ± 0.01
18	55-8-9-3	99.34 ± 0.20	8.68 ± 0.86	6.65 ± 0.07
19	55-10-5-3	99.08 ± 0.20	7.66 ± 0.28	15.86 ± 0.33
25	80-8-5-3	99.38 ± 0.43	8.48 ± 0.06	5.31 ± 0.03
28	Glutaraldehído	-	-	3.67 ± 0.05

*Para el seguimiento de las reacciones se usó la siguiente nomenclatura: Temperatura – pH - Relación v/v solución de precursor-extracto – concentración v/v del tensoactivo; Ejemplo:80-8-5-3.

Nota aclaratoria: Se mantuvo un volumen de reacción de 100 mL y una agitación constante de 800 rpm.

3.2.1 Análisis de la influencia de las variables en el proceso de NPsCu a partir de extracto de hoja de guayaba. El aumento de la temperatura, tiene el efecto de aumentar la concentración de la solución coloidal pero también se sugiere que este aumento podría producir NPs con menor tamaño (Farhadi, Ajerloo, & Mohammadi, 2017; Iravani & Zolfaghari, 2013). El aumento excesivo de la concentración de la solución coloidal podría llevar conlleva a la aglomeración (y posibles problemas de estabilidad) y la generación de mayores tamaños de partícula, teniendo un efecto directo en la actividad biocida del agente en cuestión. Los resultados obtenidos en el apartado anterior verifican lo anteriormente dicho, debido a que la mejor síntesis se presentó en un valor intermedio de temperatura (59.8°C), en donde se evitan problemas de aglomeración y una afectación negativa de la actividad biocida.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

La influencia del pH en la reacción, fue revisada en el apartado **3.1.4**, donde se mencionó que el aumento del pH favorece la reacción y genera mayor cantidad de NPs en solución coloidal (Guo, Li, Yang, & Liu, 2015; Velmurugan et al., 2014), es decir, mayor concentración (**ver Apéndice J, Figuras J1, J2 y J3**). No obstante, la presencia de otros tipos de compuestos orgánicos en la solución o como recubrimiento de las NPs (Hu & Hsieh, 2016; Wang *et al.* 2018) puede facilitar el crecimiento de la bacteria (como fuentes de carbono adicionales) obteniendo efectos opuestos a los deseados en esta investigación. Entonces la solución con mejor actividad biocida debería tener la concentración adecuada de todos los compuestos involucrados en la síntesis, no puede ser diluida (pH 8) ya que posiblemente no se inhibiría el crecimiento de las bacterias, ni con una concentración elevada (pH 12) por que ayudaría al crecimiento de estas. Si bien esto puede justificar que la mejor síntesis presentó un pH intermedio, el mecanismo de inhibición de las NPs (para este trabajo) es desconocido, por lo que no se puede afirmar o negar esta posible justificación.

Aumentar la concentración de la sal precursora (relación v/v solución del precursor-extracto alta), aumenta la concentración de la solución coloidal, pero se producen partículas de mayor tamaño (Farhadi et al., 2017; Kim et al., 2016; Sumi Maria, Devadiga, Shetty Kodialbail, & Saidutta, 2015). Ahora bien aumentar la proporción presente del extracto (relación v/v solución del precursor-extracto) tiene el efecto de aumentar la concentración de la solución coloidal pero se pueden generar efectos opuestos en lo que respecta al tamaño de partícula: aumento del tamaño de partícula (Kim et al., 2016) o su reducción (Farhadi et al., 2017). La obtención de la mejor síntesis con una relación v/v solución del precursor-extracto intermedia puede estar relacionada al aumento de la concentración de la solución coloidal generado al trabajar en los puntos bajos y altos para

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

esta variable de entrada, factor que aumentaría el tamaño de partícula y conllevaría a una afectación de la estabilidad de la solución coloidal y de su actividad biocida.

La adicción del Tween 80, fue de gran relevancia para la actividad biocida de la solución coloidal, ya que el factor lineal (%T) y el cuadrático (%T*%T) afectan de manera significativa el RL (parámetro de actividad biocida), esto se puede deber a que este tipo de agentes se adicionan con el propósito de controlar el tamaño de partícula (Biçer & Şişman, 2010), aspecto de gran importancia para la actividad biocida. Finalmente, la solución coloidal obtenida fue sometida DLS para determinación del tamaño de partícula (ver **Figura 3**) y el resto fue secada en un deshidratador por 6 horas a 130 °C generando un semisólido de color amarillo claro, que fue sometido a FTIR.

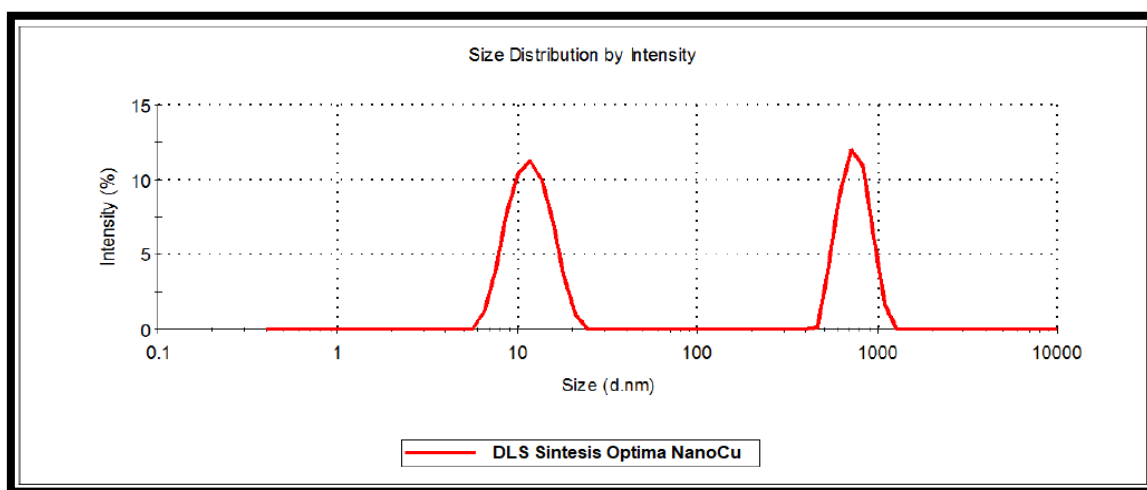


Figura 5. Distribución de tamaño de partícula para la mejor síntesis

Se pueden observar en la **Figura 5**, 2 tamaños de partícula: uno cercano a los 12 nm y el otro en los 755 nm, de los cuales 56.2 % están ubicados en 11.97 ± 3.197 nm, verificando la generación de NPs en solución coloidal.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

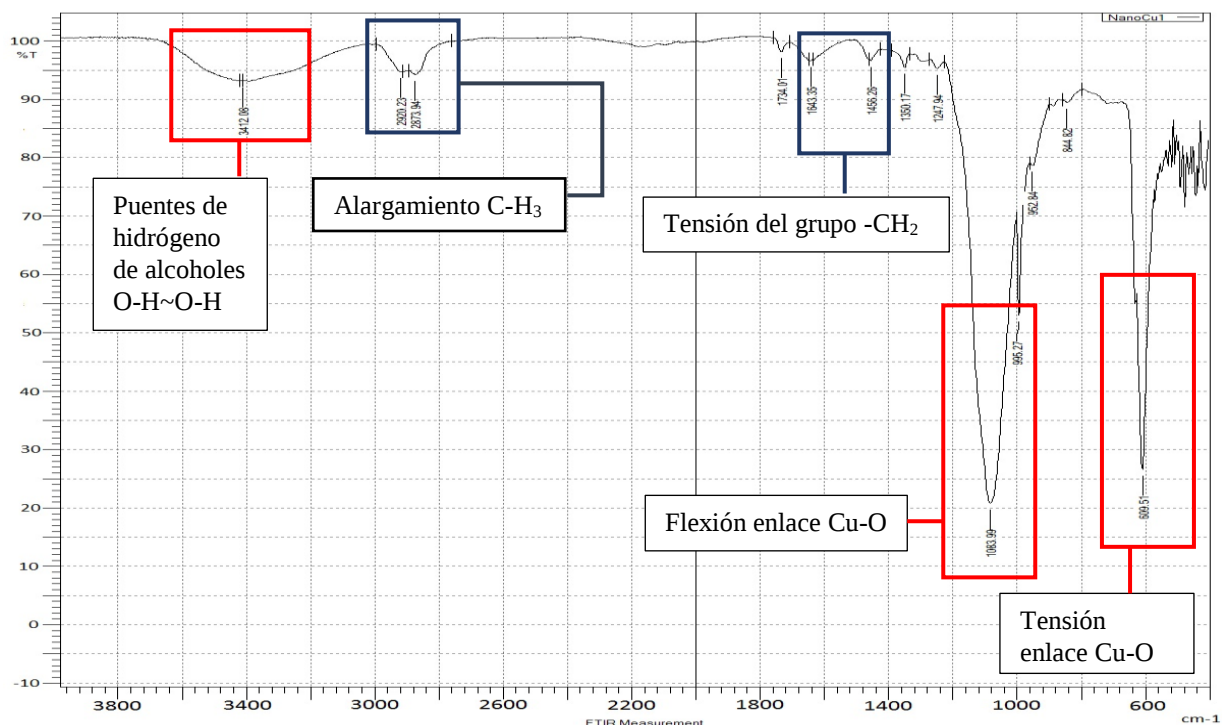


Figura 6. Gráfica de FTIR para la síntesis óptima con los respectivos picos

Además, el análisis por FTIR de la muestra semisólida (**Figura 6**) arrojó la presencia de óxidos de cobre, debido a la presencia de bandas entre 550 y 1083 cm^{-1} (Raul *et al.*, 2014), y la presencia de alcoholes secundarios y polifenoles por la presencia de bandas cercanas a 1375 cm^{-1} (Nasrollahzadeh, Sajadi, Rostami-Vartooni, & Hussin, 2016); por lo tanto, se puede afirmar que la muestra contiene importante cantidad de óxidos de cobre (CuO y Cu₂O) y de compuestos orgánicos (polialcoholes y polifenoles) que pueden ayudar a estabilizar las NPs en la solución coloidal (Harne *et al.*, 2012).

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

4. Conclusiones

- ✓ Se optó por trabajar en un medio acuoso para la síntesis de nanopartículas de cobre ya que, aunque en este medio se presentó menor estabilidad de la solución coloidal, se obtuvo la mejor conversión del precursor y actividad biocida. Se verificó la influencia de las variables en el proceso de síntesis haciendo uso de un modelo de azúcar reductor (glucosa) y del extracto de hoja de guayaba; evidenciando la importancia de trabajar en un medio alcalino, debido a que se aumenta la conversión de la sal precursora. Además, la revisión bibliográfica permitió identificar que otras variables como la temperatura, relación v/v solución de precursor-extracto, y concentración del tensoactivo influían en la síntesis.
- ✓ Se evaluó la influencia de la temperatura, pH, relación v/v solución de precursor-extracto y concentración %v/v del tensoactivo (entre 30 y 80°C, 8 y 12, 1 y 9, y 1 y 5, respectivamente) en el proceso de síntesis de NPs, donde se determinaron las mejores condiciones de reacción: temperatura de 59.3°C, pH de 9.86, relación entre reactivos igual a 5.45, y concentración de tensoactivo de aproximadamente 2.89, que generaron una conversión cercana al 100%, 7.59 g de macropartículas, y un RL igual a 15.2.
- ✓ Las caracterizaciones por DLS para la síntesis con las mejores condiciones de reacción verificaron la presencia de NPs mostrando un tamaño característico de 12 nm, además el análisis por FTIR corroboró la presencia de óxidos de cobre y polifenoles, estos últimos pueden actuar como coadyuvantes en la estabilización de los óxidos en solución.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

5. Recomendaciones

- ✓ Con el fin de conocer el mecanismo de reducción para la síntesis con el extracto de hoja de guayaba, se recomienda un análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) para determinar todos los componentes presentes en el extracto de hoja de guayaba y así identificar cuales favorecen la reducción de las sales metálicas.
- ✓ Con el fin de comprender el mecanismo de inhibición de las NPs en las BSR se recomiendan análisis adicionales.
- ✓ Ya que se generó un agente biocida no convencional a base de una solución coloidal de nanopartículas a base de cobre usando una metodología verde que aprovechaba el extracto de hoja de guayaba, se recomienda un posterior proceso de escalamiento que permita analizar la viabilidad de la aplicación de esta investigación en la industria.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Referencias bibliográficas

- Almeida, P. F. (2014). Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters, (May).
- ASTM International (s.f.). Designation: E2315 – 16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. Obtenido de <https://goo.gl/XdMkqs>
- Azanza JR, Sádaba B, Mediavilla A, Flórez J. 2003. Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. Antisépticos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, ed. Farmacología Humana, 4ta edición. Masson. Barcelona. pp:1169-86
- Biçer, M., & Şişman, I. (2010). Controlled synthesis of copper nano/microstructures using ascorbic acid in aqueous CTAB solution. *Powder Technology*, 198(2), 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2009.11.022>
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)*, 13, 1–45.
- CADENA DE GUAYABA Indicadores e Instrumentos. (2016, 4 octubre). Recuperado 16 enero, 2019, de <https://goo.gl/RKXz61>
- Camacho-Flores, B. A., Martínez-Álvarez, O., Arenas-Arrocena, M. C., García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., De La Fuente-Hernández, J., & Acosta-Torres, L. S. (2015). Copper: synthesis techniques in nanoscale and powerful application as an antimicrobial agent. *Journal of Nanomaterials*, 16(1), 423.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

- Carey, F. A. (2002). *Química Orgánica*, 6 a edición, México D.F., México: McGraw Hill
- Das, R., Gang, S., Nath, S. S., & Bhattacharjee, R. (2010). Linoleic acid capped copper nanoparticles for antibacterial activity. *Journal of Bionanoscience*, 4(1-2), 82-86.
- Deryabin, D. G., Aleshina, E. S., Vasilchenko, A. S., Deryabina, T. D., Efremova, L. V., Karimov, I. F., & Korolevskaya, L. B. (2013). Investigation of copper nanoparticles antibacterial mechanisms tested by luminescent Escherichia coli strains. *Nanotechnologies in Russia*, 8(5–6), 402–408. <https://doi.org/10.1134/S1995078013030063>
- Dubey, M., Bhadauria, S., & Kushwah, B. S. (2009). Green Synthesis of Nanosilver Particles From Extract of Eucalyptus Hybrid (Safeda) Leaf. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(3), 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2006.01.006>
- Duque, Zoilabet. (2007). Una revisión de la corrosión por sulfuro biogénico en la industria petrolera. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 30(Especial), 146-156. Recuperado en 09 de febrero de 2019, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025407702007000400018&lng=es&tlng=es.
- Farhadi, S., Ajerloo, B., & Mohammadi, A. (2017). Green Biosynthesis of Spherical Silver Nanoparticles by Using Date Palm (Phoenix Dactylifera) Fruit Extract and Study of Their Antibacterial and Catalytic Activities. *Acta Chimica Slovenica*, 129–143. <https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2956>

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

- Fathima, J. B., Pugazhendhi, A., Oves, M., & Venis, R. (2018). Synthesis of eco-friendly copper nanoparticles for augmentation of catalytic degradation of organic dyes. *Journal of Molecular Liquids*, 260, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.033>
- Garnica, H. A. (2011). Tecnología del plasma aplicada a problemáticas en el sector hidrocarburos en colombia, 8(c), 37–41.
- Guo, M., Li, W., Yang, F., & Liu, H. (2015). Controllable biosynthesis of gold nanoparticles from a *Eucommia ulmoides* bark aqueous extract. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 142, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.01.109>
- Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.025>
- Harne, S., Sharma, A., Dhaygude, M., Joglekar, S., Kodam, K., & Hudlikar, M. (2012). Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.005>
- Hu, S., & Hsieh, Y. Lo. (2016). Silver nanoparticle synthesis using lignin as reducing and capping agents: A kinetic and mechanistic study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.066>

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ... Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10).
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>
- Iravani, S., Korbekandi, H., & Zolfaghari, B. (2016). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods Synthesis of silver NPs, 9(6), 1–17.
<https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>
- Iravani, S., & Zolfaghari, B. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Pinus eldarica* Bark Extract. *Biomed Research International*, 2013, 5. <https://doi.org/10.1155/2013/639725>
- Jain, S., Jain, A., Kachhawah, P., & Devra, V. (2015). Synthesis and size control of copper nanoparticles and their catalytic application. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 25(12), 3995–4000. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(15\)64048-1](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(15)64048-1)
- Karimi, J., & Mohsenzadeh, S. (2015). Rapid, green, and eco-friendly biosynthesis of copper nanoparticles using flower extract of *Aloe vera*. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 45(6), 895–898.
<https://doi.org/10.1080/15533174.2013.862644>
- Kim, D. Y., Saratale, R. G., Shinde, S., Syed, A., Ameen, F., & Ghodake, G. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Laminaria japonica* extract: Characterization and seedling growth assessment. *Journal of Cleaner Production*, 172, 2910–2918.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.123>

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

- Mahadevan, S., Vijayakumar, S., & Arulmozhi, P. (2017). Green synthesis of silver nano particles from *Atalantia monophylla* (L) Correa leaf extract, their antimicrobial activity and sensing capability of H₂O₂. *Microbial Pathogenesis*, 113(October), 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.029>
- Microbial Control A part of DuPont Industrial Biosciences. (2012, 23 mayo). Recuperado 27 diciembre, 2018, de <https://goo.gl/deo8cT>
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extract *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Nagaonkar, D., Shende, S., & Rai, M. (2015). Biosynthesis of copper nanoparticles and its effect on actively dividing cells of mitosis in *Allium cepa*. *Biotechnology Progress*, 31(2), 557–565. <https://doi.org/10.1002/btpr.2040>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Rostami-Vartooni, A., & Hussin, S. M. (2016). Green synthesis of CuO nanoparticles using aqueous extract of *Thymus vulgaris* L. leaves and their catalytic performance for N-arylation of indoles and amines. *Journal of Colloid and Interface Science*, 466, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.018>
- Passman, F. J. (2003). *Fuel and Fuel System Fundamentals, Diagnosis , and Contamination Control*.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

- Patil, M. P., & Kim, G. Do. (2018). Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172(July), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.007>
- Quirino Barreda, C. T. (2013). FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS EFFECT OF THE, (febrero, 2016).
- Raul, P. K., Senapati, S., Sahoo, A. K., Umlong, I. M., Devi, R. R., Thakur, A. J., & Veer, V. (2014). CuO nanorods: A potential and efficient adsorbent in water purification. *RSC Advances*, 4(76), 40580–40587. <https://doi.org/10.1039/c4ra04619f>
- Rengifo, J., (2016). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre por el proceso poliol asistido vía microondas* (tesis de pregrado). Universidad Nacional mayor de San Marcos, Lima, Perú
- Shende, S., Ingle, A. P., Gade, A., & Rai, M. (2015). Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus medica Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 865–873. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1840-3>
- Sierra Triana, D. and Parra Moreno, J. (2018). Extracción de Azúcares Reductores de Azadirachta Indica (Nim) y Psidium Guajava (Guayaba), y Determinación de la Cinética de Extracción. (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas Escuela de Ingeniería Química. Bucaramanga, Santander Colombia.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

- Skoog, Holler, & Nieman. (2001) *Principios de análisis instrumental*, 5° edición.; México D.F., México: Ed McGraw-Hill, págs. 353-367
- Sumi Maria, B., Devadiga, A., Shetty Kodialbail, V., & Saidutta, M. B. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using medicinal *Zizyphus xylopyrus* bark extract. *Applied Nanoscience*, 5(6), 755–762. <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0372-8>
- Thanh, N. T. K., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114(15), 7610–7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>
- Velmurugan, P., Anbalagan, K., Manosathyadevan, M., Lee, K. J., Cho, M., Lee, S. M., ... Oh, B. T. (2014). Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Zingiber officinale* root extract and antibacterial activity of silver nanoparticles against food pathogens. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(10), 1935–1943. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1169-6>
- Verma, A., & Mehata, M. S. (2016). Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.001>
- Wang, L., Wu, Y., Xie, J., Wu, S., & Wu, Z. (2018). Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. *Materials Science and Engineering C*, 86(February), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.003>

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndices

Apéndice A. Mecanismo de reacción para la síntesis de nanopartículas mediante el uso de extractos vegetales

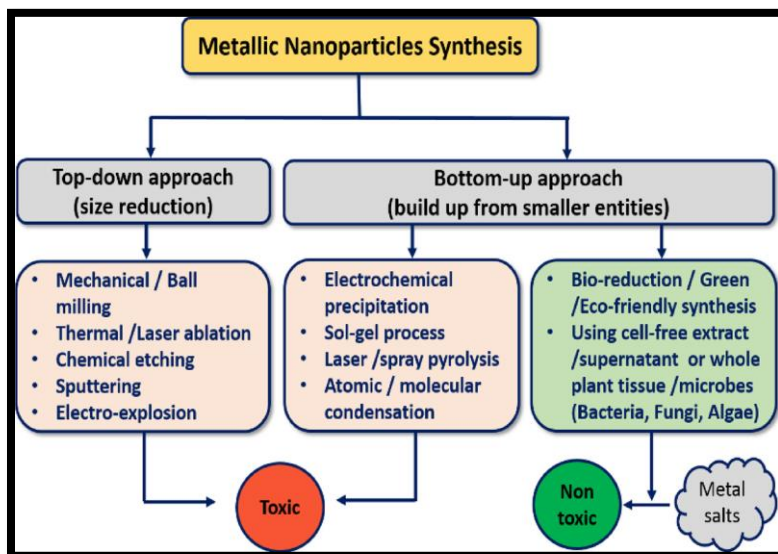


Figura A1: Metodologías para la síntesis de nanopartículas (Patil & Kim, 2018)

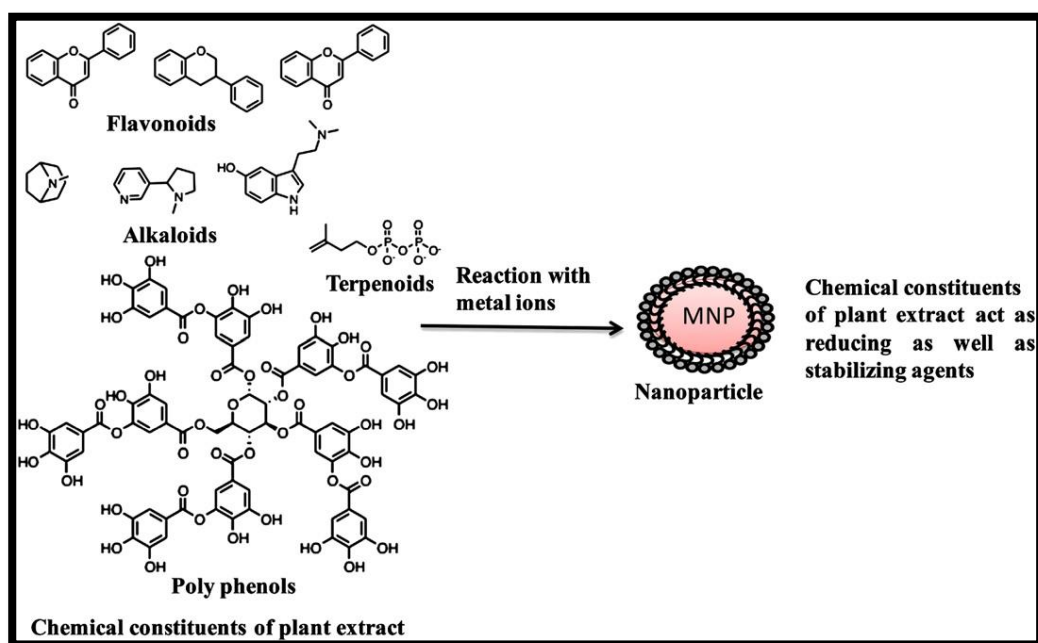


Figura A2. Mecanismo de reacción general síntesis de nanopartículas (Dubey, Bhadauria, & Kushwah, 2009; Huang et al., 2007).

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice B. Curvas de calibración

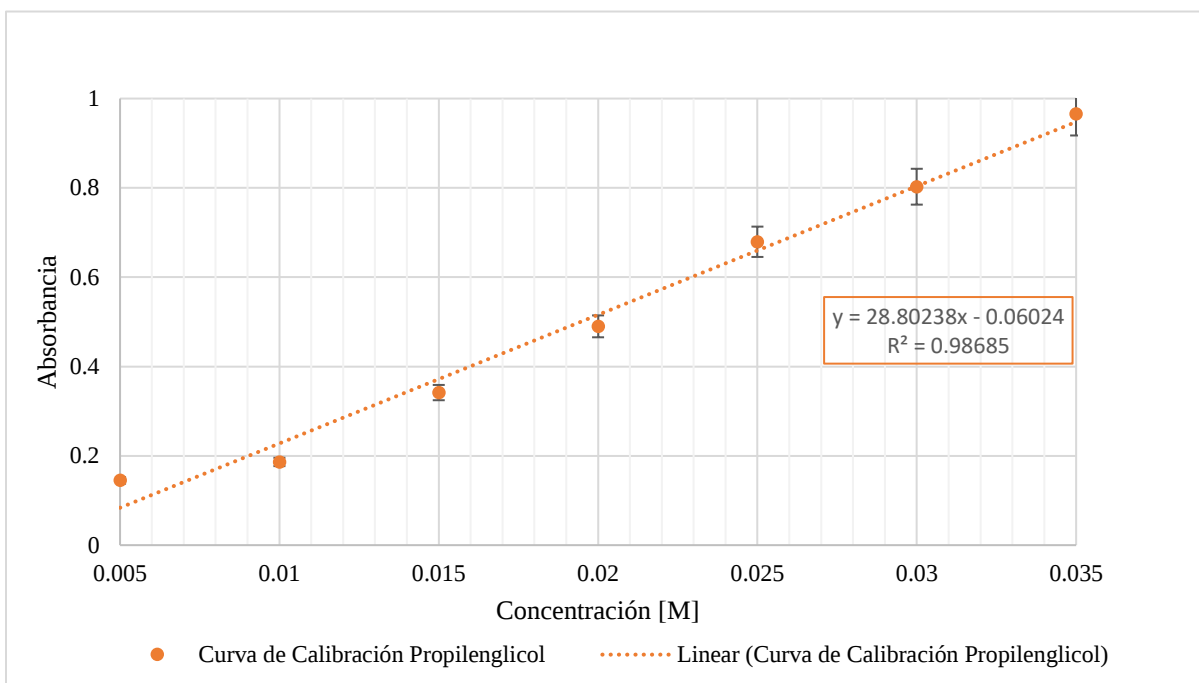


Figura B1. Curva de calibración usando propilenglicol como medio de reacción

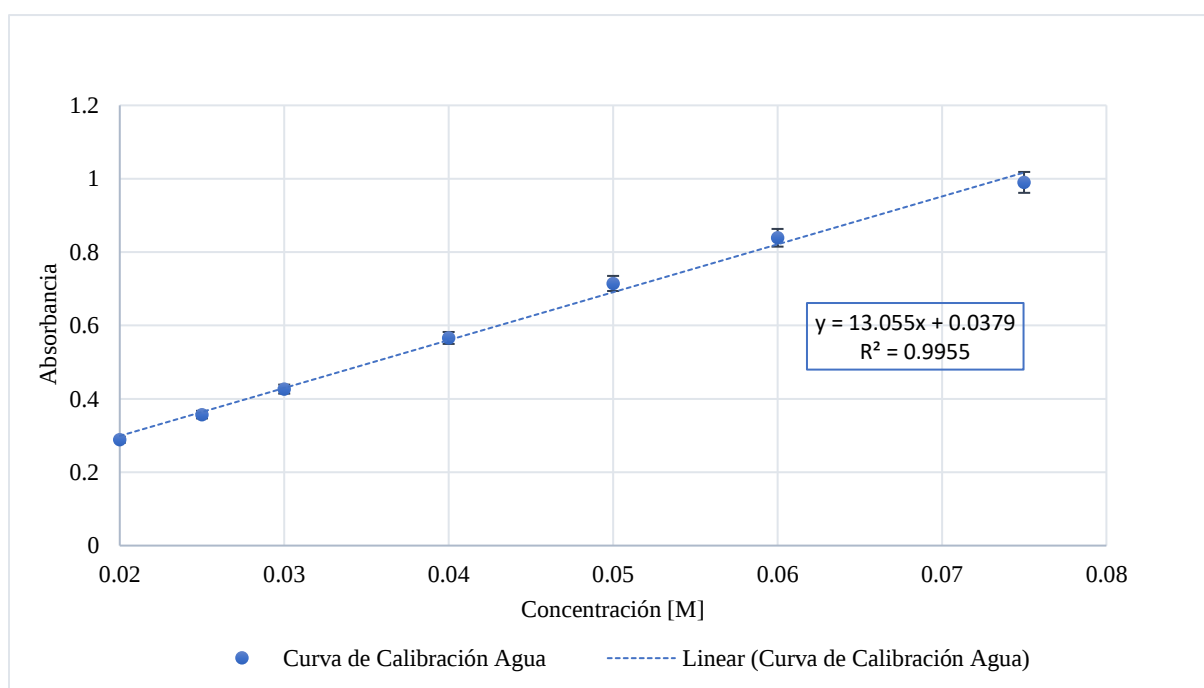


Figura B2. Curva de calibración usando agua como medio de reacción

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

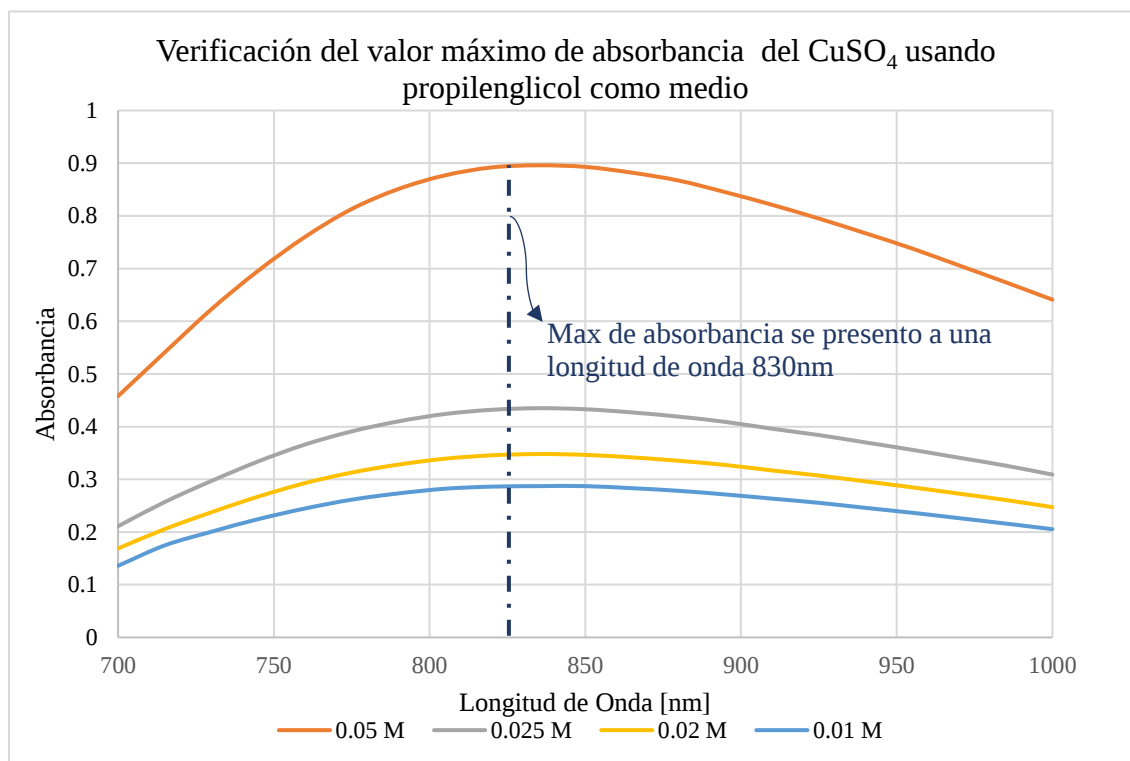
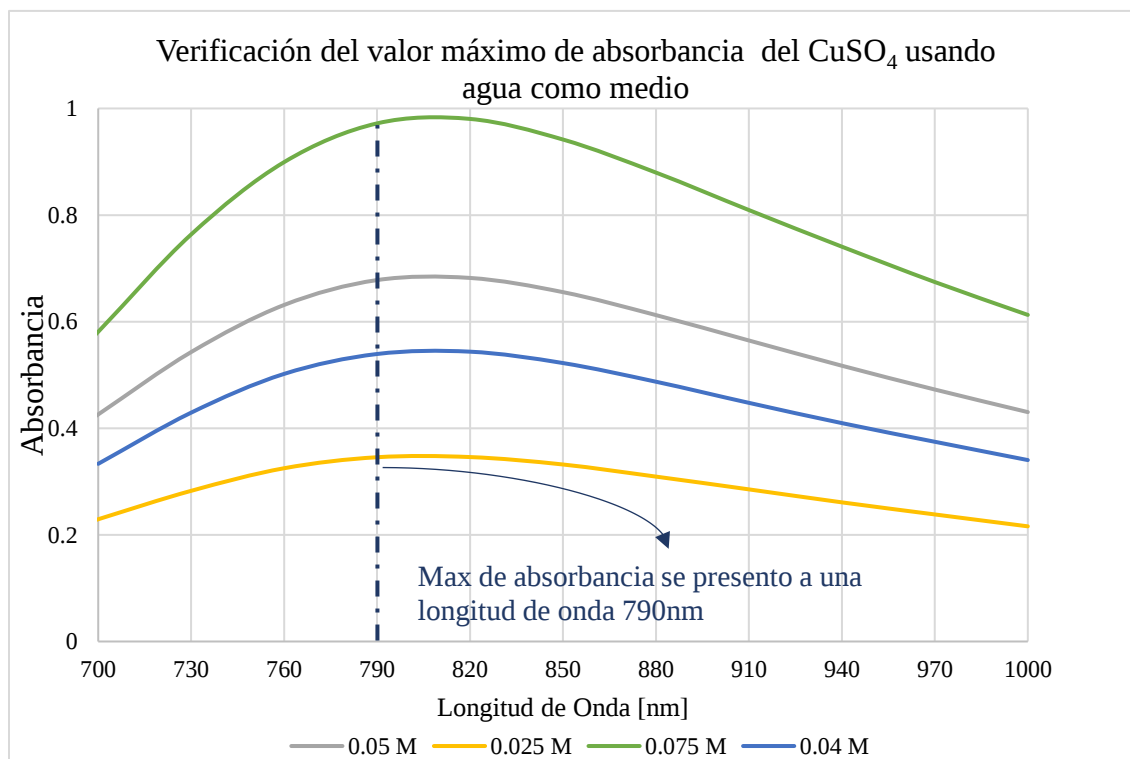


Figura B3. Verificación del valor máximo de absorbancia del CuSO_4 usando propilenglicol como medio



SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

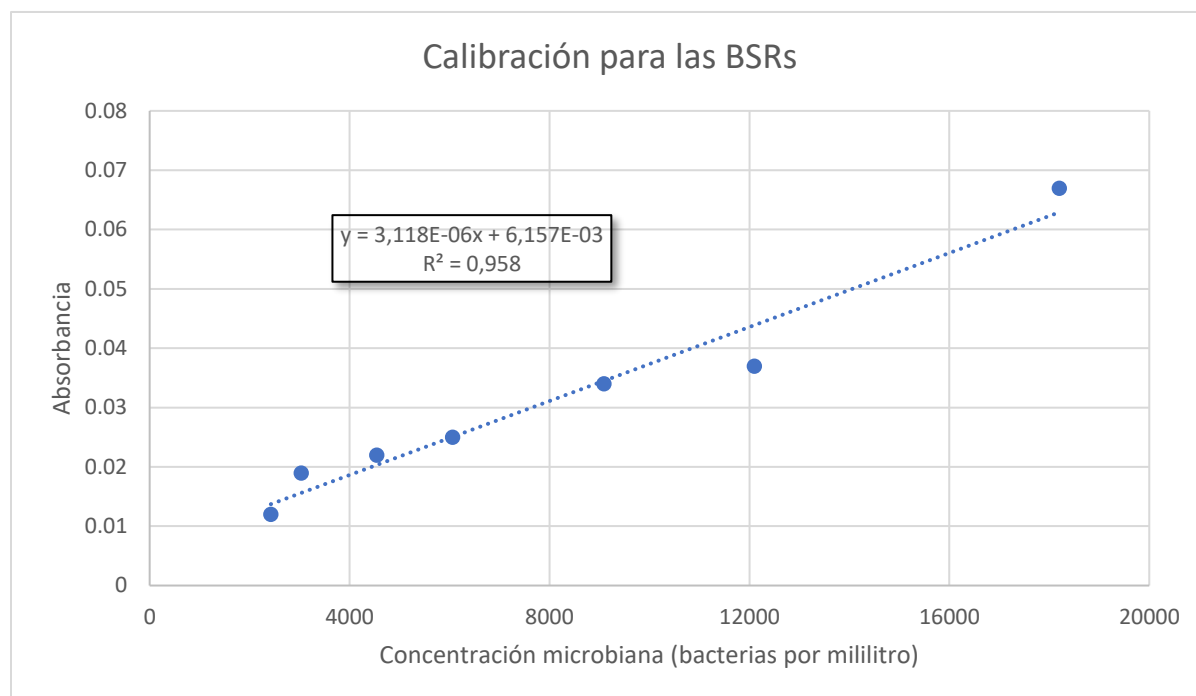


Figura B5. Curva de calibración para las BSRs

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice C. Determinación de la actividad biocida

Sodium lactate ($C_3H_5NaO_3$)	3.5	g
Ammonium chloride (NH_4Cl)	1.0	g
Dipotassium, hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	0.5	g
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.0	g
Sodium sulfate (Na_2SO_4)	0.5	g
Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.1	g
Thioglycolic acid	0.1	g
Ammonium ferrous sulfate or ferrous ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$)	0.001	g
Water (H_2O)	1	L

Figura C1. Componentes del medio Starkey modificado (Passman, 2003)

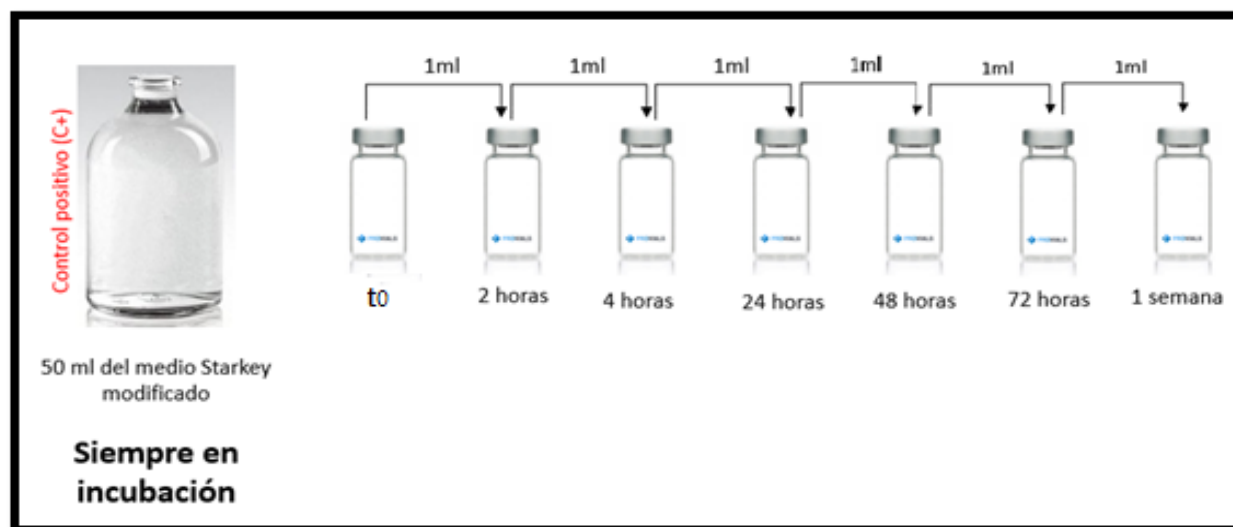


Figura C2. Metodología para la neutralización

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice D. Distribución de tamaño de partícula

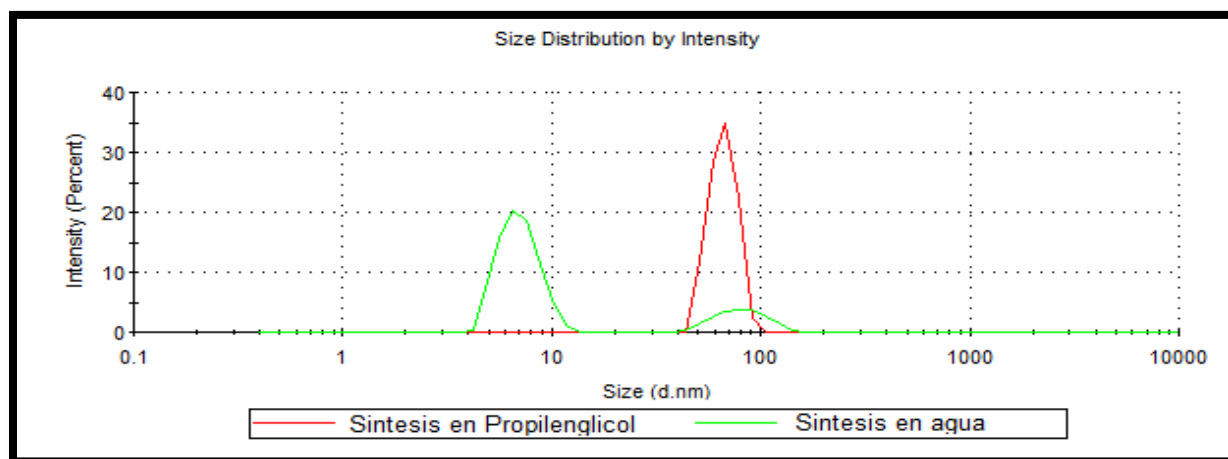


Figura D1. Distribución de tamaño de partícula para síntesis con propilenglicol y agua usando ácido ascórbico como reductor para definir el medio de síntesis.

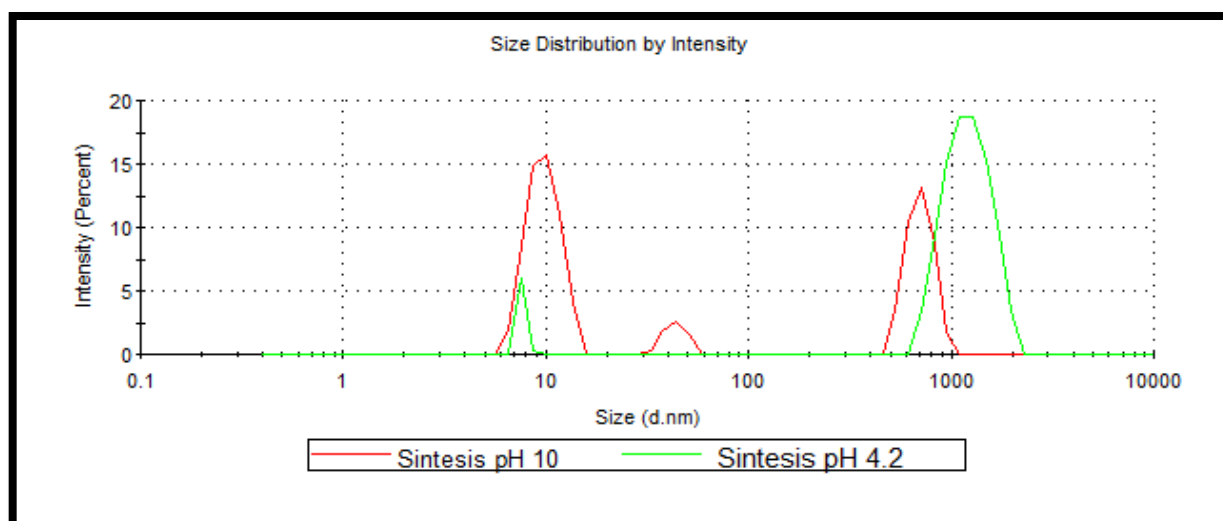


Figura D2. Distribución de tamaño de partícula síntesis con extracto de hoja de guayaba

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice E. Estabilidad de la solución coloidal para síntesis química

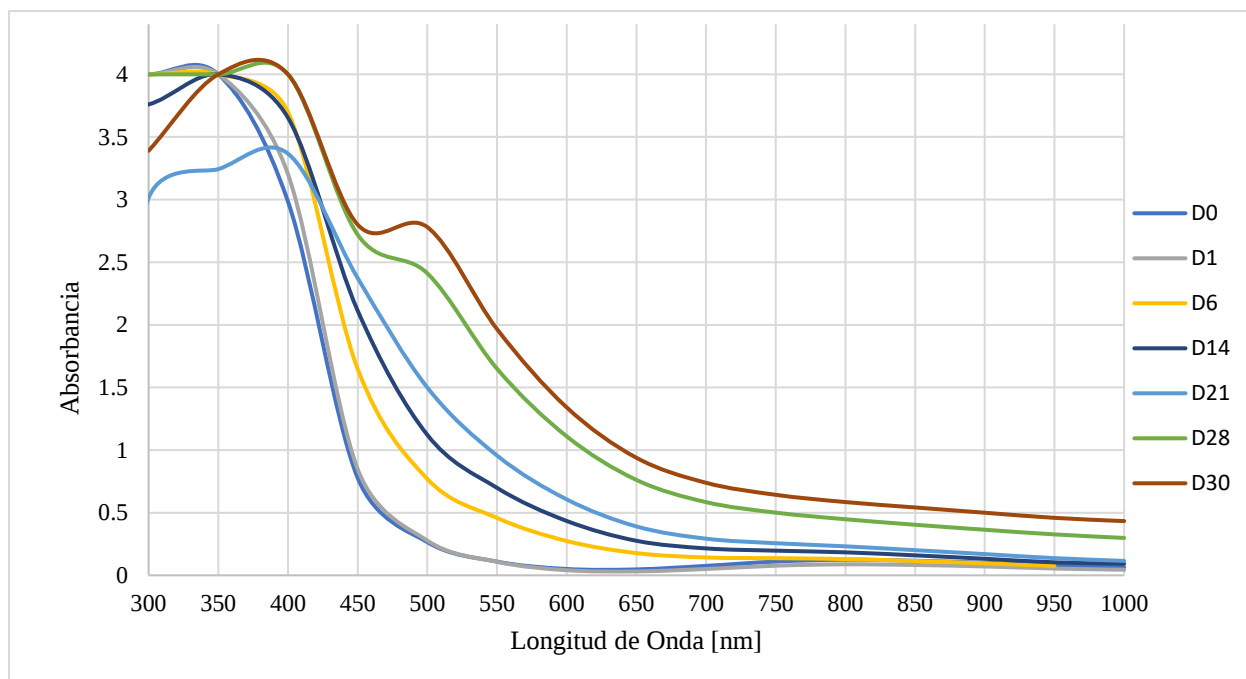


Figura E1. Estabilidad de la síntesis química usando ácido ascórbico en agua

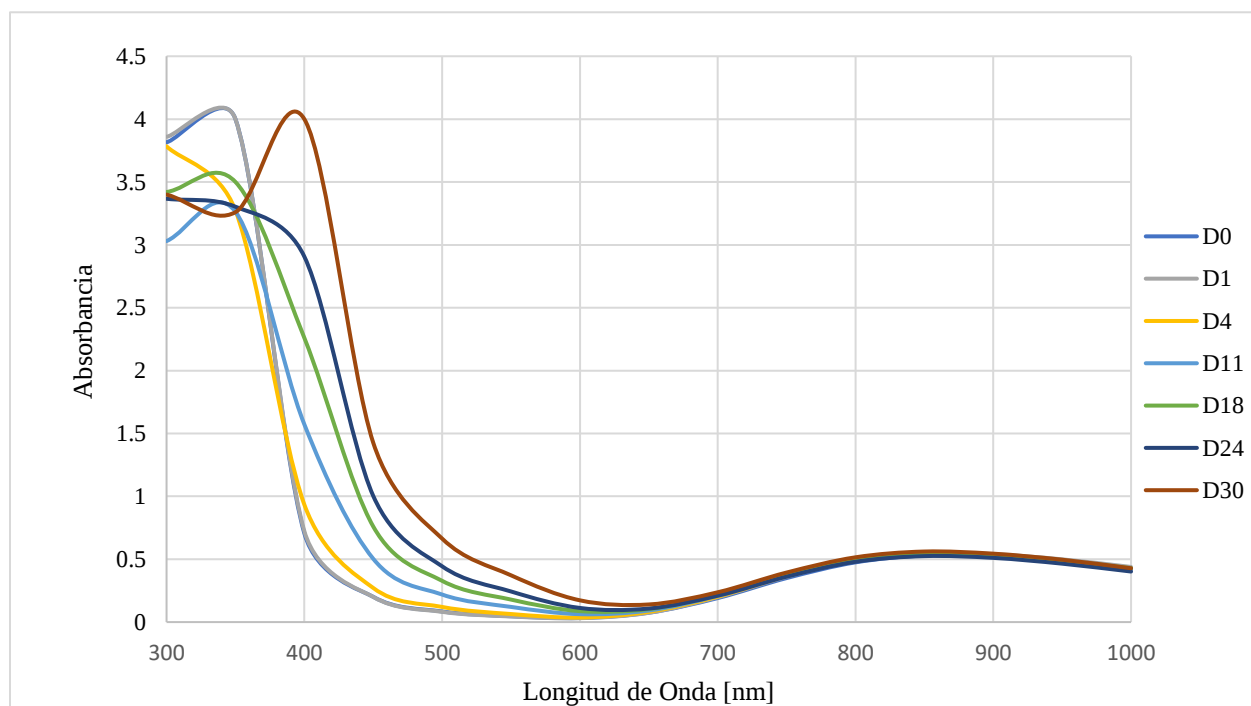


Figura E2. Estabilidad de la síntesis química usando ácido ascórbico en propilenglicol

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice F. Gráficas de contorno

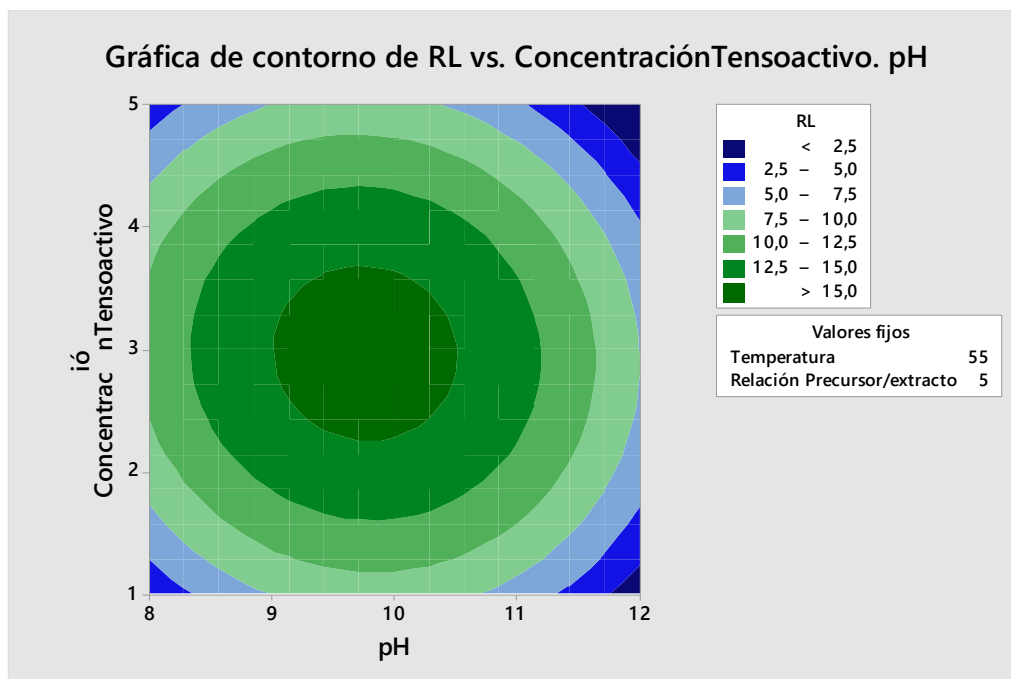


Figura F1. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); concentración de tensoactivo vs pH manteniendo temperatura y relación constantes

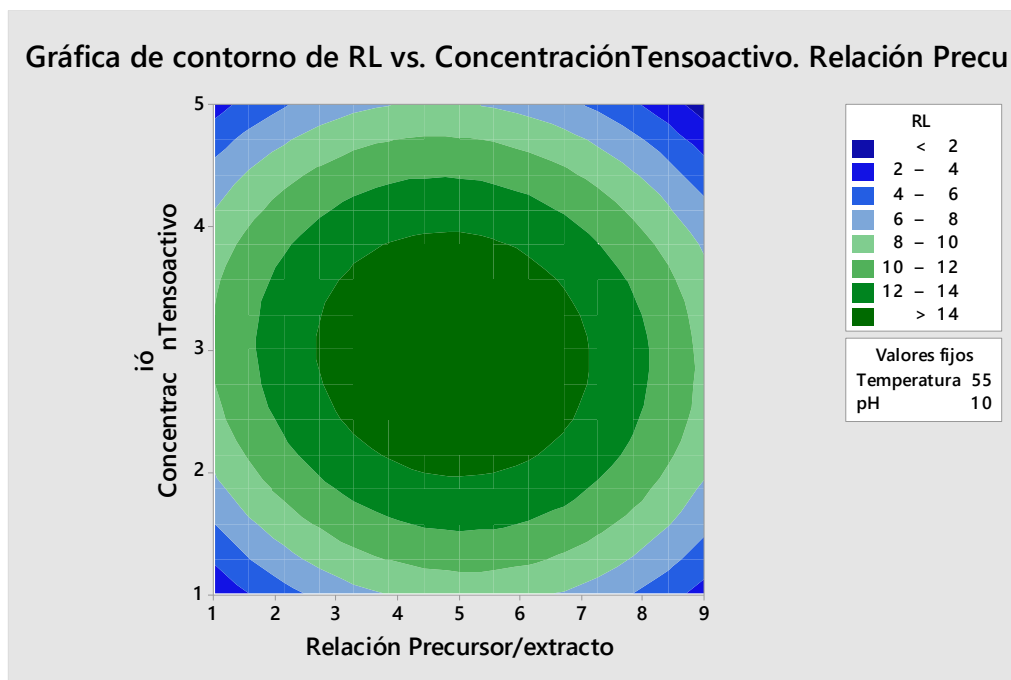


Figura F2. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); concentración de tensoactivo vs Relación precursor-extracto manteniendo temperatura y pH constantes

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

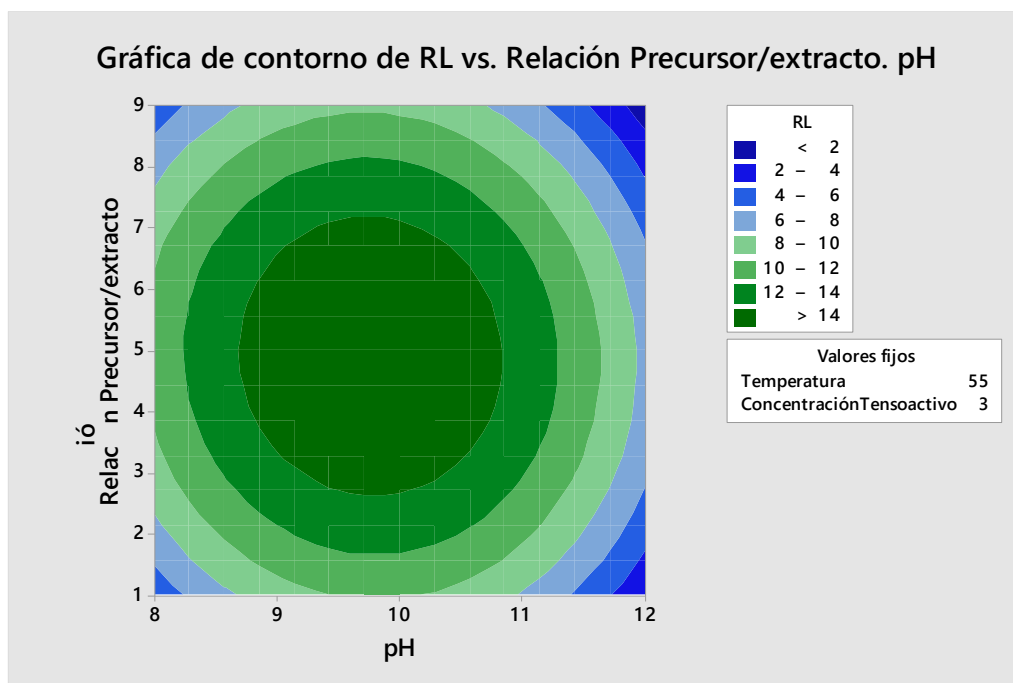


Figura F3. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); Relación precursor-extracto vs. pH, manteniendo temperatura y concentración de tensioactivo constantes

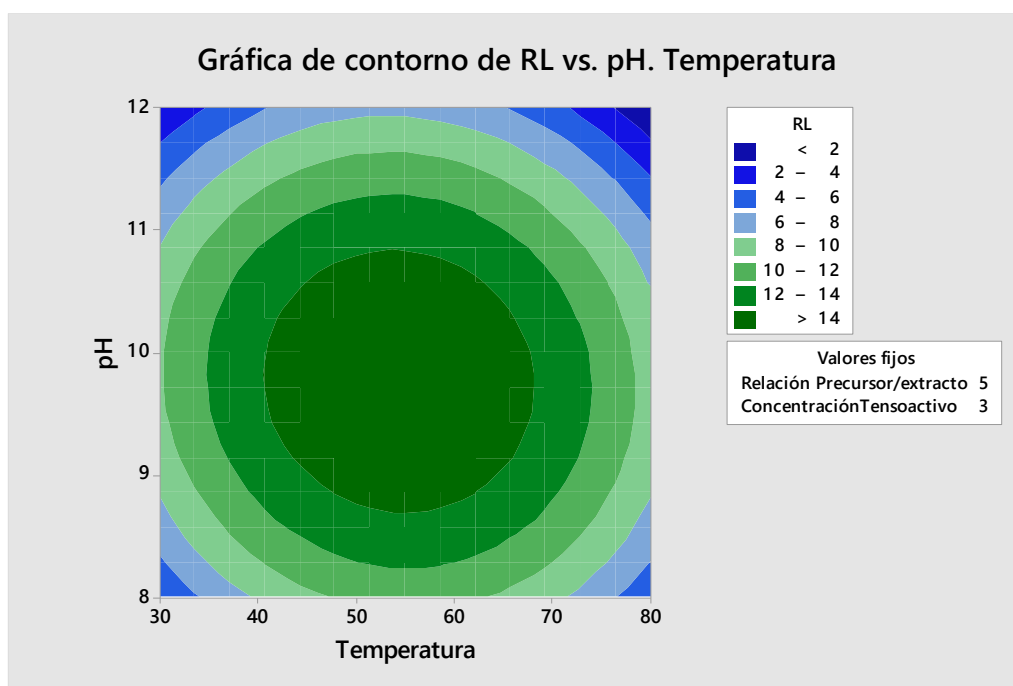


Figura F4. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); pH vs Temperatura, manteniendo relación precursor-extracto y concentración de tensioactivo constantes

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

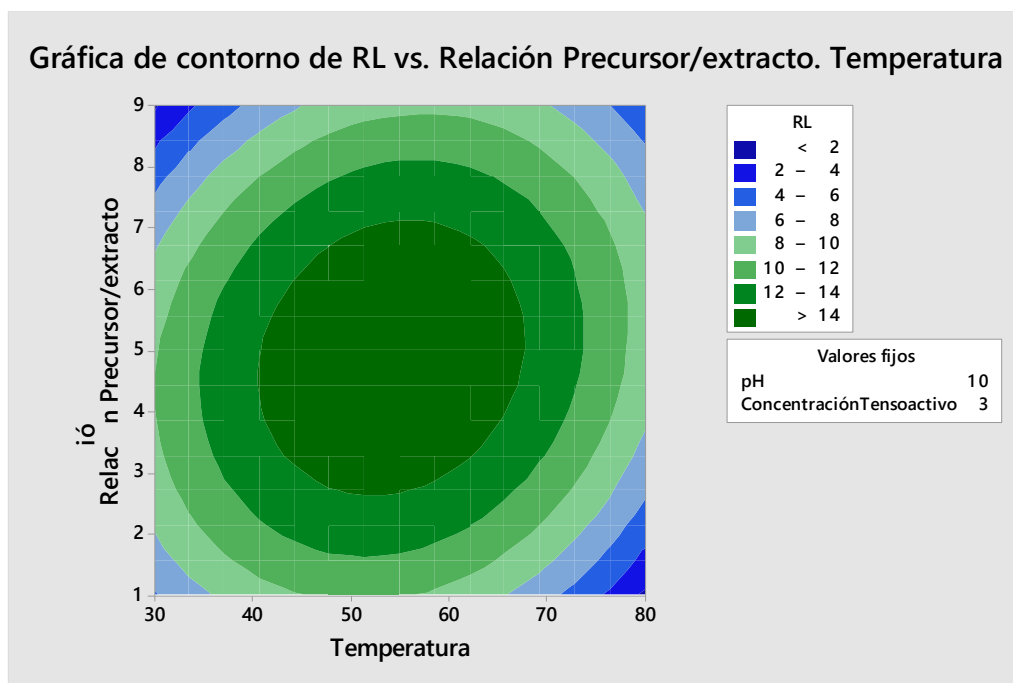


Figura F5. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); Relación precursor-extracto vs Temperatura manteniendo pH y concentración de tensioactivo constantes

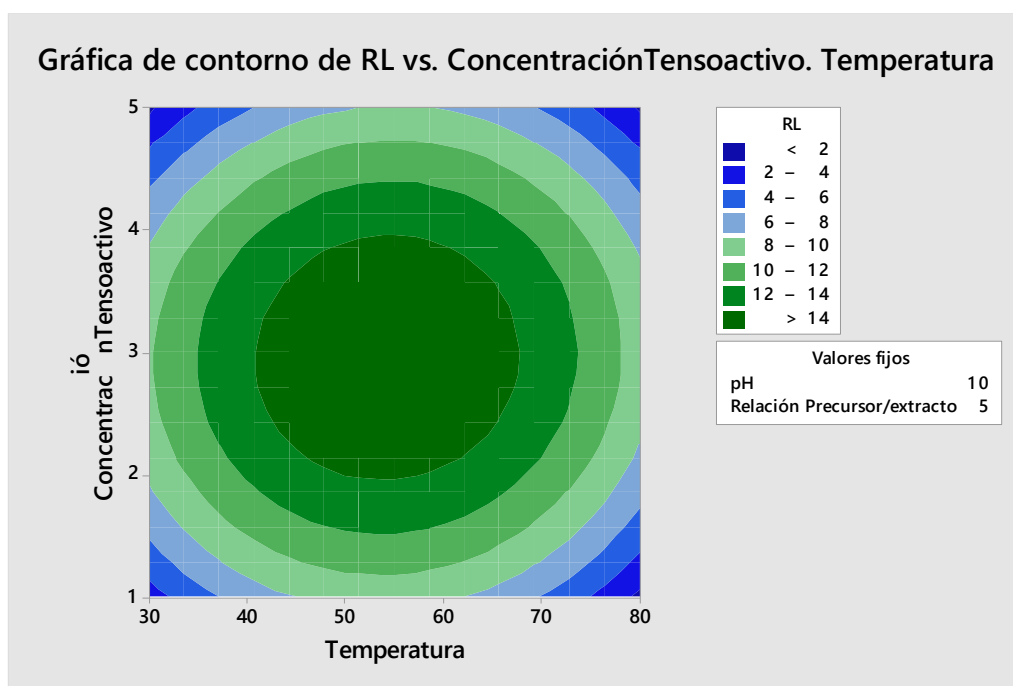


Figura F6. Gráfica de contorno para la actividad biocida (RL); concentración de tensioactivo vs Temperatura manteniendo pH y relación entre reactivos constantes

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

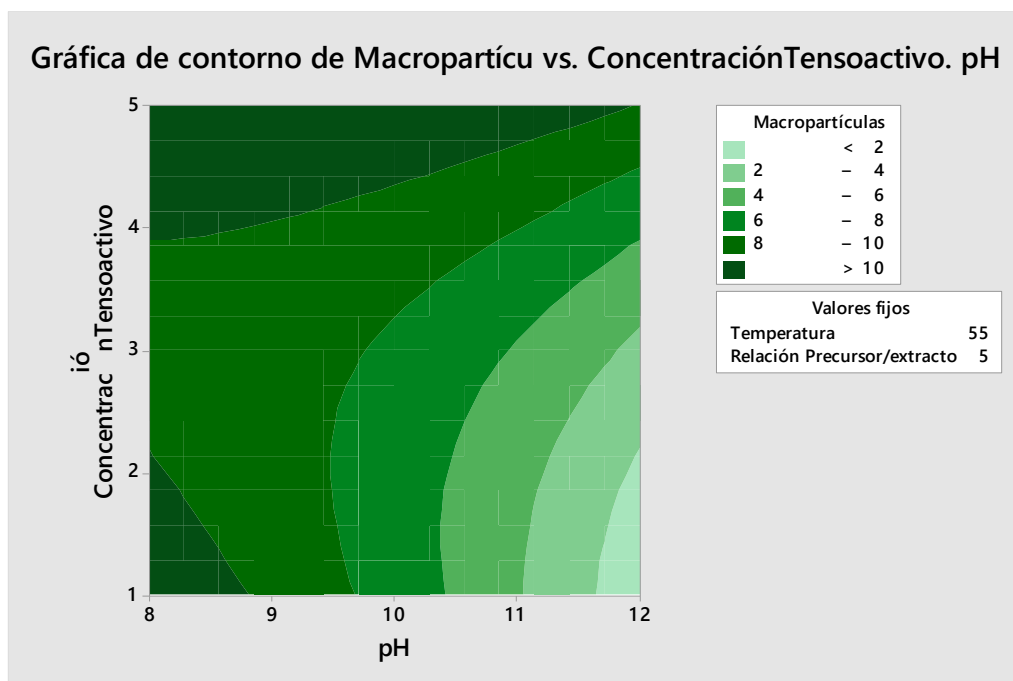


Figura F7. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; concentración de tensioactivo vs pH manteniendo, temperatura y relación precursor-extracto constantes

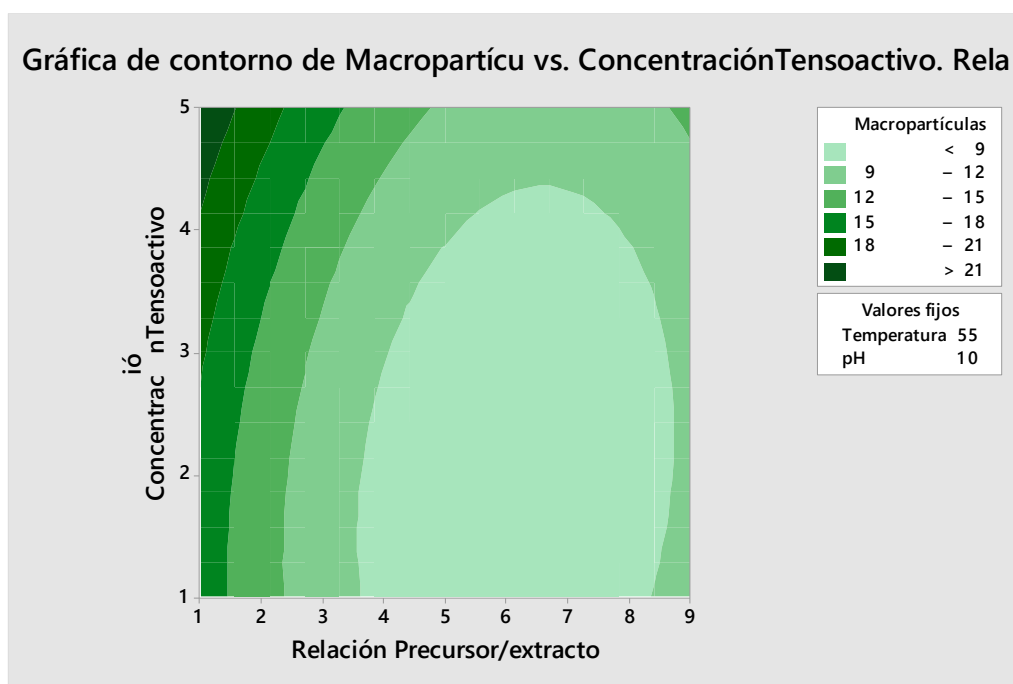


Figura F8. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; concentración de tensioactivo vs Relación precursor-extracto manteniendo temperatura y pH constantes

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

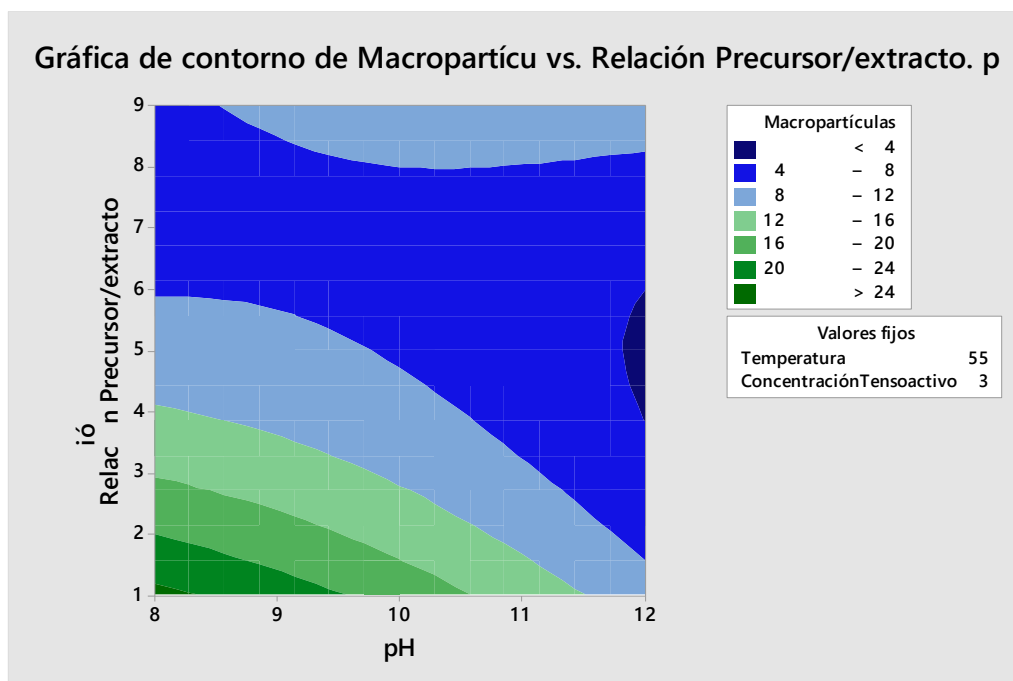


Figura F9. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; Relación precursor-extracto vs pH, manteniendo temperatura y concentración de tensioactivo constantes

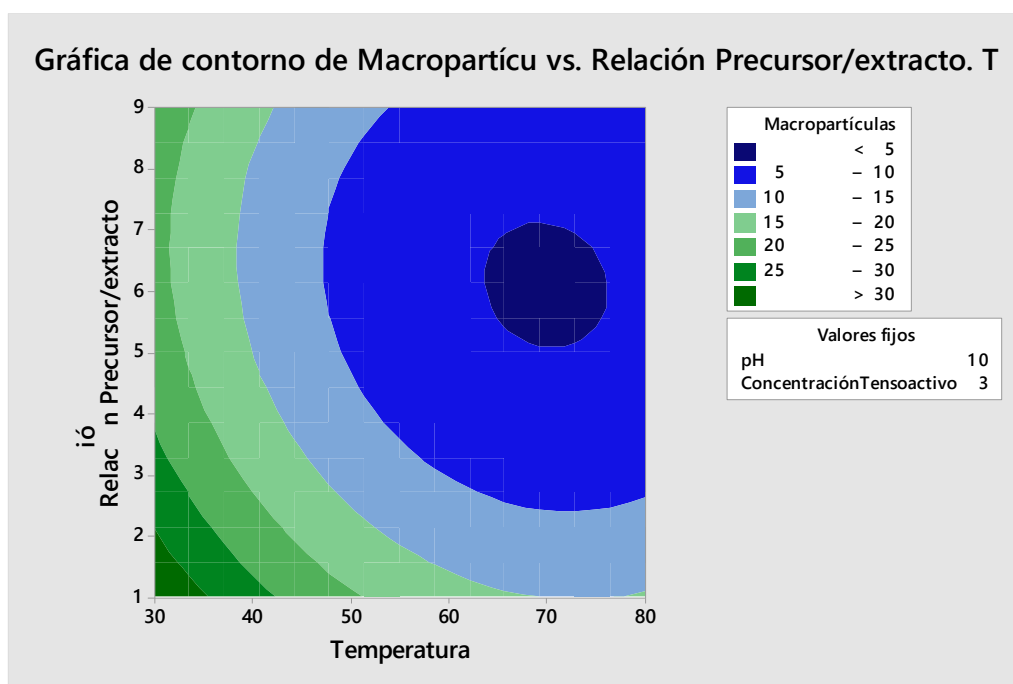


Figura F10. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; Relación precursor-extracto vs temperatura, manteniendo pH y concentración de tensioactivo constantes

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

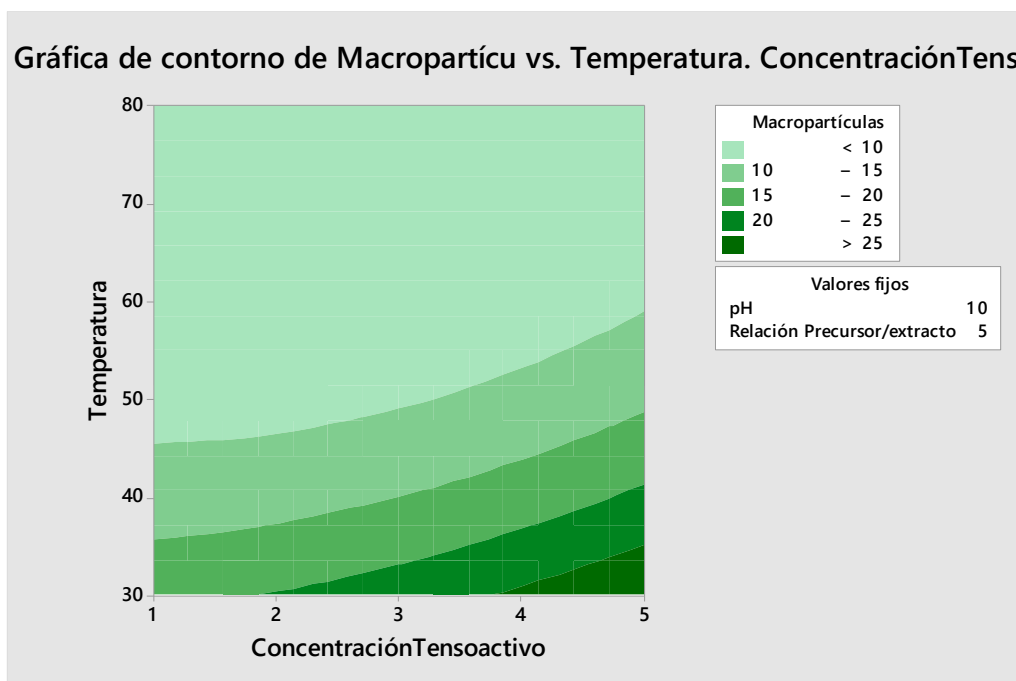


Figura F11. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; concentración de tensactivo vs temperatura manteniendo pH y relación precursor-extracto constantes

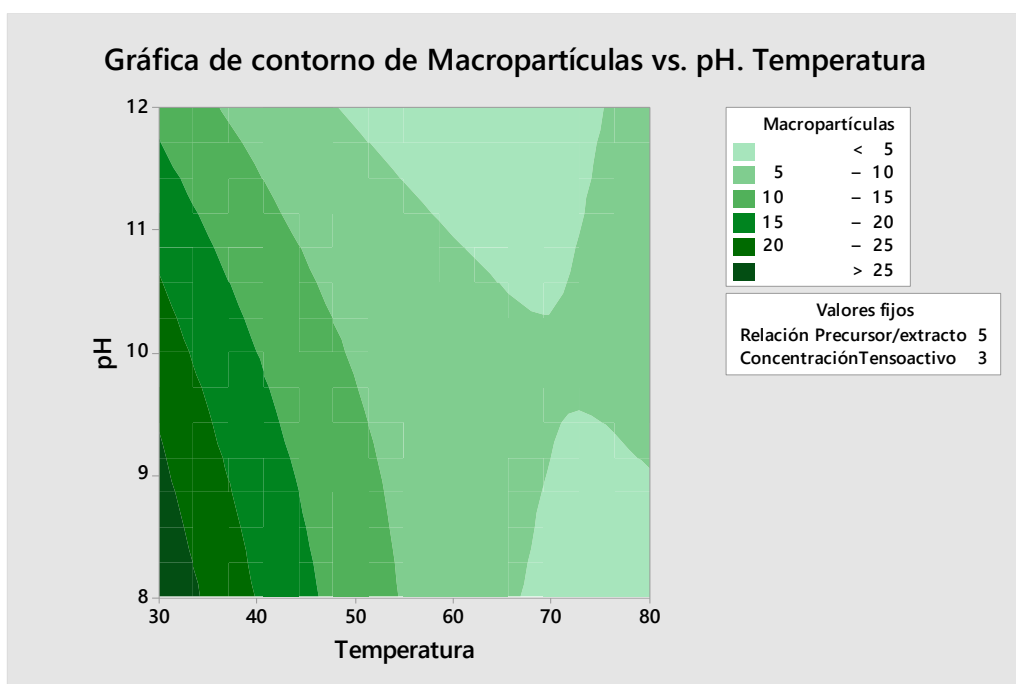


Figura F12. Gráfica de contorno para la cantidad de macropartículas; pH vs Temperatura, manteniendo relación precursor-extracto y concentración de tensactivo constantes

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice G. Obtención de las mejores condiciones

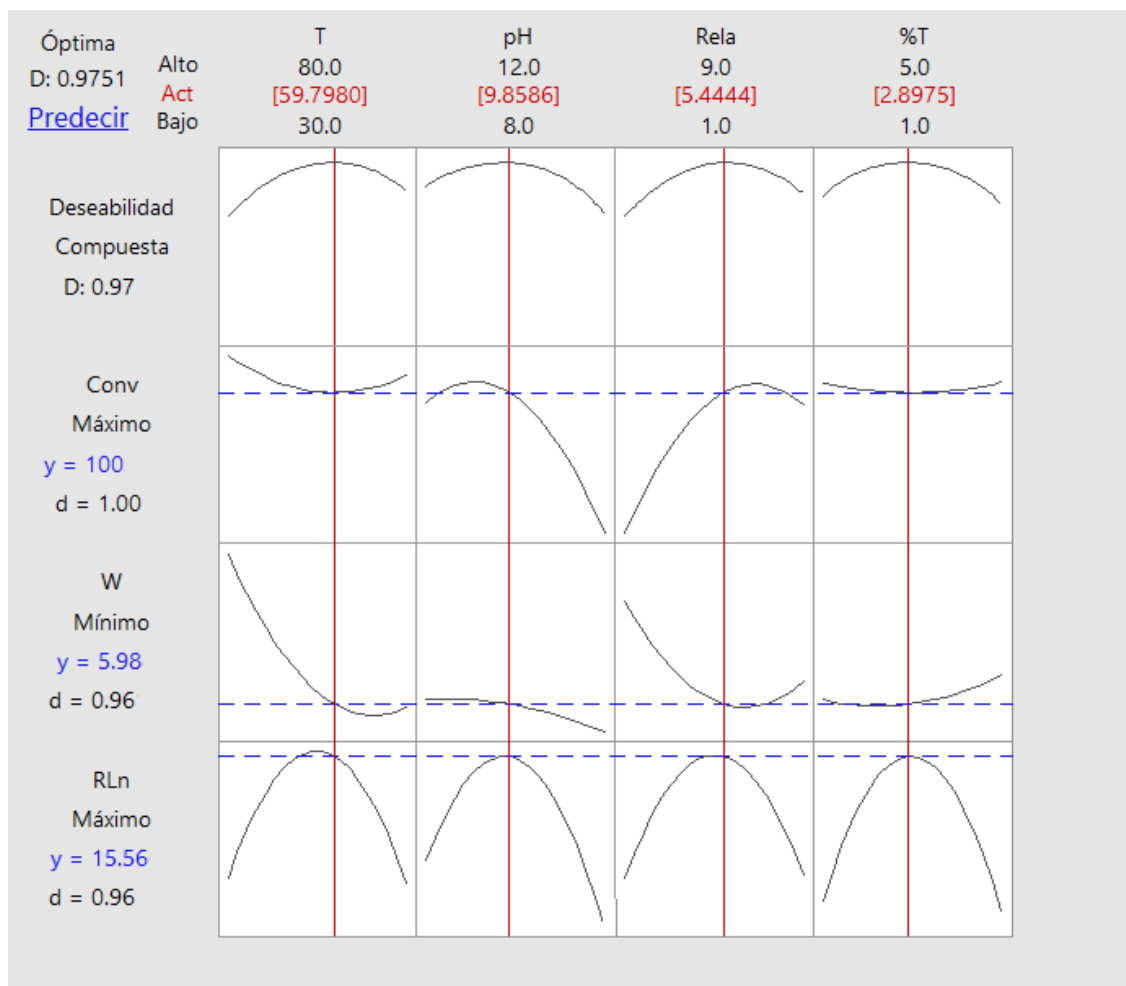


Figura G2. Mejores condiciones de síntesis

Tabla G1. Ecuaciones de segundo orden para las variables de respuesta

$\text{Conv} = 51.8 - 0.620 T + 24.4 \text{ pH} - 13.90 \text{ Rela} - 2.95 \%T + 0.00459 T^*T - 1.947 \text{ pH}^*\text{pH} - 0.482 \text{ Rela}^*\text{Rela} + 0.281 \%T^*\%T - 0.0011 T^*\text{pH} + 0.0174 T^*\text{Rela} - 0.0033 T^*\%T + 1.960 \text{ pH}^*\text{Rela} + 0.126 \text{ pH}^*\%T + 0.041 \text{ Rela}^*\%T$	R-cuad. 70.82%
$W = 151.4 - 2.306 T - 5.94 \text{ pH} - 11.22 \text{ Rela} - 3.16 \%T + 0.01061 T^*T - 0.268 \text{ pH}^*\text{pH} + 0.4010 \text{ Rela}^*\text{Rela} + 0.445 \%T^*\%T + 0.0932 T^*\text{pH} + 0.0140 T^*\text{Rela} - 0.0655 T^*\%T + 0.574 \text{ pH}^*\text{Rela} + 0.589 \text{ pH}^*\%T - 0.135 \text{ Rela}^*\%T$	R-cuad. 86.56%
$\text{RL} = -211.7 + 1.138 T + 34.73 \text{ pH} + 3.530 \text{ Rela} + 12.51 \%T - 0.010422 T^*T - 1.713 \text{ pH}^*\text{pH} - 0.3791 \text{ Rela}^*\text{Rela} - 1.873 \%T^*\%T - 0.0114 T^*\text{pH} + 0.01711 T^*\text{Rela} + 0.0079 T^*\%T - 0.0456 \text{ pH}^*\text{Rela} - 0.135 \text{ pH}^*\%T - 0.0998 \text{ Rela}^*\%T$	R-cuad. 92.82%

Nota aclaratoria: Conv: %Conversión del precursor, W: Cantidad de macropartículas, RL: parámetro de actividad biocida, T: Temperatura, %T: Concentración volumétrica de tensoactivo y Rela: Relación volumétrica entre solución de sal precursora y el extracto.

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice H. Verificación del modelo en la síntesis con las mejores condiciones de reacción

Tabla H1. Valores de predicción de respuesta

Variable respuesta	Valor esperado	Intervalo de confianza del 95%	
%Conversión	100.00	93.47	106.91
W (g)	5.99	3.02	8.96
RL	15.567	14.375	16.758

Tabla H2. Valores obtenidos para la verificación del modelo

Respuesta	Obtenido mediante la mejor síntesis
%Conversión	99.17%
W (g)	7.59
RL	15.2

%Conversión=%Conversión $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; W=Cantidad de macropartículas en gramos; RL=Actividad biocida (Reducción microbiana).

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice I. Resumen de los valores de respuesta en el diseño experimental

Tabla I1. Resumen de los valores de respuestas del diseño de experimentos

Reacción	Código	Conversión del precursor	Cantidad de macropartículas(g)	Actividad biocida (RL)
1	30-10-9-3	99.73 ± 0.05	28.22 ± 0.41	0.71 ± 0.03
2	30-10-5-5	99.73 ± 0.21	28.31 ± 1.90	1.77 ± 0.01
3	30-12-5-3	95.97 ± 0.51	8.93 ± 0.28	1.80 ± 0.04
4	30-8-5-3	98.81 ± 0.24	29.89 ± 0.33	2.69 ± 0.04
5	30-10-5-1	99.17 ± 0.45	15.09 ± 0.79	3.23 ± 0.04
6	30-10-1-3	96.92 ± 1.19	39.33 ± 2.49	8.05 ± 0.07
7	55-12-9-3	92.43 ± 1.84	8.97 ± 0.26	0.12 ± 0.02
8	55-12-1-3	29.84 ± 2.30	4.72 ± 0.21	0.20 ± 0.01
9	55-12-5-5	88.36 ± 0.89	15.28 ± 0.60	0.42 ± 0.01
10	55-12-5-1	86.67 ± 2.34	6.77 ± 0.15	0.49 ± 0.01
11	55-8-5-1	99.37 ± 0.02	9.33 ± 0.99	1.08 ± 0.04
12	55-10-9-5	99.60 ± 0.04	9.94 ± 0.19	1.64 ± 0.04
13	55-10-1-5	91.67 ± 0.58	25.01 ± 1.27	1.80 ± 0.05
14	55-10-1-1	92.95 ± 0.55	19.57 ± 1.39	2.33 ± 0.03
15	55-8-5-5	99.04 ± 0.31	8.42 ± 0.53	3.24 ± 0.05
16	55-10-9-1	99.58 ± 0.37	9.15 ± 1.05	5.32 ± 0.02
17	55-8-1-3	97.32 ± 0.12	22.82 ± 0.31	5.34 ± 0.01
18	55-8-9-3	99.34 ± 0.20	8.68 ± 0.86	6.65 ± 0.07
19	55-10-5-3	99.08 ± 0.20	7.66 ± 0.28	15.86 ± 0.33
20	80-10-5-1	97.97 ± 1.51	6.96 ± 0.81	1.40 ± 0.04
21	80-10-9-3	96.76 ± 0.92	7.90 ± 0.45	1.60 ± 0.02
22	80-10-5-5	97.86 ± 0.04	7.09 ± 0.14	1.56 ± 0.02
23	80-10-1-3	87.17 ± 0.98	13.56 ± 0.15	1.97 ± 0.04
24	80-12-5-3	96.32 ± 1.78	6.16 ± 0.86	2.16 ± 0.02
25	80-8-5-3	99.38 ± 0.43	8.48 ± 0.06	5.31 ± 0.03
28	Glutaraldehído	-	-	3.67 ± 0.05

Código: se usó una nomenclatura para llevar un control de las reacciones realizados durante el diseño de experimentos, la cual se estructuró de la siguiente manera: Primero, la temperatura (en °C) a la cual se realizó la reacción, seguido del valor de pH a trabajar, a su vez el valor de la relación v/v solución del precursor-extracto, y por el último la concentración v/v de tensoactivo. De tal modo: Temperatura – pH - Relación entre reactivos - Concentración %v/v Tensoactivo. Ejemplo:80-8-5-3

SÍNTESIS DE NPS-CU A PARTIR DE EXTRACTO DE GUAYABA

Apéndice J. Influencia del pH en la concentración de la solución coloidal

Figura J1. Síntesis a nivel bajo de temperatura y nivel alto y bajo de pH



Figura J2. Síntesis a nivel medio de temperatura y niveles alto y bajo de pH



Figura J3. Síntesis a nivel alto de temperatura y niveles alto y bajo de pH

Código=Temperatura – pH - Relación precursor-extracto - %v/v Tensoactivo; Ejemplo:80-8-5-3.