

Síntesis verde de nanopartículas de cobre y/o plata y su evaluación como agente biocida para el control de las bacterias patógenas *Escherichia coli* (ATCC® 25922).

Julián Mauricio Guerrero Rodríguez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Ingeniería Química

Directora

Debora Alcida Nabarlatz, PhD.

Profesora Escuela de Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Maestría en Ingeniería Química Bucaramanga

2025

## **Agradecimientos**

Agradecimientos al Grupo de Investigación en Tecnologías de Valorización de Residuos y Fuentes Agrícolas e Industriales para la Sustentabilidad Energética (INTERFASE), al Centro de Investigación en Catálisis (CICAT), al Laboratorio de Microscopia (LabMIC) y al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) por su contribución en el desarrollo de este trabajo.

## Tabla de Contenido

Introducción.....	17
1. Hipótesis.....	20
2. Objetivos .....	21
2.1. Objetivo general .....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Marco teórico y estado del arte .....	22
3.1. Parámetros que afectan la síntesis de Nps metálicas.....	22
3.1.1 Sales metálicas.....	23
3.1.2 Temperatura y Tiempo de Síntesis .....	24
3.1.3 pH .....	26
3.1.4 Uso de Extractos Vegetales en la síntesis de Nps .....	27
3.2. Producción de extractos vegetales con actividad reductora .....	28
3.2.5 Tratamiento del Material Vegetal.....	30
3.3. Pruebas de poder antioxidante.....	35
3.4. Métodos de caracterización de Nps.....	36
3.4.1 Espectroscopía .....	37
3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido.....	38
3.5. Uso de Nps para la eliminación de microorganismos patógenos .....	38
3.5.1 Técnicas para la determinación de actividad biocida .....	39
CAPITULO I.....	41

4. Selección y Producción de Extractos Vegetales a partir de Residuos Agroindustriales	41
4.1. Metodología.....	41
4.1.1 Actividad 1. Selección de Residuos Agroindustriales.....	42
4.1.2 Actividad 2. Producción de Extractos Vegetales a partir de Residuos Agroindustriales .....	43
4.1.3 Actividad 3. Elección del extracto con propiedades reductoras.....	49
4.2. Análisis y Discusión de Resultados.....	49
4.2.1 Actividad 1. Selección de Residuos Agroindustriales.....	49
4.2.2 Actividad 2. Producción de Extractos Vegetales a partir de Residuos Agroindustriales. .....	54
4.3. Conclusiones.....	80
CAPITULO II.....	81
5. Síntesis de nanopartículas metálicas de cobre, plata y bimetalicas de cobre/plata.....	81
5.1. Metodología.....	82
5.1.1 Actividad 1. Fabricación de soluciones coloidales de Cu, Ag y bimetalicas de CuAg	82
5.1.2 Actividad 2. Caracterización de las soluciones coloidales.....	85
5.1.3 Actividad 3. Determinación de las características morfológicas, tamaño y composición de las soluciones coloidales.....	87
5.2. Análisis y Discusión de Resultados.....	88
5.2.1 Caracterización de las soluciones coloidales.....	88
5.2.2 Determinación de las características morfológicas, tamaño y composición de las soluciones coloidales.....	121

5.3. Conclusiones.....	132
CAPITULO III .....	134
6. Evaluación de la actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas de cobre, plata y bimetálicas de cobre/plata .....	134
6.1. Metodología.....	135
6.1.1 Materiales y reactivos.....	135
6.1.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas .....	135
6.2. Análisis y Discusión de Resultados.....	136
6.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana en E. coli ATCC 25922 .....	137
6.3. Conclusiones.....	151
7. Conclusiones Generales .....	152
Referencias .....	154
Apéndices .....	188

## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Parámetros de extracción a evaluar en los diseños experimentales factoriales completos $2^3$ , con su correspondiente nivel inferior y superior. ....	47
Tabla 2. Residuos agroindustriales seleccionados y disponibles en el departamento de Santander para evaluar la capacidad antioxidante de sus extractos. ....	51
Tabla 3. Resultados estadísticamente significativos de los efectos principales e interacciones en la capacidad reductora de los extractos. ....	63
Tabla 4. Factores de mayor contribución con diferencias estadísticamente significativas seleccionados para los siguientes diseños experimentales de maximización de capacidad de reducción para todos los residuos evaluados. ....	69
Tabla 5. Niveles y parámetros de extracción del diseño central compuesto para los extractos de CPL y SM. ....	71
Tabla 6. Condiciones de extracción generadas y resultados del diseño experimental central compuesto para el extracto de CPL a un tiempo fijo de 24 horas. ....	74
Tabla 7. Condiciones de extracción generadas y resultados del diseño experimental central compuesto para el extracto de SM. ....	74
Tabla 8. Comparación de valores experimentales y su correspondiente predicción de la maximización de la capacidad de reducción de Cu. ....	79
Tabla 9. Parámetros de reacción a evaluar en el diseño experimental factorial fraccionado, con su correspondiente nivel inferior y superior. ....	83

Tabla 10. Comparación de los resultados de absorbancia de cada síntesis coloidal tras un mes de almacenamiento. ....	120
Tabla 11. Comparación de los resultados de tamaño de partícula de cada síntesis coloidal tras un mes de almacenamiento.....	120
Tabla 12. Diluciones seriadas de cada una las soluciones coloidales analizadas.....	135

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Metodología general para la selección de los residuos agroindustriales y la extracción de sus metabolitos vegetales.....	41
Figura 2. °Brix de los extractos de cada residuo obtenido a partir de las técnicas de maceración (Mac.) y soxhlet (Sox.).....	54
Figura 3. Capacidad de reducción de $\text{Cu}^{+2}$ de los extractos de cada residuo obtenido a partir de las técnicas de maceración (Mac.) soxhlet (Sox.).....	56
Figura 4. Capacidad de reducción de cada residuo agroindustrial según la condición de extracción dado el diseño factorial. ....	61
Figura 5. Gráficas de efectos principales y de interacciones para la capacidad de reducción de $\text{Cu}^{+2}$ en cada extracto obtenido.....	64
Figura 6. Graficas de maximización de la capacidad de reducción de $\text{Cu}^{+2}$ para los extractos de (A) CM y (B) CPI utilizando la secuencia de Fibonacci a un tiempo de 24 h y pH 4. ..	72
Figura 7. Gráficas de (A) Contorno y (B) Optimización para la maximización de la capacidad de reducción de $\text{Cu}^{+2}$ para el extracto de CPL, utilizando un diseño experimental central compuesto.....	76
Figura 8. Graficas de (A) Contorno y (B) Optimización para la maximización de la capacidad de reducción de $\text{Cu}^{+2}$ para el extracto de SM, utilizando un diseño experimental central compuesto.....	77
Figura 9. Actividades relacionadas a la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos vegetales.....	82

Figura 10. Espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Cu. (A) Longitud de onda de 200-1100 nm. Absorbancia de 0 – 5,0 [a.u] (B) Longitud de onda de 500-600 nm. Absorbancia de 0 – 1,0 [a.u]. .....	90
Figura 11. Espectro de absorbancia UV-Vis para la síntesis de Nps a partir de soluciones coloidales de Cu. Longitud de onda de 600-1000 nm. Absorbancia de 0 – 0,2 [a.u]. Enfoque en la reducción del reactivo CuSO <sub>4</sub> . (A) Pruebas 1 – 4. pH 4. (B) Pruebas 5 – 8. pH 12. ..	92
Figura 12. Absorción máxima de las soluciones coloidales de Cu en el rango de longitud de onda entre 500 – 600 nm. ....	94
Figura 13. Graficas de efectos principales de la absorbancia en el rango de 500 a 600 nm para CuNps.....	95
Figura 14. Espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Ag. Longitud de onda de 200-1100 nm. (A) Absorbancia de 0 – 160 [a.u]. (B) Absorbancia de 0 – 20 [a.u].....	98
Figura 15. Absorbancia máxima de las soluciones coloidales de Ag en el rango de longitud de onda entre 400 – 450 nm. ....	99
Figura 16. Gráficas de efectos principales para la absorbancia en el rango de 400 a 450 nm de AgNps.....	101
Figura 17. Espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de CuAg. Longitud de onda de 200-1100 nm. (A) Absorbancia de 0 – 100 [a.u]. (B) Absorbancia de 0 – 5 [a.u].....	103
Figura 18. Absorción máxima de las soluciones coloidales de Cu/Ag en el rango de longitud de onda entre 400 – 600 nm. ....	104

Figura 19. Gráficas de efectos principales y para la magnitud de la absorción en el rango de 400 a 450 nm para CuAgNps. ....	106
Figura 20. Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuNps.....	109
Figura 21. Graficas de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuNps.....	110
Figura 22. Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de Ag. ....	112
Figura 23. Gráficas de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de Ag. ....	114
Figura 24. Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuAgNps. ....	116
Figura 25. Graficas de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuAg. ....	118
Figura 26. Micrografías SEM a diferentes resoluciones de la solución coloidal de cobre. A) Aumento a 400x con detector ETD (200 $\mu\text{m}$ ). B) Aumento a 400x con detector BSED (200 $\mu\text{m}$ ). C) Aumento 12.000x con detector BSED (5 $\mu\text{m}$ ). ....	123
Figura 27. Micrografías SEM a diferentes resoluciones de la solución coloidal de plata. A) Aumento a 8.000x con detector ETD (10 $\mu\text{m}$ ). B) Aumento a 8.000x con detector BSED (10 $\mu\text{m}$ ). C) Aumento 120.000x con detector BSED (500 nm).....	126
Figura 28. Micrografías SEM a diferentes resoluciones de la solución coloidal de cobre/plata. A) Aumento a 5.000x con detector ETD (20 $\mu\text{m}$ ). B) Aumento a 5.000x con detector BSED (10 $\mu\text{m}$ ). C) Aumento 100.000x con detector BSED (500 nm). ....	128

Figura 29. Espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de cobre. ....	130
Figura 30. Espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de plata. ....	130
Figura 31. Espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de cobre/plata. ....	132
Figura 32. Efecto de la aplicación de la solución coloidal de CuNps a diferentes concentraciones sobre la cinética de crecimiento de E. coli ATCC 25922 a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h de incubación.....	139
Figura 33. Porcentaje de inhibición y viabilidad de las CuNps sobre E. coli ATCC 25922. Registro en la hora 8.....	139
Figura 34. Efecto de la aplicación de la solución coloidal de AgNps a diferentes concentraciones sobre la cinética de crecimiento de E. coli ATCC 25922 a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h de incubación.....	141
Figura 35. Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AgNp sobre E. coli ATCC 25922. Registro en la hora 8.....	141
Figura 36. Efecto de la aplicación de la solución coloidal de CuAgNps a diferentes concentraciones sobre la cinética de crecimiento de E. coli ATCC 25922 a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h de incubación.....	145
Figura 37. Porcentaje de inhibición y viabilidad de las Nps Ag/Cu 1 sobre E. coli ATCC 25922. Registro en la hora 8.....	146

## Lista de Apéndices

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Producción Anual de Cultivo en Colombia.....	188
Apéndice B. Producción Anual de Residuos en Colombia. ....	189
Apéndice C. Resultados y Curvas de calibración de la Prueba De Benedict Modificada. Extracciones por Maceración y Soxhlet. ....	190
Apéndice D. Prueba No-paramétrica de la mediana De Mood. Diferencias Estadísticamente Significativas de los Extractos de Residuos Agroindustriales. ....	192
Apéndice E. Verificación de los Supuestos de Normalidad, Varianza Constante e Independencia del Análisis de Varianza de las Pruebas Estadísticas. ....	194
Apéndice F. Análisis de Diseño Factorial. Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados de las Pruebas Estadísticas de los Extractos de Residuos Agroindustriales. ....	196
Apéndice G. Análisis de Diseño Central Compuesto de la Cap. Reducción del Extracto de Cáscara de Plátano (CPL). Verificación de los Supuestos de Normalidad, Varianza Constante e Independencia. Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados. ....	198
Apéndice H. Análisis de Diseño Central Compuesto de la Cap. Reducción del Extracto de Semilla de Mora (SM). Verificación de los Supuestos de Normalidad, Varianza Constante e Independencia. Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados. ....	199
Apéndice I. Modelo Matemático con la Predicción de la Capacidad de Reducción del Extracto de CPL. ....	200
Apéndice J. Modelo Matemático con la Predicción de la Capacidad de Reducción del Extracto de SM. ....	201

Apéndice K. Condiciones de extracción generadas según el diseño factorial fraccionado propuesto. ....	202
Apéndice L. Procedimiento para la validación de los datos de la medición del diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño y el índice de polidispersión a partir de la técnica de caracterización mediante DLS. ....	203
Apéndice M. Gráficas de los espectros de los reactivos utilizados en la síntesis de las soluciones coloidales. ....	207
Apéndice N. Color de soluciones coloidales de Cu, Ag y CuAg tras 48 horas de reposo, según las condiciones de síntesis aplicadas. ....	208
Apéndice O. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado de la máxima absorbancia entre 500 y 600 nm para la Síntesis de CuNps. ....	210
Apéndice P. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado de la máxima absorbancia entre 400 y 450 nm para la Síntesis de AgNps. ....	212
Apéndice Q. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado de la máxima absorbancia entre 400 y 600 nm para la Síntesis de CuAgNps. ....	214
Apéndice R. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los reactivos utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas de Cu, Ag y CuAg. ....	216
Apéndice S. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de CuNps. ....	219
Apéndice T. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado del Tamaño de partícula hidrodinámico para la Síntesis de CuNps. ....	222
Apéndice U. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de AgNps. ....	223

Apéndice V. Análisis del Diseño Factorial Fraccionado del Tamaño de partícula hidrodinámico para la Síntesis de AgNps .....	226
Apéndice W. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de nanopartículas metálicas de CuAgNps. ....	228
Apéndice X. Análisis del Diseño Factorial Fraccionado del Tamaño de partícula hidrodinámico para la Síntesis de CuAgNps.....	231
Apéndice Y. Gráfica de optimización de variables y modelos matemáticos para la maximización de la presencia de nanopartículas y minimización de tamaño de partícula de las soluciones coloidales. ....	233
Apéndice Z. Ecuación para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano. ....	236

## Resumen

**Título:** Síntesis verde de nanopartículas de cobre y plata y su evaluación como agente biocida para el control de la bacteria patógena *Escherichia coli* (ATCC® 25922)\*

**Autor:** Julián Mauricio Guerrero Rodríguez, y Debora Alcida Nabarlatz\*\*

**Palabras Clave:** Nanopartículas, Síntesis verde, Extractos vegetales, Residuos agroindustriales, Actividad antibacteriana, Microorganismos patógenos, Diseño de experimentos.

**Descripción:** Este estudio evaluó el uso de extractos acuosos de residuos agroindustriales como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis verde nanopartículas metálicas (CuNps, AgNps y CuAgNps) como alternativa para el control de la bacteria patógena *Escherichia coli* ATCC® 25922. La investigación se desarrolló en tres etapas: (i) selección de residuos agroindustriales y obtención de extractos mediante maceración y Soxhlet, optimizadas a través de diseño de experimentos para maximizar la capacidad de reducción del ion  $\text{Cu}^{+2}$ ; (ii) síntesis y caracterización de nanopartículas, aplicando diseño experimental para optimizar variables críticas (pH, concentración de extracto y sal metálica, tiempo de reacción), evaluando sus propiedades fisicoquímicas por espectrofotometría Uv-Vis, DLS, y SEM-EDX; y (iii) evaluación de su actividad antibacteriana in vitro, determinando la concentración mínima inhibitoria por microdilución en caldo. El extracto de semilla de mora (SM), obtenido por maceración acida presentó la mayor capacidad reductora. A partir de este extracto se sintetizaron las nanopartículas bajo condiciones optimizadas (10 mM de sal metálica, 75% v/v de extracto, pH 12 y 120 min de reacción). Las AgNps mostraron tamaños promedio de  $113,17 \pm 1,71$  nm, morfología ligeramente esférica y mayor contenido metálico (15,82%), a diferencia de las CuNps y CuAgNps, que fueron más grandes y con menor proporción metálica. Las pruebas antimicrobianas revelaron que únicamente las AgNps evidenciaron actividad al inhibir parcialmente el crecimiento de *E. coli* ATCC® 25922 durante las primeras 4 horas de incubación, mientras que las CuNps y CuAgNps no mostraron actividad significativa, atribuida a su baja concentración, mayor tamaño y composición metálica limitada. Estos hallazgos evidencian el potencial de los extractos derivados de residuos agroindustriales en la síntesis sostenible de nanopartículas y resaltan los desafíos asociados a la optimización de sus propiedades fisicoquímicas para mejorar su eficiencia biocida y aplicación antimicrobiana frente a microorganismos patógenos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Debora Alcida Nabarlatz. Ph.D en Ingeniería Química y de Procesos.

## Abstract

**Title:** Green Synthesis of Copper and Silver Nanoparticles and Their Evaluation as Biocidal Agents for the Control of the Pathogenic Bacterium *Escherichia coli* (ATCC® 25922)\*

**Author(s):** Julián Mauricio Guerrero Rodríguez, and Debora Alcida Nabarlatz<sup>1</sup>

**Key Words:** Nanoparticles, Green synthesis, Plant extracts, Agro-industrial waste, Antibacterial activity, Pathogenic microorganism, Experimental design.

**Description:** This study aims to evaluate the use of aqueous extracts from agro-industrial residues as reducing and stabilizing agents in the green synthesis of metallic nanoparticles (CuNps, AgNps, and CuAgNps), as an alternative to conventional biocides for controlling the pathogenic bacterium *Escherichia coli* (ATCC® 25922). The research was conducted in three stages: (i) selection of regional agro-industrial wastes and production of extracts using maceration and Soxhlet techniques, optimized through experimental design to enhance their Cu<sup>+2</sup> reducing capacity; synthesis and characterization of nanoparticles, applying experimental design to optimize critical variables (pH, extract and metal salt concentration, and reaction time), and assessing physicochemical properties by Uv-Vis spectroscopy, DLS, and SEM-EDX; and (iii) *in vitro* evaluation of antibacterial activity by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using broth microdilution assays. The blackberry seed extract, obtained by acidic maceration, showed the highest reducing capacity. This extract was used to synthesize nanoparticles under optimal conditions (10 mM metal salt, 75% v/v extract, pH 12 y 120 min de reaction). AgNps exhibited the smallest average size ( $113,17 \pm 1,71$  nm), nearly spherical morphology, and the highest metal content (15,82%), while CuNps and CuAgNps were significantly larger and contained lower elemental metal content. Only AgNps demonstrated antibacterial activity, partially inhibiting *E. coli* growth during the first 4 hours of incubation. These findings highlight the potential of agro-industrial waste-derived plant extracts for sustainable nanoparticle synthesis and emphasize the need to optimize physicochemical properties to enhance the biocidal efficiency of green-synthesized nanoparticles against pathogenic microorganisms.

---

\* Degree Work

<sup>1</sup> Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Debora Alcida Nabarlatz. Ph.D. in Chemical and Process Engineering.

## Introducción

La bacteria *Escherichia coli* es un patógeno de gran relevancia en salud pública. Generalmente presente en el intestino humano, se asocia a enfermedades como infecciones urinarias y diarreas, y puede ser letal en individuos vulnerables como niños y ancianos (World Health Organization, 2018). En 2021, la Organización Mundial de la Salud incluyó esta bacteria entre las bacterias prioritarias (críticas y altas) que más amenazan la salud humana debido a su resistencia antimicrobiana (World Health Organization, 2024). Además, en algunos casos este microorganismo es capaz de formar biopelículas, estructuras que incrementan su resistencia a agentes externos y dificultan su erradicación en superficies de agua y alimentos (Ziege et al., 2021). Este contexto subraya la necesidad de estrategias antimicrobianas más eficientes para prevenir su propagación y reducir su impacto.

Históricamente, se han utilizado biocidas químicos para el control de microorganismos en ambientes hospitalarios, agrícolas e industriales. Estos compuestos, en su mayoría, se clasifican en bactericidas oxidantes (BO) y no oxidantes (BNO), según su mecanismo de acción. Entre los BO destacan el hipoclorito de sodio y el dióxido de cloro por su eficacia para la desinfección de aguas y superficies, aunque tienen limitaciones relacionadas con la corrosión y la formación de subproductos tóxicos cuando interactúan con materia orgánica (Keasler et al., 2017). Los BNO como el glutaraldehído, ofrecen un amplio espectro microbiano, pero su efectividad es sensible al pH y tiende a decaer con el tiempo (Keasler et al., 2017)[7]. Diversos estudios indican que, tras 14 días en ambientes alcalinos, el glutaraldehído reduce su eficacia significativamente, además de ser un compuesto tóxico, irritante e inestable, limitando su uso en aplicaciones específicas (Karsa, 2007)(Fink, 2015).

La aparición de resistencia microbiana y los problemas ambientales asociados al uso de biocidas convencionales han incentivado el desarrollo de alternativas más sostenibles (Tenover, 2006). Las nanopartículas metálicas (Nps), en especial las de plata (AgNps) y cobre (Cu Nps), han demostrado propiedades antibacteriales destacadas (Girma et al., 2024; X. Li et al., 2023). Aunque las AgNps son reconocidas por su alto nivel de efectividad contra un amplio espectro de bacterias, el alto costo de la plata limita su aplicación masiva, en comparación al cobre cuyo costo es significativamente menor. Por otro lado, aunque las CuNps han sido menos investigadas, han mostrado una eficacia comparable a las AgNps en pruebas contra ciertas bacterias, a su vez que estudios recientes han señalado que la combinación de estos dos tipos de Nps pueden potenciar su actividad antimicrobiana gracias a sus efectos sinérgicos (Mohamad et al., 2013a).

Las Nps pueden sintetizarse por métodos físicos, químicos y biológicos (López Téllez et al., 2013)(Zanella, 2005). La síntesis química es ampliamente usada debido a su capacidad de controlar el tamaño y forma de las Nps, lo cual es crucial para su actividad microbiológica; sin embargo, el uso de sustancias reductoras para su síntesis como el borohidruro de sodio y la hidracina son altamente tóxicas y pueden quedar impregnadas en las Nps, comprometiendo su biocompatibilidad y aumentando su impacto ambiental (Gómez-Garzón, 2018)(Monge, 2009). Por este motivo, la ‘síntesis verde’ o química sostenible se han consolidado como una alternativa ecológica, ya que emplea compuestos naturales y evita la generación de subproductos peligrosos (Syafiuddin et al., 2017a).

El aprovechamiento de residuos agrícolas y biomasa residual como fuente de agentes reductores para la síntesis verde de Nps ofrece un enfoque sostenible, económicamente viable y escalable. En Colombia, la biomasa residual proveniente de cultivos como el café, banano

y caña de azúcar supera los 20 millones de toneladas anuales, y estos residuos contienen una gran variedad de compuestos como metabolitos primarios y secundarios, provenientes de estas plantas (DANE, 2020; Soto et al., 2019a). Estos metabolitos, que incluyen polisacáridos, polifenoles, flavonoides y terpenos, entre otros, poseen propiedades antioxidantes que, además de ayudar a la salud humana, pueden actuar como agentes antioxidantes y estabilizantes en la síntesis de Nps (Sepúlveda Jiménez et al., 2003) (S. Kuppusamy et al., 2016). La producción de Nps a partir del procesamiento de estos residuos ofrece la oportunidad para reducir la generación de desechos y valorizar subproductos agrícolas, alineándose con los principios de economía circular y sustentabilidad (Banco Mundial & McCourtie, 2021).

Por lo anterior, este proyecto propone el aprovechamiento y valorización de biomasa vegetal proveniente de residuos agroindustriales, como potencial fuente de metabolitos vegetales con el fin de utilizarlos como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis verde de CuNps y CuNps, evaluando su actividad antimicrobiana frente *E. coli*.

## 1. Hipótesis

A partir de los metabolitos vegetales presentes en los extractos acuosos de residuos agroindustriales generados en Colombia, es posible sintetizar a escala laboratorio, nanopartículas de cobre (CuNps), plata (AgNps), cobre-plata (CuAgNps) y/o sus óxidos, con propiedades biocidas para el control de la bacteria patógena *Escherichia coli* ATCC® 25922.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el uso de los extractos acuosos de residuos agroindustriales como agentes reductores y estabilizantes para la síntesis a escala laboratorio de CuNps, AgNps y CuAgNps y/o sus óxidos, con propiedades biocidas para el control de la bacteria patógena *Escherichia coli* ATCC® 25922.

### 2.2. Objetivos específicos

Seleccionar los residuos agroindustriales y la metodología de extracción de los metabolitos vegetales que serán utilizados como agentes reductores y/o estabilizantes para la síntesis de nanopartículas.

Sintetizar y caracterizar CuNps, AgNps y CuAgNps, o sus óxidos, empleando extractos vegetales de residuos agroindustriales como agente reductor, y evaluando su presencia y propiedades mediante las técnicas de caracterización espectrofotometría UV-VIS, DLS y SEM.

Evaluar la actividad antibacteriana de las Nps en la bacteria patógena *Escherichia coli* ATCC® 25922 utilizando pruebas in vitro.

### 3. Marco teórico y estado del arte

#### 3.1. Parámetros que afectan la síntesis de Nps metálicas

Las Nps metálicas pueden fabricarse utilizando diversos elementos metálicos y no metálicos como aluminio, oro, hierro, plata, cobre, zinc y sus óxidos o iones (V. V. Kumar & Anthony, 2016)(Slavin et al., 2017a). La síntesis de estas partículas se realiza mediante dos enfoques principales: la ruta descendente (*top-down*), que consiste en reducir materiales a granel hasta alcanzar dimensiones nanométricas, y la ruta ascendente (*bottom-up*), donde las Nps se forman ensamblando átomos o moléculas individuales (Mendoza Uribe & Rodríguez-López, 2007)(Pareek et al., 2017).

Los métodos *top-down*, como la fotolitografía y la molienda, tienen tiempos de síntesis cortos, pero presentan desventajas como el alto consumo energético y la dificultad de obtener partículas homogéneas menores a 10 nm (Gómez-Garzón, 2018)(Pareek et al., 2017)(Iqbal et al., 2012). En contraste, los métodos *bottom-up*, como la reacción química, microemulsiones y ablación laser, suelen ofrecer un mejor control sobre la morfología y el tamaño de las Nps (Pareek et al., 2017). Entre ellos, la reducción química es uno de los más utilizados debido a su bajo costo y versatilidad. En esta categoría, la biosíntesis, que emplea metabolitos vegetales como agentes reductores, ha ganado relevancia por su enfoque ecológico basado en reacciones de oxidación-reducción (Syafiuddin et al., 2017a).

La síntesis de Nps metálicas depende de parámetros como la concentración de la sal precursora, el extracto biológico, el agente estabilizante, el tiempo de reacción, el pH y la temperatura, entre otros. Los cambios en estas variables pueden alterar la forma, tamaño, distribución y otras propiedades de las Nps, lo que afecta directamente su actividad biocida (Mendoza Uribe & Rodríguez-López, 2007)(Zaleska-Medynska et al., 2016)(Crespo

Gutiérrez, 2014). Por ejemplo, *Pal et al.*, (2007) demostraron que las AgNps con forma triangular truncada tenían mayor eficacia contra bacterias Gram negativas, mientras que M. *Raza et al.*, (2016) observaron que los menores tamaños de Nps mejoraban significativamente su actividad antimicrobiana, independientemente de su forma (Pal et al., 2007b).

La morfología de las Nps incluye estructuras esféricas, cúbicas, nano tubos y nano barras, que pueden evolucionar hacia configuraciones complejas como redes dendríticas o prismas (Raza et al., 2016)(Khodashenas & Ghorbani, 2015). Además, Nps híbridas, formadas por la combinación de dos o más metales, ofrecen propiedades únicas, dependiendo del orden de mezcla de las sales metálicas o sus métodos de formación (Olajire & Adesina, 2017). Estas estructuras híbridas suelen clasificarse como *core-shell*, aleaciones u otras variaciones (Zaleska-Medynska et al., 2016). En esta clase de procesos multimetálicos, el metal con mayor potencial de reducción suele reaccionar y reducirse primero para formar un núcleo o, en algunos casos, fomentar la reducción de otros iones metálicos; sin embargo, la formación de Nps híbridas aún presenta incógnitas, siendo objeto de debate, donde el mecanismo de formación de las Nps no es del todo claro, incluyendo fenómenos de reducción competitiva que alteran las velocidades de reacción (Mohamad et al., 2013b).

### **3.1.1 Sales metálicas**

Para la síntesis de AgNps y CuNps se emplean sales metálicas como sulfatos, nitratos y acetatos de estos metales (Din et al., 2017). También se han utilizado otros precursores como cloruro de cobre o incluso nanocoloides de óxido de cobre en la obtención de CuNPS (Umer et al., 2014)(Andal & Buvaneswari, 2017).

La concentración de las sales metálicas utilizadas en la síntesis suele variar ampliamente, desde 0,1 mM hasta 1 M o más (Din et al., 2017). Sin embargo, cantidades

excesivas de sales o agentes reductores pueden generar la aglomeración descontrolada de átomos, aumentando el tamaño de partículas formadas fuera de las medidas deseadas (Padil & Černík, 2013). Por ejemplo, *Abdol Aziz et al.*, (2019) estudiaron la síntesis de nanopartículas de zinc utilizando acetato de zinc deshidratado en concentraciones entre 0,01 a 0,1 M, junto con extracto de cáscara de *Musa Paradisiaca* (banano) como agente reductor (Abdol Aziz et al., 2019). Los autores encontraron que una concentración óptima de 0,05 M da como resultado partículas de menor tamaño durante la síntesis.

El precursor metálico utilizado también influye en la morfología de las nanopartículas. *Phiwdang et al.*, (2013) sintetizaron nanopartículas de óxido de cobre (CuONps) con forma de barra corta utilizando nitrato y cloruro de cobre (ambos a una concentración de 0,1 M) (Phiwdang et al., 2013). Después de esta síntesis, tras un tratamiento térmico de calcinación, las partículas derivadas de cloruro de cobre cambiaron su forma a esferas, mientras que las sintetizadas con nitrato de cobre conservaron la forma de barra, aunque aumentaron de tamaño.

En términos generales, la sal metálica actúa como precursor de las reacciones de síntesis. Durante el proceso, los iones metálicos son reducidos para formar átomos de menor valencia, que posteriormente sirven como núcleos para el crecimiento de partículas. A medida que se agregan más átomos, las nanopartículas aumentan su tamaño, definiendo finalmente su morfología y propiedades (Makarov et al., 2014).

### ***3.1.2 Temperatura y Tiempo de Síntesis***

Además de la sal precursora, la temperatura y el tiempo de reacción también son factores que influyen directamente en las propiedades finales de las Nps.

En cuanto al tiempo de reacción, *Ahmad et al.*, (2016) observaron durante la síntesis de Nps de oro (AgNps) a 30°C, que la velocidad de reacción aumentaba con el tiempo hasta estabilizarse tras 60 minutos debido a la completa reducción de los iones de oro (*Ahmad et al.*, 2016). Por otro lado, *Chowdhury et al.*, (2016) estudiaron el impacto de la temperatura (25°C y 100°C) y el tiempo en la síntesis de AgNps (*Chowdhury et al.*, 2016). Los autores encontraron que, según los análisis UV-Vis, tras 30 minutos de reacción a 100°C, la formación de Nps era significativamente mayor que a 25°C, destacando que el uso de altas temperaturas reduce los tiempos de reacción necesarios para obtener mayores concentraciones de Nps. De manera similar, *J. Y. Song & Kim*, (2009) lograron una conversión superior al 90% de nitrato de plata para obtener AgNps, utilizando extracto de hojas de magnolia, en sólo 11 minutos al trabajar a 95°C (*J. Y. Song & Kim*, 2009). Este resultado contrasta con los obtenidos a bajas temperaturas, donde a estas condiciones, se requiere más tiempo para completar la síntesis.

En general, un incremento en la temperatura reduce tanto el tiempo de formación de Nps, así como el tamaño de éstas, influyendo también en su morfología y propiedades. *Mohammed Fayaz et al.*, (2009) demostraron que el uso de menores temperaturas de reacción producía partículas de mayor tamaño, mientras que las temperaturas más altas promovían la nucleación homogénea y la formación de Nps más pequeñas (*Mohammed Fayaz et al.*, 2009). *Khalil et al.*, (2014), trabajando con extracto de hoja de olivo, observaron que a temperaturas entre 80°C y 90°C se aumentaba la tasa de reducción de iones de plata y resultaban partículas de menor tamaño, coincidiendo con los hallazgos de otros autores que consideran este rango como óptimo para obtener NPS con dimensiones inferiores a 100 nm (*Khalil et al.*, 2014) (*Liu et al.*, 2020).

### 3.1.3 pH

Al igual que la sal precursora, la temperatura y el tiempo de síntesis, el pH del medio de reacción es un factor clave en la formación y estabilización de Nps. Según *Khalil et al.*, (2014), el pH alcalino aumenta la capacidad reductora y estabilizante de los antioxidantes presentes en extractos naturales, como el de *hoja* de olivo, al modificar las cargas eléctricas superficiales de las biomoléculas (*Khalil et al.*, 2014). En su estudio, un pH óptimo de 8 favoreció la formación de AgNps, observado en el aumento del espectro de absorbancia UV-Vis, mientras que, a valores de pH extremos, ya sean bajos o altos, se redujo la formación de Nps.

*Phongtongpasuk et al.*, (2016), sintetizaron AgNps utilizando extracto de cáscara de pitahaya y encontraron que un aumento en el pH de 3,35 a 5,35 generaba partículas progresivamente más pequeñas, con tamaños de 26,2 nm y 25,3 nm, respectivamente (*Phongtongpasuk et al.*, 2016). Por otro lado, *Fernando & Zhou*, (2019) reportaron que en medios ácidos las partículas tendían a agregarse y desestabilizarse debido a procesos de disolución, mientras que, a condiciones alcalinas, la presencia de iones hidroxilo contribuía a la re-estabilización y formación de suspensiones más estables (*Fernando & Zhou*, 2019a). En consecuencia, se observan tamaños mayores en medios ácidos y menores en medios alcalinos.

Por otro lado, la relación entre el pH y la morfología también es evidente. *Dong et al.*, (2009) demostraron que el uso de pH altos (entre 8,3-11,8) favorecía la formación de Nps esféricas y en forma de varilla debido a una rápida tasa de reducción del nitrato de plata, mientras que el uso de pH bajos (5,7-6,1) proporcionaba formas triangulares y poligonales, resultado de una nucleación y crecimientos más lentos (*Dong et al.*, 2009a).

Es importante notar que el pH óptimo varía dependiendo de la naturaleza de la sal metálica, así como de otros factores como el tiempo y la temperatura de reacción. Esto destaca la necesidad de optimizar cuidadosamente este parámetro en cada sistema específico para obtener las características y propiedades deseadas en las Nps.

#### **3.1.4 Uso de Extractos Vegetales en la síntesis de Nps**

Se han utilizado numerosos extractos vegetales provenientes de frutas, semillas, hojas y flores para la síntesis verde de AgNps y, en menor medida, de CuNps (P. Kuppusamy et al., 2016). Los ejemplos encontrados incluyen extractos de *Vitis vinífera* (vid), *Carica papaya* (papaya), *Citrus sinensis* (naranja) y *Aloe vera*, que han mostrado efectividad tanto como agentes reductores como estabilizantes (Din et al., 2017) (Ahmed et al., 2016)

*Tamuly et al.*, (2013) demostraron que los flavonoides y ácidos fenólicos presentes en extractos de *Piper pedicellatum* actúan como reductores de iones metálicos (Tamuly et al., 2013). Esto fue confirmado al identificar y aislar estos compuestos mediante HPLC para usarlos en la síntesis de Nps metálicas, logrando resultados similares entre los compuestos individuales y los extractos que los componían. Por otro lado, *Kokila et al.*, (2016) evaluaron distintos volúmenes de extracto acuoso de *Carica papaya* para sintetizar AgNps, encontrando que 12,6 ml de éste generaba el espectro UV-Vis con la mayor magnitud de absorbancia en la longitud de onda característica de estas Nps, indicando una mayor formación de Nps (Kokila et al., 2016a). *Mythili et al.*, (2018) utilizaron una mezcla de residuos vegetales de mercados para producir AgNps esféricas entre 10 y 90 nm, aunque resaltaron las dificultades de escalar este proceso debido a la heterogeneidad de la mezcla de residuos (Mythili et al., 2018).

Algunos materiales, además de agentes reductores, también actúan como agentes estabilizantes. Por ejemplo, las ciclodextrinas se han empleado para estabilizar tanto CuNps como AgNps obtenidas mediante síntesis verde utilizando ácido ascórbico como agente reductor (Zhao et al., 2011)(Suárez-Cerda et al., 2017). Además, el almidón ha demostrado ser eficaz para estabilizar CuNps, controlando su crecimiento y protegiéndolas contra la oxidación en contacto con el aire (Suramwar et al., 2016). El tipo de estabilizante desempeña un papel crucial al evitar la aglomeración y degradación de las Nps, preservando el tamaño y propiedades específicas.

En muchos casos, los mismos extractos vegetales cumplen funciones duales como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de Nps. Ejemplos incluyen extractos de *Manihot esculenta* (yuca), *Morinda citrifolia* (noni), *Brassica oleracea var. capitata* (repollo), *Musa paradisiaca* (plátano), *Hylocereus undatus* (pitahaya), *Daucus carota sativa var. atrorubens* (zanahoria negra), entre otros (Syafiuddin et al., 2017b) (Phongtongpasuk et al., 2016).

De manera general, J. Y. Song & Kim, (2009) sugieren que una concentración de extracto vegetal del 10-20% v/v es óptima para la síntesis de AgNps (J. Y. Song & Kim, 2009). Los autores consideran que concentraciones mayores a 20% v/v pueden causar agregación de Nps, probablemente debido a interacciones entre las moléculas de los agentes estabilizantes en la superficie de las Nps y procesos de reducción secundaria que ocurren durante las reacciones de síntesis.

### **3.2. Producción de extractos vegetales con actividad reductora**

La extracción es el proceso *mediante* el cual se obtienen compuestos específicos de materiales vegetales o biomasa utilizando un solvente (Handa et al., 2008a). El objetivo

principal de este procedimiento es maximizar la cantidad de compuestos de interés en el extracto. Estos pueden obtenerse de diversas partes de las plantas, como raíces, cortezas, tallos, hojas, flores, frutas, cáscaras y semillas (P. Kuppusamy et al., 2016). Para optimizar el proceso, el material vegetal debe someterse a etapas de preparación, como secado y trituración, sin embargo, no existe un protocolo único que sea efectivo para extraer todos los compuestos antioxidantes, ya que éstos varían ampliamente en composición, cantidad y propiedades fisicoquímicas.

Diversas investigaciones han destacado las frutas y verduras como fuentes ricas en compuestos antioxidantes debido a su impacto positivo en la salud y longevidad funcional (Pellegrini et al., 2003). Los alimentos como especias, hierbas, nueces, cereales, bayas, frutas y vegetales contienen altos *niveles* de antioxidantes, entre ellos polifenoles, flavonoides, carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y enzimas (Benzie & Choi, 2014) (D.E & Emenike, 2006).

Además de los alimentos frescos, los residuos generados en el procesamiento de plantas, frutas y vegetales también poseen cantidades significativas de compuestos antioxidantes, aunque en menor *proporción* (S. Kuppusamy et al., 2016). Ejemplos de éstos incluyen la cáscara de piña (Sepúlveda et al., 2018), residuos de nuez (Jahanban-Esfahlan et al., 2019), cáscara de granada (Qu et al., 2010), cáscara de cítricos (Saratale et al., 2018), residuos de uva (Soto et al., 2019b) y cáscara de plátano (Logeswari et al., 2013), entre otros. Estos subproductos agroindustriales representan una valiosa fuente alternativa para la obtención de compuestos antioxidantes.

### ***3.2.5 Tratamiento del Material Vegetal***

Para optimizar la extracción de compuestos de los materiales vegetales, es común realizar pretratamientos antes del *proceso* de extracción propiamente dicho. Entre las técnicas más utilizadas se incluyen el secado del material vegetal y la reducción de su tamaño de partícula mediante procesos como molienda o triturado.

**3.2.5.1 Secado del Material Vegetal.** El secado es un paso crucial para reducir la humedad del material vegetal y mejorar la extracción de compuestos (da Silva et al., 2013a). Métodos como el secado al sol o a la sombra son populares debido a su bajo costo y facilidad de uso, aunque requieren varios días para completarse y espacios amplios para su implementación. Por otro lado, el secado en horno ha ganado relevancia, ya que, aunque es más costoso, reduce el tiempo a unas pocas horas y minimiza la degradación de compuestos causada por enzimas o por la exposición solar. Estudios como los de Kankara et al., (2014) resaltan que no encontraron diferencias significativas entre estos métodos de secado en términos de degradación de biomoléculas sensibles (Kankara et al., 2014a).

*Chen et al., (2011)* y *da Silva et al., (2013)* investigaron el impacto del secado en el contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes en extractos de cáscaras de cítricos (Chen et al., 2011) (da Silva et al., 2013). Los autores encontraron que el contenido de estos compuestos aumenta con la temperatura de secado, siendo mayor en los extractos obtenidos de cáscaras secas que de cáscaras frescas. Este fenómeno se atribuye a que los compuestos fenólicos almacenados en vacuolas se liberan más fácilmente cuando el secado descompone previamente algunas estructuras celulares. No obstante, encontraron que temperaturas superiores a 100°C pueden alterar la estructura molecular de los compuestos, indicando que la temperatura óptima depende del componente que se desee preservar.

Finalmente, investigaciones como la de *Qu et al.*, (2010) sugieren que, además de la temperatura de secado, el tipo de planta y la parte utilizada influyen en el rendimiento y la capacidad antioxidante de los extractos. En su estudio, el secado no afectó significativamente el contenido ni las propiedades antioxidantes de extractos acuosos de cáscara y semillas de granada (*Qu et al.*, 2010).

**3.2.5.2 Tamaño de partícula.** La reducción del tamaño de partícula mediante molienda o trituración fina es un pretratamiento comúnmente aplicado para la producción de extractos. Este proceso mejora significativamente la extracción al disminuir limitaciones de difusión, concentrar la distribución del tamaño de las partículas y aumenta el área de superficie específica (*Zaiter et al.*, 2016). Estas mejoras optimizan la funcionalidad del material, reducen los tiempos de extracción y aumentan la eficiencia del proceso (*Qu et al.*, 2010).

En el estudio realizado por *Qu et al.*, (2010), el rendimiento de la extracción en cáscaras de granada aumentó de 9,4 a 11,5% p/p, mientras que el contenido de compuestos antioxidantes pasó de 17,6 a 22,9% p/p al reducir el tamaño de partícula a 0,2 mm y utilizar una menor relación material vegetal/agua (1/50 %p/p). Además, esto permitió disminuir el tiempo de reacción de 90 min a solo 2 min (*Qu et al.*, 2010).

*Makanjuola*, (2017) evaluó la influencia del tamaño de partícula en el contenido de antioxidantes de extractos etanólicos, acuosos y sus mezclas, obtenidos de *Camellia sinensis* (té) y *Zingiber officinale* (jengibre) (*Makanjuola*, 2017a). El estudio mostró que se obtenían más antioxidantes en los extractos acuosos cuando las partículas tenían un tamaño entre 0,4 y 0,7 mm, aunque no se observaron diferencias significativas en el contenido antioxidante en los extractos con distintos solventes.

Por otro lado, investigaciones han mostrado que al usar solventes como metanol/agua (70%), el uso de tamaños de partícula pequeños (0,1-0,2 mm) permitió maximizar la extracción de antioxidantes (Zaiter et al., 2016) (Majeed et al., 2016). En general, estos hallazgos indican que el tamaño de partícula óptimo varía según el tipo y solvente y material vegetal utilizado en la extracción.

**3.2.5.3 Solventes y Técnicas de extracción.** La elección del solvente, la técnica de extracción y el tamaño de partícula son factores clave para obtener compuestos antioxidantes de materiales vegetales. Es esencial seleccionar el método más adecuado, ya que incluso al usar el mismo material vegetal y solvente, la eficiencia puede variar significativamente (Kothari et al., 2012a). Además, debido a la diversidad de materiales vegetales, existen múltiples técnicas de extracción como infusión (Yen & Chen, 1995), autohidrólisis (Sepúlveda et al., 2018), maceración (Hossain & Rahman, 2011a), maceración asistida por ultrasonidos (Londoño-Londoño et al., 2010), y extracción soxhlet (Venkatesan et al., 2019), entre otras (Pellegrini et al., 2003).

*Kothari et al.*, (2012) compararon varios métodos, incluyendo maceración asistida por microondas y ultrasonido, utilizando metanol, etanol y agua como solventes (Kothari et al., 2012a). Los autores encontraron que el uso de Soxhlet tuvo el mejor rendimiento para extraer compuestos fenólicos, pero fue menos eficiente para flavonoides. Este estudio destaca que un mayor rendimiento no siempre equivale a una mayor eficiencia y advierte sobre la posible descomposición térmica de los compuestos debido a las altas temperaturas empleadas en algunos métodos (Handa et al., 2008a).

Por otro lado, *Sharif & Bennett*, (2016) compararon la maceración sencilla y con reflujo en rizomas de jengibre, utilizando etanol como solvente. Aunque ambas técnicas

mostraron capacidades antioxidantes similares, la maceración sencilla tuvo mejores rendimientos, confirmando la importancia de elegir el método según las características del material y los compuestos a extraer (Sharif & Bennett, 2016).

La selección del solvente también juega un papel crucial debido a la variabilidad y complejidad química de los compuestos presentes en las plantas, siendo el metanol, etanol, acetona, y agua, solventes comunes en la extracción de antioxidantes (Truong et al., 2019). La polaridad del solvente afecta directamente su eficacia. Por ejemplo, extractos metanólicos y acuosos de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* y *Mentha piperita* tienden a tener mayores compuestos antioxidantes en comparación con solventes como hexanos o diclorometano (Barchan et al., 2014a).

*Truong et al.*, (2019) encontraron que los solventes polares como metanol y etanol maximizan la extracción de antioxidantes en *Severinia buxifolia* (Truong et al., 2019), así como, en extractos de hojas de *Ocimum sanctum* (albahaca morada), *S. Y. Lee et al.*, (2016) observaron que el uso de fraccionamientos con solventes de polaridad creciente permitió obtener antioxidantes con diferentes propiedades (S. Y. Lee et al., 2016).

Aunque los solventes polares como el agua y el etanol suelen ser los más efectivos para la extracción de compuestos antioxidantes, el agua es el solvente de preferencia debido a su polaridad, su compatibilidad ambiental y su carácter no tóxico. Sin embargo, el uso de agua puede ocasionar un fenómeno llamado “hinchamiento”, en el cual el material vegetal seco se expande, bloqueando el flujo de solvente y reduciendo el rendimiento del proceso. Este problema es más pronunciado a medida que aumenta el porcentaje de agua en el solvente. Por esta razón, se recomienda realizar pruebas preliminares para determinar cuánto solvente

absorbe el material vegetal, ajustando el volumen necesario minimizando los efectos adversos en la extracción (Handa et al., 2008a).

**3.2.5.4 Temperatura y Tiempo de extracción.** La temperatura y el tiempo son parámetros clave en la extracción de compuestos de material vegetal, y ambos están directamente relacionados (Mohamad et al., 2013b). Una temperatura óptima puede reducir el tiempo del proceso y mejorar la extracción al aumentar la difusión, la solubilidad y la permeabilidad de las membranas celulares, facilitando la liberación de compuestos como los polifenoles (Kankara et al., 2014a). No obstante, estos efectos dependen del material vegetal y del compuesto de interés.

*Sepúlveda et al.*, (2018) observaron un aumento en el rendimiento de extracción a temperaturas más altas, mientras que *Mokrani & Madani*, (2016) encontraron que las concentraciones de polifenoles extraídos en *Prunus pérsica L.* (durazno) disminuían al incrementar la temperatura de 25°C a 70°C, mientras que la cantidad de flavonoides aumentó hasta los 60°C (*Sepúlveda et al.*, 2018) (*Mokrani & Madani*, 2016). En este caso las mejores condiciones de extracción de polifenoles incluyeron 60% v/v de acetona a 25°C durante 180 minutos.

*Sardsaengjun & Jutiviboonsuk*, (2009) identificaron que el contenido total de polifenoles en semillas de *Areca catechu Linn* era mayor (2,76% p/p) a 80°C por 45 minutos, pero menor (1,18% p/p) a 60°C por 15 minutos (*Sardsaengjun & Jutiviboonsuk*, 2009). *Kankara et al.*, (2014) destacaron que los polifenoles totales y flavonoides alcanzaron su máxima concentración a 40°C y 55°C, respectivamente, sugiriendo que los materiales vegetales conteniendo compuestos termoestables pueden beneficiarse de temperaturas elevadas (*Kankara et al.*, 2014a).

Aunque mayores tiempos y temperaturas pueden favorecer la extracción inicial, una exposición prolongada del material a altas temperaturas puede degradar los compuestos sensibles. Esto resalta la necesidad de optimizar las condiciones según las propiedades de cada compuesto y material.

### 3.3. Pruebas de poder antioxidante

Los compuestos antioxidantes se caracterizan por oxidarse preferiblemente en lugar de otras sustancias presentes en un medio de reacción. Su actividad antioxidante se define como la capacidad de inhibir procesos de degradación oxidativa. Para evaluar esta capacidad, se emplean diversas metodologías fisicoquímicas que permiten identificar y cuantificar los compuestos antioxidantes presentes en los extractos vegetales, conocidas como pruebas de poder antioxidante o reductor.

Entre las técnicas más utilizadas se destacan:

- **FRAP** (poder antioxidante-reductor férrico) (Halvorsen et al., 2002).
- **TRAP** (parámetro antioxidante de atrapamiento de radicales totales) (Huang et al., 2005).
- **TEAC** (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) (F.-L. Song et al., 2010)
- Captura de radicales **DPPH** (S. Kuppusamy et al., 2016) y **ABTS** (Barros et al., 2017a, 2017b; Re et al., 1999).
- **Polifenoles totales** (Folin & Ciocalteu, 1927) y su modificación (Singleton & Rossi, 1965).
- **Reducción de Fe (III)** (Murillo et al., 2007)(Oyaizu, 1986).
- Métodos clásicos como las pruebas de **Benedict** (Benedict, 1908), **Fehling** o **DNS** (Gail Lorenz Miller, 1959) para azúcares reductores.

Aunque los métodos producen resultados coincidentes para compuestos puros como el ácido ascórbico, las diferencias en las condiciones de prueba complican su aplicación en mezclas complejas como los extractos vegetales, donde la variabilidad en las metodologías y la diversidad en los sistemas a evaluar afectan significativamente los resultados (Pinchuk et al., 2012).

Por esta razón, las técnicas de identificación específicas, como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), HPLC acoplada a masas (HPLC-MS) y la cromatografía de gases con espectrofotometría de masas (GC-MS), son útiles, pero no siempre permiten identificar todos los antioxidantes presentes en una mezcla (Londoño-Londoño et al., 2010) (S. Y. Lee et al., 2016).

Dado que no existe un método universal que evalúe de manera completa la actividad antioxidante, las pruebas están diseñadas para determinar un “contenido o capacidad antioxidante total”. Esto se debe a que los compuestos antioxidantes pueden interactuar de formas distintas según el tipo de prueba empleada (Benzie & Choi, 2014). Por lo tanto, la elección de la metodología depende del objetivo específico del estudio y las características de la muestra evaluada.

### **3.4. Métodos de caracterización de Nps**

Debido a su escala, las propiedades de los nanomateriales están regidas por principios de mecánica cuántica (Mendoza Uribe & Rodríguez-López, 2007). Las principales diferencias entre los nanomateriales y sus equivalentes macroscópicos radican en el aumento del área superficial y los efectos cuánticos. Incluso cuando las Nps están compuestas del mismo material, exhiben propiedades nuevas o mejoradas dependiendo de ciertas características

como su tamaño, distribución, estructura y morfología (Crespo Gutiérrez, 2014), por lo que la caracterización de estas propiedades es esencial.

Aunque la formación de Nps puede detectarse preliminarmente por cambios de color en la solución, como en las AgNps y CuNps, las técnicas de caracterización espectroscópicas y microscópicas proporcionan información detallada sobre su composición, estructura y propiedades.

### ***3.4.1 Espectroscopía***

Las técnicas espectroscópicas como UV-Vis, dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopía de dispersión de energía (EDS) son métodos indirectos para analizar las propiedades de las Nps, asociadas a la resonancia de plasmón superficial (SPR) (Aguilar-Tapia & Zanella, 2018). La SPR ocurre cuando la luz incidente genera oscilaciones colectivas de electrones en la superficie metálica de las Nps, produciendo una absorción intensa en una longitud de onda específica.

**UV-Vis:** Es de las técnicas más utilizadas. La longitud de onda característica de absorción permite confirmar la presencia de Nps, con valores típicos de 400-450 nm para AgNps, 750-800 nm para CuNps y valores entre 400 y 800 para aleación de CuAgNps (Valodkar et al., 2011). La intensidad de la absorción aumenta con la formación de partículas más pequeñas, mientras que los tamaños mayores tienden a reducirla.

**DLS (Dynamic Light Scattering):** Se emplea para determinar el diámetro hidrodinámico, distribución de tamaños y potencial zeta de las Nps en suspensión (Patel et al., 2015).

### 3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Las técnicas microscópicas son métodos directos que ofrecen imágenes detalladas de las Nps, entre ellas SEM es ampliamente utilizada para caracterización de Nps.

**SEM (Scanning Electron Microscopy):** Proporciona información sobre la superficie y morfología de las Nps. Sin embargo, no puede distinguir estructuras internas en Nps bimetálicas core/shell.

**EDS (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy):** Detecta la composición elemental de las Nps mediante un espectro de rayos X único para cada elemento. Se acopla a microscopios electrónicos como SEM, permitiendo identificar componentes químicos y posibles oxidaciones (Vijayaraghavan & Ashokkumar, 2017). Así mismo, permite analizar composiciones específicas de las Nps, verificando la pureza del material sintetizado (J. K. Sharma et al., 2015).

### 3.5. Uso de Nps para la eliminación de microorganismos patógenos

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria de interés clínico y ambiental debido a su capacidad para causar infecciones y su resistencia a diversos tratamientos antimicrobianos. Es un bacilo Gram negativo ampliamente distribuido en el intestino humano y de animales, aunque la mayoría de las cepas son comensales, algunas variantes patógenas, como *E. coli* 0157 o productoras de toxina Shiga (STEC), pueden causar infecciones severas como diarreas hemolíticas, infecciones urinarias e insuficiencia renal (Kaper et al., 2004). También es un indicador clave de contaminación fecal en agua y alimentos, subrayando la importancia de su control para la salud pública.

En este contexto, las AgNps, CuNps, y CuAgNps han mostrado ser agentes antimicrobianos prometedores debido a su acción biocida multifacética, que incluye daño a la

membrana celular, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e interrupción de procesos metabólicos (Dakal et al., 2016). Estudios recientes han reportado que las AgNps son efectivas contra *E. coli*, con tasas significativas de reducción bacteriana en aplicaciones médicas y ambientales (Raffi et al., 2007). Por otro lado, las CuAgNps combinan las propiedades, tanto de las AgNps como de las CuNps, mostrando sinergia en su actividad biocida y una mayor efectividad contra patógenos resistentes (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

Las AgNps, CuNps, y CuAgNps sintetizadas mediante extractos vegetales y otros medios amigables con el medio ambiente también han demostrado un gran potencial como agentes biocidas (Chakraborty et al., 2022; Varshney et al., 2012). Este enfoque de síntesis verde utiliza compuestos bioactivos presentes en plantas, como polifenoles, flavonoides y alcaloides, que actúan como agentes reductores y estabilizantes, minimizando el uso de químicos tóxicos (Sepúlveda Jiménez et al., 2003) (S. Kuppusamy et al., 2016). Estas Nps han mostrado eficacia contra diferentes bacterias debido a su capacidad para interrumpir la integridad de la membrana celular y generar estrés oxidativo, lo que las convierte en herramientas prometedoras para aplicaciones antimicrobianas sostenibles (Franci et al., 2015; Kokila et al., 2016b).

### ***3.5.1 Técnicas para la determinación de actividad biocida***

Para evaluar la efectividad biocida de las Nps se emplean diversas técnicas, entre las más utilizadas se encuentra la Medición de densidad óptica (OD). La OD es una técnica ampliamente usada para monitorear el crecimiento bacteriano. Se realiza mediante espectrofotometría, donde se mide la absorbancia a una longitud de onda específica (generalmente 600 nm, OD600) (McGoverin et al., 2021). En estudios de Nps, una

disminución en la OD después de la exposición de las bacterias a las Nps indica actividad biocida (Soto et al., 2019a).

## CAPITULO I

### 4. Selección y Producción de Extractos Vegetales a partir de Residuos

#### Agroindustriales

Este capítulo aborda la identificación y selección de residuos agroindustriales provenientes de cultivos típicos de la región de Santander, enfocándose en aquellos con potencial para ser utilizados como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de partículas. A través de una revisión bibliográfica inicial, se seleccionaron cuatro residuos agroindustriales representados por su accesibilidad y su contenido de compuestos reductores o antioxidantes.

Se describe el acondicionamiento de los materiales vegetales y el uso de dos técnicas de extracción, Soxhlet y Maceración, para obtener extractos ricos en metabolitos vegetales. Posteriormente, estos extractos se caracterizaron mediante mediciones de sólidos totales disueltos, expresado en °Brix, y su capacidad de reducción del ion  $\text{Cu}^{+2}$ , evaluada con la prueba espectrofotométrica de Benedict modificada.

Con un enfoque en la optimización de resultados, se realizaron diseños experimentales para maximizar la capacidad reductora de los extractos, permitiendo identificar la técnica de extracción, el residuo agroindustrial, y las condiciones de extracción más adecuadas. Este proceso constituye la base para el uso de dicho extracto como agente reductor en la síntesis de partículas metálicas en los capítulos posteriores.

#### 4.1. Metodología

##### Figura 1.

Metodología general para la selección de los residuos agroindustriales y la extracción de sus metabolitos vegetales.



#### ***4.1.1 Actividad 1. Selección de Residuos Agroindustriales***

Para escoger el material vegetal a analizar se realizó una revisión bibliográfica de los principales cultivos agroindustriales presentes en la zona de Santander que pudieran ser fácilmente recolectados de plazas de mercado, puntos de venta y empresas procesadores de frutas y verduras, al igual que por ser potenciales poseedores de compuestos reductores o antioxidantes. Se recopiló información del sector agrícola a partir de documentos como el Anuario Estadístico del Sector Agropecuario del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), las Evaluaciones Agropecuarias Municipales (EVA) y las Encuestas Nacionales Agropecuarias (ENA), ambas de los años 2019-2021 (DANE, 2020; UPRA & Agronet, 2023), los cuales contienen información estratégica de las principales variables de la actividad agropecuaria presente en la geografía nacional, y del Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia (APEBRC) (Escalante Hernández et al., 2011), en el cual se determinó la oferta de biomasa de algunas especies representativas de los sectores agrícolas y de residuos sólidos orgánicos en el departamento, entre otros.

Entre las variables que se analizaron en dichos documentos se encuentran:

1. Porcentaje de participación en la producción agrícola nacional.

2. Relación de generación de biomasa residual o Factor de Residuo (FR) [Ton residuo/Ton Producto].
3. Competencia o valorización y uso de residuos agroindustriales en otros procesos.

Del total de productos y residuos agrícolas identificados se eligieron cuatro (4), con el fin de extraer de éstos los metabolitos vegetales y determinar su capacidad de reducción.

#### ***4.1.2 Actividad 2. Producción de Extractos Vegetales a partir de Residuos Agroindustriales***

**4.1.2.1 Materiales y Reactivos.** Para esta actividad se utilizó agua desionizada suministrada por la empresa Zumotec S.A, glutaraldehído ( $C_5H_8O_2$ ) (50%, BASF), citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) (>99%, PanReac), carbonato anhidro de sodio ( $Na_2CO_3$ ) (>99%, Panreac), hidróxido de sodio (NaOH) (50%, Brinsa) y sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (>99%, Panreac).

**4.1.2.2 Acondicionamiento del material vegetal.** Inicialmente, a través de inspección visual directa, se selecciona el material vegetal que posea el menor grado posible de deterioro en su superficie y se separa de cualquier excedente u otro residuo extraño presente. Acto seguido estos residuos pasan por un protocolo de limpieza y desinfección, el cual consiste en la remoción y eliminación de materia orgánica y algunos microorganismos contaminantes que puedan afectar la integridad del material vegetal, pasando por una solución jabonosa de detergente comercial, seguido de la inmersión de estos residuos en una solución de glutaraldehído a una concentración de 2% v/v por 20 minutos. Posteriormente, el material vegetal es secado a temperatura ambiente bajo sombra por 7 días para ser pesado. Después se procede a la reducción de tamaño mediante un molino de cuchillas y es clasificado granulométricamente mediante tamización con tamaños menores a 1 mm para lograr una distribución consistente del tamaño de partícula (Handa et al., 2008b;

Makanjuola, 2017b). El material es almacenado a  $-4^{\circ}\text{C}$  en bolsas de polietileno de baja densidad con cierre hermético hasta que sea utilizado para el procedimiento de extracción correspondiente.

Debido a que todo material vegetal seco necesita de solvente para volver a su estado húmedo inicial (anterior al secado), se debe realizar previamente una prueba de hinchamiento (Handa et al., 2008b). Esta prueba permite la humectación uniforme preliminar del material vegetal, haciendo que el volumen de solvente agregado al material seco propicie netamente la extracción de compuestos y no se divida su efecto en humectar o extraer. Para ello, se debe agregar previamente un excedente de solvente a las muestras vegetales, para posteriormente adicionar el volumen neto del solvente que se necesite sin que éste afecte la extracción. Esta prueba se debe realizar para cada material seco que es utilizado para cada prueba de extracción.

#### **4.1.2.3 Actividad 2.1.** Procedimiento para la selección de la técnica de extracción.

**Extracción por Maceración.** Para realizar la extracción por maceración se usaron condiciones fijas teniendo en cuenta una relación sólido/solvente (%S/L) de 10% o 1:10 peso/volumen, es decir, 1 g de muestra del material vegetal a evaluar, previamente acondicionado, con 10 ml de agua destilada (Handa et al., 2008b). Se colocó la mezcla heterogénea en un recipiente ámbar por 48 h en reposo. Una vez terminado ese lapso, se separó el extracto líquido del material sólido remanente utilizando una centrífuga marca Nurxiovo 80-2 a 3500 rpm por 15 min, y su sobrenadante se almacenó en un recipiente ámbar a  $-4^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

**Extracción Soxhlet.** La extracción por Soxhlet se realizó de manera estándar igualmente aplicando condiciones fijas teniendo en cuenta una relación sólido/solvente (%S/L) de 10% o 1:10 peso/volumen, es decir, 1 g de muestra del material vegetal a evaluar, previamente acondicionado, con 10 ml de agua destilada (Handa et al., 2008b). Este material vegetal se colocó en un papel filtro formando un cartucho. El inicio del registro del tiempo de extracción se realizó cuando el agua destilada contenida en el balón comienza su proceso de ebullición. Según el material vegetal, el tiempo del proceso de extracción osciló entre 2 a 7 horas, cuyo tiempo de parada se estipuló cuando el solvente en el cuerpo del soxhlet tomó un color traslúcido. El extracto obtenido se almacenó en un recipiente ámbar a  $-4^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Caracterización de los extractos vegetales.

**Medición de Sólidos Totales Disueltos.** Para la determinación de los sólidos totales disueltos, expresados como grados Brix ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), se siguieron los lineamientos de la norma ISO 2173:2003 basados en el principio de índice de refracción utilizando un refractómetro manual análogo marca XDC (International Organization for Standardization, 2022).

**Capacidad de reducción del ion  $\text{Cu}^{+2}$  (prueba de Benedict - modificada).** Para la determinación de la capacidad reductora de los extractos vegetales se utilizó la Prueba de Benedict modificada debido a su enfoque en la reducción del ion  $\text{Cu}^{+2}$  (Hernández-López et al., 2020). Esta prueba se basa en la cuantificación por espectrofotometría del sulfato de cobre residual de una solución (reactivo de Benedict) tras su reacción con un agente reductor.

Para la preparación del reactivo de Benedict modificado, se disolvieron 100 g de carbonato anhidro de sodio, 173 g de citrato de sodio y 17,3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 1 L de agua destilada. Debido a que la reacción se da en medio alcalino, se

llevó la solución a pH entre 11 y 12 agregando NaOH. La prueba fue realizada en un espectrofotómetro UV-Vis DU- 8200 marca DRAWELL.

Para determinar la longitud de onda apropiada para la determinación de sulfato de cobre remanente se realizó un barrido del espectro UV-Vis a una solución de sulfato de cobre (previa verificación de la no interferencia de los demás compuestos del reactivo de Benedict), variando la longitud de onda de 290 a 1.100 nm operando a una resolución de 1 nm, hasta comprobar el valor en el cual se encuentra la absorbancia máxima de dicha solución. Agua destilada fue utilizada como línea base y para la curva de calibración se hicieron 10 diluciones seriadas con repetición de  $\text{CuSO}_4$  partiendo de una concentración máxima de 5 g/L (donde la absorbancia indicaba aprox. 1 [a.u]) hasta llegar a 0 g/L.

La prueba de capacidad reductora del ion  $\text{Cu}^{+2}$  se realizó inicialmente al mezclar 1 ml del reactivo de Benedict con 1 ml de extracto a evaluar. Esta solución se llevó a “baño María” de 3 a 5 min a  $100^\circ\text{C}$  y después a choque térmico en agua fría por otros 5 minutos. Finalmente se centrifugó entre 25-30 min a 4.000-4.500 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante empleando celdas de plástico.

Para determinar la capacidad de reducción del ion  $\text{Cu}^{+2}$  se calculó la cantidad de sulfato de cobre consumido (reducido) en la solución analizada utilizando la curva de calibración y se relacionó este valor con la cantidad de gramos de extracto utilizado en la reacción aplicando la siguiente ecuación:

$$\textit{Capacidad de Reducción Cu}^{+2} = \frac{\textit{g CuSO}_4\textit{reducidos}}{\textit{g Extracto}} \textit{ (Ecuación 1.)}$$

Donde:

$$\textit{g CuSO}_4 \textit{reducidos} = \textit{g CuSO}_4\textit{inicial} - \textit{g CuSO}_4\textit{final}$$

$$\textit{g CuSO}_4\textit{final} = [\textit{CuSO}_4\textit{final}] * \textit{mL Sln total de reacción}$$

$$g \text{ Extracto} = ^\circ\text{Brix} * mL \text{ Extracto utilizados en la prueba Benedict}$$

$$= [g \text{ Extracto}/mL \text{ Sln}] * mL \text{ Extracto utilizados en la prueba Benedict}$$

El extracto vegetal que evidencie una mayor reducción en la concentración de sulfato de cobre fue utilizado como agente reductor en la síntesis de nanopartículas metálicas.

#### 4.1.2.4 Actividad 2.2. Selección y maximización de las condiciones de extracción.

Una vez seleccionada la técnica de extracción, se realizaron una serie de diseños experimentales a los residuos previamente escogidos con el fin de maximizar la respuesta de la capacidad de reducción. Inicialmente se realizó un diseño factorial cuyo propósito fue definir las variables más influyentes en la extracción de compuestos con efecto reductor para cada residuo, para posteriormente proceder a una maximización de extracción, la cual dependió del número de variables identificadas como las más influyentes en la reacción en el primer diseño.

**Diseño experimental.** Para la extracción de compuestos activos se realizaron dos diseños experimentales. Inicialmente se aplicó un diseño experimental factorial completo  $2^3$  con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la capacidad de reducción. Los factores o variables independientes evaluados fueron tiempo de extracción (*te*), relación o porcentaje sólido/solvente (%S/L) y pH. Las condiciones de extracción del diseño experimental para cada una de las variables se observan en la siguiente tabla:

#### **Tabla 1.**

Parámetros de extracción a evaluar en los diseños experimentales factoriales completos  $2^3$ , con su correspondiente nivel inferior y superior.

<b>Parámetro</b>	<b>Nivel Inferior</b>	<b>Nivel Superior</b>
<b>te [h]</b>	24	48
<b>% S/L [%p/v]</b>	5	30
<b>pH</b>	4	10

El procedimiento de fabricación del extracto se ejecutó igual que en la Actividad 2, pero la etapa de secado, después del pesado inicial, se modificó para que este procedimiento sea realizado en un horno convectivo marca LEM a 65°C por 24 h hasta obtener una humedad residual del 10% de la original, debido a que algunos estudios muestran que el aumento en la temperatura de secado puede mejorar la extracción de compuestos antioxidantes mientras se reduce el tiempo de secado previamente a temperatura ambiente (Chen et al., 2011b; da Silva et al., 2013b; Kankara et al., 2014b). Las pruebas fueron realizadas por triplicado para un total de 24 tratamientos, los cuales fueron filtrados y centrifugados por 30 min a 3.000 rpm. A estos extractos se les evaluó nuevamente a capacidad de reducción y, tras un análisis del diagrama de Pareto de efectos estandarizados, se determinaron las variables de mayor contribución para dicha característica. Tras la realización del primer diseño experimental, únicamente a las variables con diferencias estadísticamente significativas se les realizó un segundo diseño experimental con el cual se determinaron las condiciones a las cuales se obtiene el valor máximo de capacidad de reducción para cada residuo evaluado. Este segundo tipo de diseño se realizó debido a que, con el primer diseño, aunque se puede corroborar la significancia de las variables y en algunos casos se puede detectar curvatura del comportamiento de la respuesta, no es posible maximizar su resultado. El tipo de diseño experimental dependió de

la cantidad de variables a analizar nuevamente, desde un diseño de una única variable tipo Fibonacci, hasta un diseño central compuesto optimizado.

**Análisis estadístico de los datos.** Para la realización de las pruebas de significancia de cada uno de los tratamientos se analizaron las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza (gráficas de residuos) utilizando el programa estadístico MINITAB. Se infirió el nivel de confianza en el 95% y se realizó la prueba no-paramétrica de Mediana de Wood. Estos datos se analizaron mediante el diagrama de Pareto y las gráficas de efectos estandarizados para determinar la significancia de los parámetros evaluados sobre las variables de respuesta.

#### ***4.1.3 Actividad 3. Elección del extracto con propiedades reductoras***

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación de los dos métodos de extracción de cada residuo, y teniendo en cuenta el diseño experimental factorial, la maximización de esta respuesta y el análisis estadístico de los datos, se tomó como criterio de selección al extracto cuyo valor de capacidad de reducción fue el más alto respecto a los demás extractos evaluados.

## **4.2. Análisis y Discusión de Resultados**

### ***4.2.1 Actividad 1. Selección de Residuos Agroindustriales***

A partir de la información municipal de la actividad agrícola entregada por el MADR y publicada por Agronet, se elabora el ANEXO A, en el cual se pueden observar diecinueve (19) de los principales cultivos del departamento de Santander. Estos fueron seleccionados sobre otros cultivos al tener una producción mayor a las 20.000 ton anuales. Así mismo, se pueden identificar sus estados físicos de producción, desde su producto fresco en el caso de

las frutas, hortalizas y similares, hasta su producto procesado como el aceite crudo en el caso de la palma de aceite.

El siguiente componente por identificar es el tipo de residuo que puede obtenerse de cada uno de los cultivos identificados. El Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia define dos (2) tipos de residuos provenientes de actividades agrícolas, estos son llamados Residuo Agrícola de Cosecha (RAC) o Residuo Agrícola Industrial (RAI). Ejemplos de estos son los residuos de poda y los residuos del procesamiento de frutas y vegetales, respectivamente. La importancia de este estudio y sus semejantes radica en la identificación del Factor de Residuo (FR), el cual es la relación entre la cantidad de residuo sobre la cantidad de Producto Principal obtenido (Escalante Hernández et al., 2011). Debido al enfoque del presente trabajo se eligen los residuos identificados como RAI, por lo que son descartados los residuos de cebolla rama, tomate, guayaba y maíz (residuos tipo descarte y rastrojo, entre otros) cuyos residuos fueron identificados como RAC. La elección de la biomasa residual aprovechable depende fuertemente, entre otras cosas, de la facilidad de recolección y la oferta de éste; la biomasa residual, como materia prima, se debe encontrar en concentraciones y volúmenes considerables para permitir una recolección eficiente de éstos. Asimismo, aun cuando se cuenta con la amplia disponibilidad de los RAI de bagazo de caña panelera (5.244.936 Ton/anuales), cacota de cacao (517.657 Ton/anuales) y fibra de palma de aceite (239.305 Ton/anuales), se toma la decisión de no utilizar dichos residuos debido a que estos ya son ampliamente utilizados para otros fines de valoración como fertilizantes, fuentes de energía calórica, así como suplementos y aditivos alimenticios, entre otros (Balentic et al., 2018; fin et al., 2020; García-Culqui et al., 2023; Manrique Waldo, 2018; Ouattara et al., 2021). Por otra parte, pese al aparente y considerable volumen de residuos de aguacate

disponibles (20.271 Ton/anuales), debido a la dificultad de conseguirlo en los sitios de acopio designados, se decide no tenerlo en cuenta.

De esta manera, en el ANEXO B pueden identificarse los Factores de Residuo (FR) de los cultivos inicialmente seleccionados, al igual que las cantidades en toneladas que se disponen de éstos en orden descendente. Así mismo, a pesar de la cantidad que igualmente representan los residuos de cáscara de limón y cáscara de naranja entre los residuos identificados, se decide elegir a los residuos de cáscara de mandarina como representante de éste y los demás cítricos, debido a que se encuentra en mayor cantidad y a que sus compuestos extraídos pueden ser muy similares entre sí dadas las semejanzas entre ellos. Siendo así, expuestas las condiciones anteriores y su disponibilidad para el presente trabajo, en la Tabla 2 pueden observarse los residuos elegidos para la producción de extractos con capacidad antioxidante o de reducción, siendo la cáscara de mandarina (CM) el residuo que se encuentra en mayor cantidad con 70.564 Ton/anuales, seguido del residuo de cáscara de piña (CPI), plátano (CPL), y semilla de mora (SM) con 50.468, 13.237 y 8.034 Ton/anuales, respectivamente.

**Tabla 2.**

Residuos agroindustriales seleccionados y disponibles en el departamento de Santander para evaluar la capacidad antioxidante de sus extractos.

Cultivo	Tipo Residuo	F.R.I*	Cantidad [Ton]
<b>Mandarina</b>	<b>Cáscara</b>	0,5	70.564
<b>Piña</b>	<b>Cáscara</b>	0,13	50.468
<b>Plátano</b>	<b>Rechazo</b>	0,15	13.237

<b>Mora</b>	<b>Semilla</b>	0,25	8.034
-------------	----------------	------	-------

*Nota:* \*Factor de Residuo Agrícola Industrial. *Fuente:* Elaboración propia con las contribuciones de los trabajos de (Gómez Rueda & Parra Cepeda, 2013; Mejía González & Rondón Roa, 2013; Solano Hernández & Mendoza Jaimés, 2013).

Otros estudios, a pesar de las diferencias en algunas de las condiciones de extracción que estos realizaron, han identificado parte de los compuestos que podrían generar la actividad antioxidante o reductora en algunos de estos residuos. *Levaj et al.*, (2009) determinaron los flavonoides totales y algunos individuales en su estudio de los extractos de dos diferentes clases de cáscara de mandarina, identificando las moléculas de flavononas, como la hesperidina, narirutina y naringina en todos estos extractos, al igual que comprobaron la correlación lineal entre estas moléculas y la capacidad antioxidante según el método FRAP (*Levaj et al.*, 2009). *Ye et al.*, (2011) obtuvieron resultados similares al analizar 9 cultivos diferentes de mandarinas, encontrando que, aunque todos los extractos de estas contenían moléculas similares de flavonoides, como nobilentina y tangerentina, y ácidos fenólicos, las concentraciones de estos podían variar entre cultivos (*Ye et al.*, 2011). Por otra parte, *Passo Tsamo et al.*, (2015), realizaron estudios en 12 cultivos de plátano diferentes, en cuyos extractos de acetona/agua de la cáscara, identificaron a los flavonoles como compuestos antioxidantes fenólicos predominantes, siendo la rutina la molécula mayoritaria, encontrando igualmente amplia variabilidad entre los genotipos de esta planta (*Passo Tsamo et al.*, 2015). *Manthey & Jaitrong*, (2016) analizaron los extractos metanólicos de cáscara de plátano, obtenidos tras dos etapas de maceración, en los cuales identificaron cuatro clases principales de polifenoles, incluidos glucósidos de flavonol, dos grupos separados de hidroxicinamatos y proantocianidinas (*Manthey & Jaitrong*, 2016). En el caso de la cáscara de piña, *Li et al.*,

(2014) identificaron y cuantificaron los compuestos polifenólicos mayores en el extracto de cáscara de piña, obtenidos mediante reflujo con metanol, y determinaron la capacidad antioxidante de estas moléculas mediante los métodos de fosfomolibdeno y DPPH (T. Li et al., 2014). En este estudio, los autores identificaron las moléculas de ácido gálico, catequina, epicatequina, ferulicacida y ácido ferúlico y determinaron que todos revelan capacidad antioxidante mediante dichas metodologías. De forma análoga, *Lubaina et al.*, (2020) identificaron diferentes polifenoles en los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo, etanol y agua de la cáscara de piña mediante maceración, en donde determinaron la presencia de las moléculas de ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, miricetina, apigenina, entre otros, las cuales son ampliamente conocidas por sus capacidades antioxidantes (Lubaina et al., 2020). Finalmente, aunque no se encuentra mucha información respecto a los residuos de semilla de mora, *Zafra-Rojas et al.*, (2016), determinaron los polifenoles y las antocianinas totales, así como la actividad antioxidante por las metodologías ABTS y DPPH, de un residuo de mora compuesto por cáscara, semilla y pulpa, obtenido por maceración con ultrasonido (Zafra-Rojas et al., 2016). Los autores evidenciaron una fuerte correlación entre la actividad antioxidante por ABTS y la concentración de polifenoles y antocianinas totales, mientras que no hubo correlación entre la metodología DPPH y estos compuestos, debido a la presencia de otros compuestos antioxidantes que estarían interfiriendo. Por otra parte, en el estudio de *Mertz et al.*, (2009) los autores analizaron el extracto acuoso de fruta de mora identificando a los elagitaninos y antocianinas como los mayores compuestos fenólicos antioxidantes, siendo esta concentración significativamente mayor a otros extractos analizados en dicho trabajo (Mertz et al., 2009). Así mismo, aunque este extracto obtuvo la mayor capacidad antioxidante

aplicando el método ORAC, al igual que el mayor contenido de polifenoles totales, no se pudo establecer una correlación lineal entre estas características.

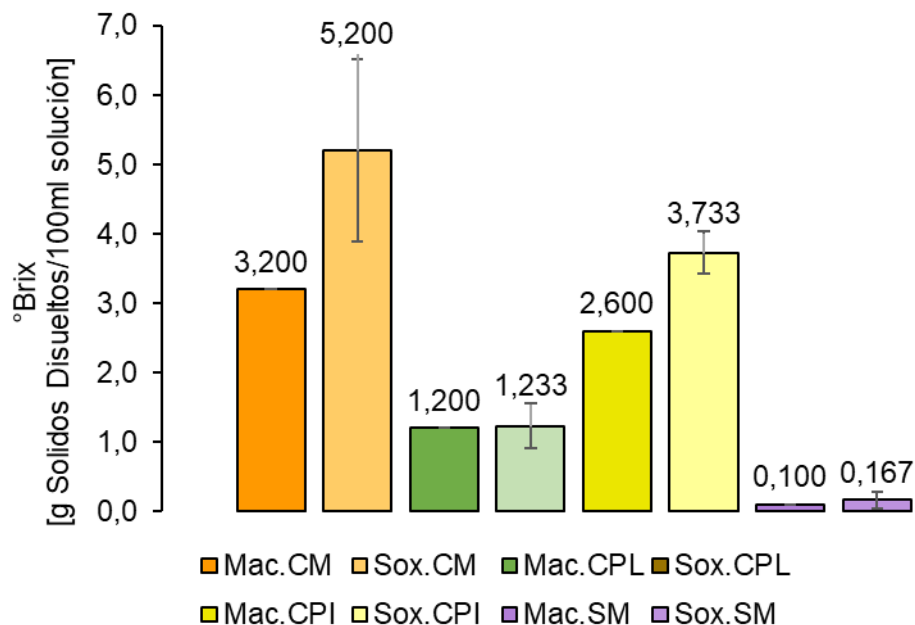
#### **4.2.2 Actividad 2. Producción de Extractos Vegetales a partir de Residuos Agroindustriales.**

##### **4.2.2.1 Actividad. 2.1. Selección de la técnica de extracción:**

En la Figura 2 se pueden observar los resultados obtenidos de la medición de sólidos totales disueltos, expresados como gramos de sólidos disueltos por 100 ml de solución en °Brix, de los extractos de cada residuo obtenidos a partir de las técnicas de maceración y soxhlet. En ésta se evidencia el bajo rendimiento de extracción del extracto de SM respecto a los demás extractos mediante ambas técnicas, siendo este extracto el que presenta el valor más bajo con un máximo de  $0,167 \pm 0,115$  °Brix mediante extracción soxhlet y de  $0,100 \pm 0,115$  °Brix mediante maceración. Por otro lado, se observa que los extractos de CPL, CPI y CM, obtenidos mediante soxhlet presentaron los mayores rendimientos de extracción de sólidos totales disueltos con  $1,233 \pm 0,321$ ,  $3,733 \pm 0,306$ , y  $5,200 \pm 1,311$  °Brix, respectivamente. No obstante, a pesar de estos resultados de rendimiento, esto no significa que la selectividad de estos compuestos sea dirigida a los compuestos reductores, por lo que se debió realizar la prueba de Benedict modificada con el fin de determinar dicha selectividad (Barchan et al., 2014b; Kothari et al., 2012b).

#### **Figura 2.**

°Brix de los extractos de cada residuo obtenido a partir de las técnicas de maceración (Mac.) y soxhlet (Sox.).



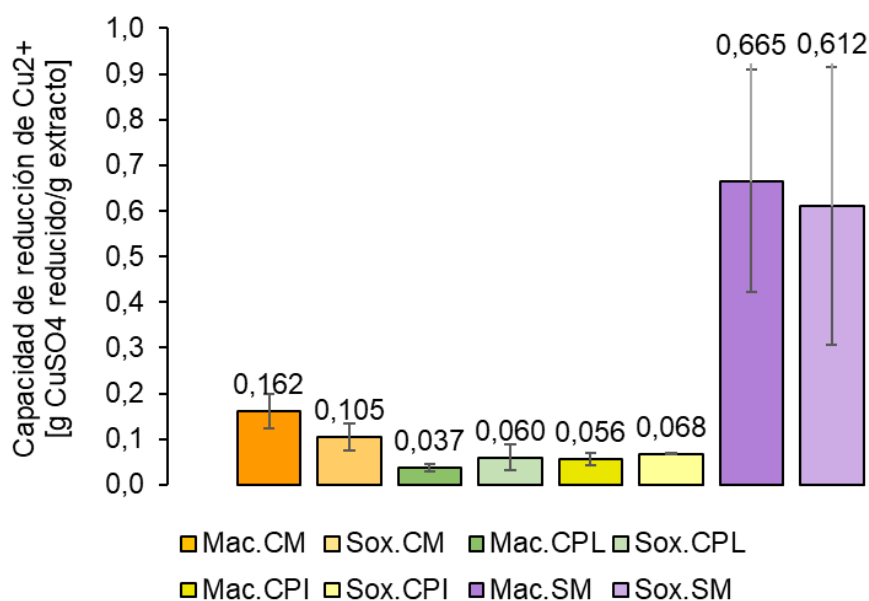
*Nota:* Siendo el residuo de cáscara de mandarina (CM), el residuo de cáscara de piña (CPI), el residuo de plátano (CPL), y el residuo de semilla de mora (SM). *Fuente:* Elaboración propia a partir de las contribuciones de Gómez G & Sampayo V (2020) (Gómez Gómez & Sampayo Velásquez, 2020).

En la Figura 3 se pueden observar los resultados obtenidos de la caracterización mediante la prueba de Benedict modificada de los extractos de cada uno de los residuos agroindustriales en función de las técnicas de maceración y soxhlet. Los resultados completos y la curva de calibración de dichas pruebas se encuentran en el ANEXO C. Así mismo, con el fin de confirmar las diferencias entre las técnicas de extracción de cada residuo, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. Debido a la reducida cantidad de datos recolectados en las pruebas (un punto triplicado), y al no lograr confirmar una distribución normal de los mismos, es necesario aplicar una prueba no-paramétrica (MINITAB, 2023b). De la misma forma, dada la diferencia entre las desviaciones estándar de algunos de los resultados, la prueba de la mediana de Mood es la que mejor representa los

datos respecto a otras pruebas no paramétricas (MINITAB, 2023e, 2023a). Los resultados de esta prueba estadística pueden observarse en el ANEXO D.

### Figura 3.

Capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  de los extractos de cada residuo obtenido a partir de las técnicas de maceración (Mac.) soxhlet (Sox.).



*Nota:* Siendo el residuo de cáscara de mandarina (CM), el residuo de cáscara de piña (CPI), el residuo de plátano (CPL), y el residuo de semilla de mora (SM). *Fuente:* Elaboración propia a partir de las contribuciones de Gómez G & Sampayo V (2020) (Gómez Gómez & Sampayo Velásquez, 2020).

En estas gráficas se puede evidenciar que la extracción por maceración (Mac.) fue la técnica que obtuvo los mayores resultados de capacidad de reducción de cobre en los residuos de Cáscara de Mandarina (CM) y de Semilla de Mora (SM) con  $0,162 \pm 0,037$  y  $0,665 \pm 0,244$  g  $\text{CuSO}_4$  reducido/g extracto, respectivamente. Por otro lado, la extracción por soxhlet (Sox.)

fue la técnica que obtuvo un mayor resultado en los residuos de Cáscara de Piña (CPI) y Cáscara de Plátano (CPL) con  $0,068 \pm 0,001$  y  $0,060 \pm 0,029$  g CuSO<sub>4</sub> reducido/g extracto, respectivamente. A pesar de su bajo rendimiento de extracción, cabe resaltar la notoria superioridad de la capacidad de reducción de cobre del extracto de la semilla de mora (SM) respecto a otros extractos, independientemente de la técnica de extracción utilizada, siendo esta capacidad en promedio entre 10 veces mayor que en el extracto de CPI o CPL, y 6 veces mayor que en el extracto de CM.

Lo anterior podría confirmar que bajo esas condiciones de extracción e indistintamente del proceso de extracción utilizado, el residuo de SM es capaz de reducir una mayor cantidad de cobre que los residuos de CM, CPL y CPI. Otros estudios también han demostrado que en diferentes partes de la misma planta pueden diferir la presencia y concentración de compuestos, y por consiguiente su efecto antioxidante (Dicko et al., 2011).

En la mayoría de los casos se observó una dispersión de los datos relativamente baja, sin embargo, se evidencia un mayor tamaño de estas barras de error en las extracciones de la SM, cuyo efecto puede deberse, entre otras cosas, a las bajas cantidades de sólidos disueltos obtenidos en estas extracciones y a la sensibilidad del equipo de medición ( $\pm 0,1^\circ$ Brix), las cuales afectan significativamente a la Ecuación 1 en los rangos de concentración de sólidos disueltos entre 0 y  $0,9^\circ$ Brix.

Según la literatura consultada, la presencia de compuestos y la cantidad de metabolitos vegetales puede variar, incluso, en plantas de una misma especie. Esta característica denominada como quimiotipo depende, entre otras razones, de las condiciones medioambientales y de cambios genéticos entre plantas y especies, por lo que la concentración de los compuestos antioxidantes en las mismas especies de plantas en distintos lugares podría

variar considerablemente, resaltando los estudios sobre las especies vegetales en diferentes partes del mundo (Polatoglu, 2013). Para el caso de la mandarina, tanto la revisión de *Shorbagi et al.*, (2022), como la de *Singh et al.*, (2020), confirman la presencia de compuestos antioxidantes fenólicos en los residuos de esta fruta y sus especies cítricas homólogas (Shorbagi et al., 2022; Singh et al., 2020). Por otra parte, trabajos como el de *Hossain & Rahman* (2011) confirmaron la presencia de compuestos antioxidantes como flavonoides totales en la pulpa de piña, así como *Saraswaty et al.*, (2017) hicieron lo mismo con la cáscara de esta misma fruta, en donde confirmaron la actividad antioxidante y reductora de sus extractos al identificar los azúcares reductores y el contenido fenólico total proveniente de éstos (Hossain & Rahman, 2011b; Saraswaty et al., 2017). En el caso del plátano y sus residuos, *Happi Emaga et al.*, (2007) evaluaron seis (6) diferentes especies de bananas y plátanos en tres (3) diferentes estados de maduración y concluyeron que su composición química no variaba considerablemente, encontrando azúcares y aminoácidos esenciales en cantidades significativas, mientras que el estudio de *Oduje et al.*, (2015) confirma la presencia de taninos, flavonoides y otros antioxidantes en estas mismas etapas de maduración de este residuo (Happi Emaga et al., 2007; Oduje et al., 2015). Todo lo anterior confirma los resultados encontrados en el presente estudio, así como la presencia de compuestos en los residuos agroindustriales de mandarina, plátano y piña evaluados, sin embargo, aunque existen diversos estudios que confirman la presencia de compuestos fenólicos, antocianinas, carotenoides y similares, en la fruta de mora, la información relacionada con la semilla de ésta es muy limitada, resaltando la importancia de este trabajo al evidenciar el efecto antioxidante de sus extractos (Kaume et al., 2012; J. Lee et al., 2012; Mertz et al., 2009).

Basados en los análisis estadísticos de la capacidad de reducción de los extractos, puesto que el *valor-p* para cada uno de los resultados de 0,41 es mayor que el nivel de significancia de 0,05, no se puede rechazar la hipótesis nula de que sus medianas son iguales y no hay evidencia de que haya una diferencia estadísticamente significativa entre las extracciones entre cada uno de los residuos. De esta manera, y aunque la técnica de soxhlet reduce significativamente los tiempos de extracción de compuestos (de 24 horas a 4 horas en promedio), se decide no utilizar esta técnica de extracción para las siguientes pruebas, siendo que tampoco se cuenta con información de los compuestos que pueden verse afectados por la temperatura empleada para la extracción (100°C); adicionalmente el gasto energético es mayor y el montaje de las pruebas es más complejo. El estudio realizado por *Fui Seung Chin et al.*, (2013) demostró que un incremento en la temperatura de 40 a 70°C debido a la extracción soxhlet, utilizando metanol y diclorometano como solventes, disminuyó significativamente la concentración de polifenoles y alcaloides totales, compuestos antioxidantes en la hoja de té negro Sabah (variedad *Assamica*), recomendando la aplicación de temperaturas menores a 40°C aplicando métodos de extracción directas (*Fui Seung Chin et al.*, 2013). Por otra parte, el trabajo realizado por *Durdun et al.*, (2017) evidenció resultados similares a los presentados en este trabajo en donde, aunque el valor promedio del contenido de flavonoides en plantas de escaramujo, espino amarillo y espino blanco fue mayor en la extracción por maceración respecto a la extracción soxhlet, utilizando etanol (60% v/v) como solvente, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre éstas para la determinación del contenido fenólico total (*Durdun et al.*, 2017). En concordancia, *Jovanović et al.*, (2017) no encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la extracción etanólica de flavonoides por maceración y maceración por calentamiento en *Thymus serpyllum*; sin

embargo, sí encontraron beneficioso la aplicación de temperatura para la extracción de polifenoles totales en esta misma planta (Jovanović et al., 2017). Estos resultados hacen prever que distintos tipos de métodos o técnicas deben ser aplicadas al proceso de extracción en función a los compuestos de interés, así como de la planta y sus partes a evaluar.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la revisión bibliográfica, las ventajas prácticas y económicas de la maceración, y puesto que las condiciones de operación de esta técnica se pueden modificar con mayor facilidad, se decide seleccionar esta técnica como método de extracción para todos los residuos y experimentos posteriores.

#### **4.2.2.2 Actividad 2.2.** Selección y maximización de las condiciones de extracción

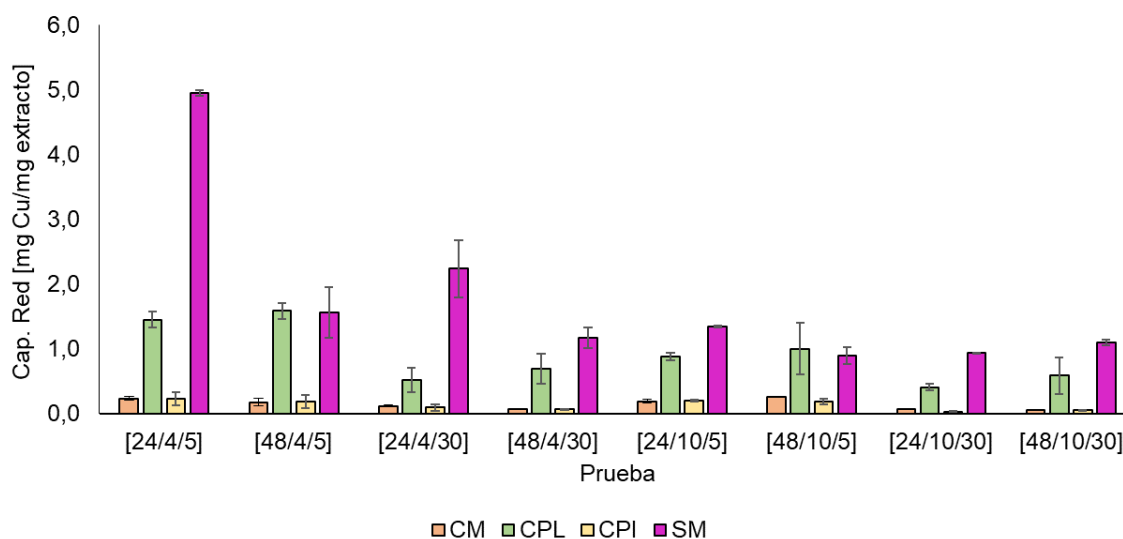
Teniendo en cuenta su reducido costo de extracción, facilidad y que no se desea comprometer la integridad de los compuestos antioxidantes con la aplicación de temperaturas altas, se utilizó como método de extracción la maceración en agua, sin agitación, a temperatura ambiente (28°C), aplicando el diseño experimental  $2^3$  propuesto en la metodología.

En la Figura 4 se puede observar la respuesta de los extractos de los residuos en la capacidad de reducción aplicando el diseño factorial. Para estos resultados se evidencia una clara diferencia en las capacidades de reducción de los extractos, en donde el valor más alto de esta característica para el extracto de SM fue  $4,95 \pm 0,05$  mg Cu reducido por mg extracto utilizado, seguido del extracto de CPL, CM y CPI, con valores de  $1,59 \pm 0,12$ ,  $0,26 \pm 0,01$  y  $0,24 \pm 0,10$ , respectivamente. Aunque todos estos resultados se dieron a un pH ácido de 4, se evidencia que en la mayoría de los casos no se comparten todos los parámetros de extracción, siendo que el valor máximo de capacidad de reducción para SM y CPI se obtuvo a [24 h – 5% S/L], mientras que para el extracto de CPL y CM se obtuvieron a [48 h – 5% S/L] y [48 h –

30% S/L], respectivamente. Se observa que, independientemente de la condición de extracción, los extractos de SM y de CPL son claramente superiores a los extractos de CM y de CPI en términos de la capacidad reductora, siendo estos últimos los que obtuvieron los menores resultados en todas las pruebas. En términos generales, se observa que la capacidad de reducción del extracto de SM es más del doble del extracto de CPL, el segundo extracto con mayores capacidades de reducción en sus diferentes parámetros evaluados.

#### Figura 4.

Capacidad de reducción de cada residuo agroindustrial según la condición de extracción dado el diseño factorial.



*Nota:* Siendo el residuo de cáscara de mandarina (CM), el residuo de cáscara de piña (CPI), el residuo de plátano (CPL), y el residuo de semilla de mora (SM). Las condiciones de extracción son representadas por [Tiempo de extracción / pH / %Sólido/Líquido]. *Fuente:* Elaboración propia con contribuciones de Montoya Salas, (2023).

Tras la aplicación del diseño factorial, se procede con la verificación estadística de los datos con el fin de realizar un análisis de varianza adecuado. En el ANEXO E se pueden observar las gráficas de probabilidad normal y de residuos de los resultados, con las cuales se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia de los datos. En todas las pruebas los datos muestran distribuciones aproximadamente normales y cumplen con los supuestos de varianza constante e independencia, permitiendo proceder con el análisis del diseño factorial.

Realizada la verificación de los datos, se procedió a determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la Capacidad de reducción. En el ANEXO F puede observarse el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para cada extracto, los cuales muestran la magnitud e importancia de los efectos que tiene cada variable en la respuesta. Para el caso de CM, se observa que las variables que tienen un efecto significativo son el % S/L y la interacción entre  $t_e$  y pH. No obstante, debido a la diferencia en amplitud de estas variables, siendo la variable % S/L significativamente más alta que  $t_e * pH$ , se consideró utilizar únicamente % S/L para la prueba de maximización. En el caso de CPL, los efectos principales % S/L y pH, y la interacción % S/L \* pH, obtuvieron resultados estadísticamente mayores que las demás variables. De manera similar al extracto de CM, en el extracto de CPI se evidencia que la variable que tiene un mayor efecto sobre la capacidad reductora es el efecto de % S/L. El extracto de SM, a diferencia de los demás extractos, mostró que todas las variables (efectos principales e interacciones) tienen un efecto significativo en la respuesta. En la siguiente tabla se puede observar un resumen de los resultados anteriores:

**Tabla 3.**

Resultados estadísticamente significativos de los efectos principales e interacciones en la capacidad reductora de los extractos.

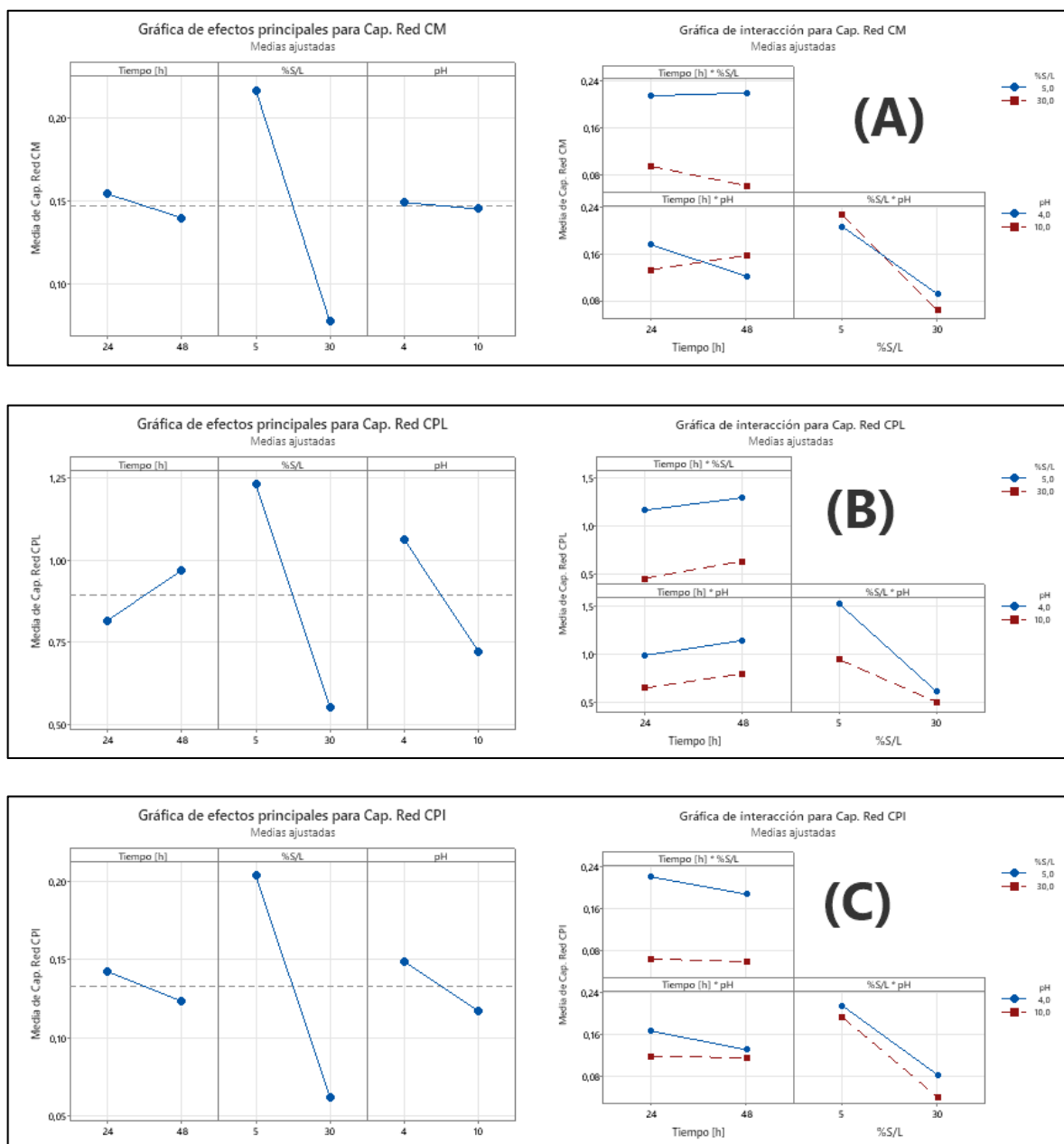
Término	Parámetro	Efecto (Estadísticamente significativo)			
		CM	CPL	CPI	SM
A	$t_e$				✓
B	% S/L	✓	✓	✓	✓
C	pH		✓		✓
AB	$t_e * \% S/L$				✓
AC	$t_e * pH$	✓			✓
BC	$\% S/L * pH$		✓		✓
ABC	$t_e * \% S/L * pH$				✓

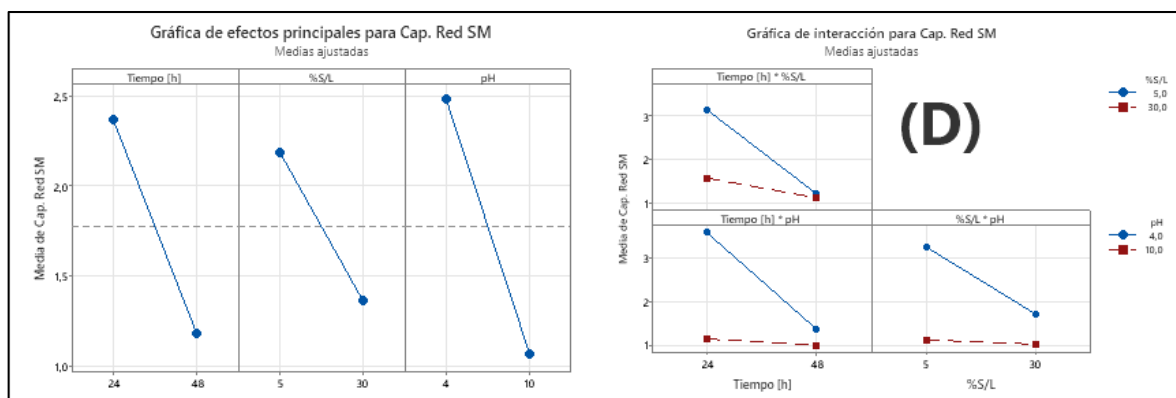
*Nota:* (✓) Efecto significativo. *Fuente:* Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).

Los efectos principales y sus interacciones en la capacidad de reducción de  $Cu^{+2}$  se pueden observar en la Figura 5, en cuyos ejes horizontales se ubican los niveles del factor y en los ejes verticales se encuentra la media de la respuesta observada en los correspondientes niveles evaluados. Dados los análisis previos del diagrama de Pareto, únicamente se analizaron las variables cuyos efectos fueron estadísticamente significativos para las posteriores maximizaciones de la capacidad de reducción de los extractos.

Figura 5.

Gráficas de efectos principales y de interacciones para la capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  en cada extracto obtenido.





Nota: (A) CM, (B) CPL, (C) CPI y (D) SM. Fuente: Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).

En la figura anterior se observa que en todos los extractos hay una fuerte disminución de la capacidad de reducción al aumentar la relación %S/L, cuyo efecto puede deberse a que la disminución de la cantidad del material vegetal en la solución aumenta el gradiente de concentración, lo que facilita la difusión de los compuestos del sólido al solvente (Durdun et al., 2017). Este efecto es más característico para el extracto de CM y el de CPI, representados en la Figura 5 (A) y (C), respectivamente. Se puede evidenciar que, dada la significancia estadística y el grado de inclinación de la pendiente del efecto de la relación %S/L en estos dos extractos, éste es considerado como el único factor significativo que afecta a la capacidad de reducción de CM y de CPI. Para el caso de CM, aunque se observa que hay significancia en la interacción entre  $t_e$  y pH, se observa que la magnitud del efecto principal %S/L es mucho mayor y se decide solo tener en cuenta esta variable para la maximización de la capacidad de reducción. De manera general, sólo se interpretan los efectos principales de aquellos factores que no interactúan con ningún otro, como es en este caso la relación %S/L en el extracto de CPI, en donde las pendientes de sus interacciones son prácticamente paralelas entre ellas y no ejercen ningún efecto (Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

Resultados similares se encontraron en otros trabajos como el de *Tay et al.*, (2014) donde evaluaron distintas relaciones de sólido/solvente observando que la extracción etanólica de polifenoles totales en *Aquilaria crassna* aumenta a medida que disminuye la cantidad de material vegetal, con una relación S/L óptima de 1:60 [%p/v] (Tay et al., 2014). De manera similar, *Ćujić et al.*, (2016) observaron que los rendimientos de extracción etanólica de polifenoles totales en *Aronia melanocarpa* aumentaron a medida que disminuía la relación S/L hasta un óptimo de 1:30 [%p/v]; sin embargo, en el caso de antocianinas totales, comprobaron el aumento del rendimiento de extracción al disminuir la relación S/L de 1:10 a 1:20 [%p/v], observando una disminución de estos al llegar a una relación de 1:30 [%p/v] (Ćujić et al., 2016). *Durdun et al.*, (2017) concluyeron que, en el caso de los extractos etanólicos de escaramujo y espinillo amarillo y blanco obtenidos mediante maceración con agitación, las propiedades antioxidantes dependen del material vegetal utilizado y su relación S/L, siendo la relación 1/10 [%p/p] más favorable para la extracción de compuestos fenólicos, y la relación 1/5 [%p/p] más favorable para la extracción de flavonoides (Durdun et al., 2017). *Jovanović et al.*, (2017) evidenciaron que a medida que aumentaba la cantidad de material vegetal, disminuía la concentración de polifenoles totales sugiriendo que este efecto se debía principalmente al aumento de la viscosidad, la cual disminuye la difusión de los compuestos al solvente, al igual que al aumentar la cantidad de sólidos acarrea una rápida y mayor saturación del medio (Jovanović et al., 2017). Cuando se dispone de la suficiente cantidad de solvente se promueve la transferencia de masa y la difusión de los metabolitos secundarios de las plantas, así como se previene la saturación del medio y se incrementan los rendimientos de extracción. No obstante, la relación S/L óptima debe evaluarse en función de los compuestos o característica de interés, dado que cada uno de éstos necesita de condiciones

específicas y un exceso de solvente o una falta de material vegetal genera una disminución en los rendimientos de extracción.

En la Figura 5 (B) relacionada con el extracto de CPL, además del efecto significativo de la variable %S/L, se observa el efecto del pH, en donde al disminuir esta variable también aumenta el efecto reductor del extracto. De igual manera, se encuentra significancia estadística en la interacción entre estos factores %S/L y pH, por lo que se decide tener en cuenta estos mismos para las siguientes pruebas de maximización. De acuerdo con la literatura, el efecto del pH puede ser variado, ya que éste va a depender de la planta a utilizar, el compuesto de interés y de la prueba reductora a aplicar. Este efecto es debido a que la hidrólisis necesaria para romper los enlaces glicosídicos o estrés de la pared celular puede ser realizada tanto en medio ácido o en medio básico con el fin de aumentar la selectividad de extracción y aumentar su rendimiento (Attard et al., 2022). En el estudio de maceración de Attard et al., (2022) obtuvieron diferentes resultados para la prueba reductora DPPH y CUPRAC en diferentes extractos de oliva, en donde la hidrólisis alcalina con NaOH fue mejor que la hidrólisis ácida mediante HCl en la prueba DPPH, mientras que para CUPRAC no hubo diferencias significativas entre ambos procesos (Attard et al., 2022). En el trabajo de Devi et al., (2022) en los extractos acuosos obtenidos mediante maceración de *Asparagus Racemosus Wild*, se observó que para el contenido total de fenoles y flavonoides el valor óptimo de extracción se encuentra a pH 9, mientras que la actividad antioxidante muestra un valor óptimo en pH 2 (Devi et al., 2022). En la revisión de Chaves et al., (2020), estos exponen que existen diferentes pH óptimos de extracción para ciertos compuestos antioxidantes como los flavonoides, debido a la amplia variedad de moléculas que estos representan. Los autores sugieren que la recuperación de estos compuestos a pH básico es más eficiente debido a este

remueve la barrera física del material vegetal creada por la lignina, dañando la estructura celular, incrementando así la accesibilidad del solvente a los compuestos dentro de las células (Chaves et al., 2020). A pesar de esto, los mismos autores manifiestan que para otros compuestos el pH ácido promueve la estabilidad de su estructura química. Efectos similares al presente estudio fueron obtenidos en el trabajo de *Zapata et al.*, (2019) en los extractos acuosos, obtenidos mediante decocción a 80°C de la planta *Vaccinium meridionale Swartz*, donde evidenciaron una disminución entre el 54 y 51% de los valores de capacidad reductora en pH alcalino mediante las pruebas DPPH y ORAC, respectivamente (Zapata et al., 2019). Sin embargo, se observó que estos valores no se vieron significativamente alterados a pH ácido y neutro. Los autores de este trabajo atribuyeron este efecto a la degradación de las antocianinas, moléculas presentes en la mora a las cuales se les atribuye estas propiedades antioxidantes, donde a valores de pH mayores a 6, se encontró que la estructura de estos compuestos varía con el pH, siendo ésta más estable a pH ácido. De manera similar, *Ruenroengklin et al.*, (2018) hallaron que, a pH entre 3 y 4, se encontraron los mayores rendimientos de extracción de antocianinas en *Litchi chinensis Sonn*, al igual que valores relativamente altos en la capacidad de reducción de sus extractos (Ruenroengklin et al., 2008).

Los resultados de estos últimos estudios son congruentes con los del presente trabajo, donde, al observar la Figura 5 (D) relacionada con el extracto de SM, y teniendo en cuenta que uno de los compuestos mayoritarios de esta fruta y sus residuos son las antocianinas, se evidencia un fuerte efecto negativo en la capacidad de reducción de este extracto al aumentar el pH, con 2,5 mg Cu reducido por mg de extracto de SM utilizado a pH 4 hasta verse disminuido a 1,0 mg Cu reducido por mg de extracto de SM a pH 10, lo que indica una disminución del 40% de su efecto reductor (Garzón et al., 2009; Grande-Tovar et al., 2020; J.

Lee et al., 2012). Adicionalmente, el análisis estadístico para el caso de SM reveló que ésta y las demás variables evaluadas, al igual que sus interacciones, son estadísticamente significativas.

Tal como se observa en la Figura 5 de manera general, la influencia del tiempo como variable dependió, en magnitud, significancia y dirección, del extracto evaluado, siendo este significativo únicamente para el extracto de SM. *Ćujić et al.*, (2016) observaron que en la extracción etanólica de polifenoles totales en *Aronia melanocarpa*, y analizando la concentración de polifenoles totales a diferentes tiempos llegando hasta las 18 horas, tras 90 minutos de extracción por maceración con agitación no había diferencias estadísticamente significativas en la concentración de dichos compuestos (*Ćujić et al.*, 2016). El efecto negativo del tiempo en el extracto de SM podría relacionarse al periodo prolongado al cual el material vegetal está expuesto al pH alcalino que, como se vio en otros trabajos, requiere de un pH ácido para una extracción eficiente y evitar la degradación de antocianinas, reduciendo el efecto antioxidante del extracto (Fossen et al., 1998).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y la revisión bibliográfica, se decide seleccionar los factores de extracción a evaluar para los experimentos de maximización de capacidad de reducción que se encuentran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.**

Factores de mayor contribución con diferencias estadísticamente significativas seleccionados para los siguientes diseños experimentales de maximización de capacidad de reducción para todos los residuos evaluados.

---

**Extracto vegetal**

---

<b>Parámetro a maximizar</b>	<b>CM</b>	<b>CPI</b>	<b>CPL</b>	<b>SM</b>
<b>t<sub>e</sub> [h]</b>	24	24	24	✓
<b>% S/L [%p/v]</b>	✓	✓	✓	✓
<b>pH</b>	4	4	✓	4

*Nota:* Siendo el residuo de cáscara de mandarina (CM), el residuo de cáscara de piña (CPI), el residuo de plátano (CPL), y el residuo de semilla de mora (SM). *Fuente:* Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).

Tal como se observa en la Tabla 4, en las variables que no fueron estadísticamente significativas, como lo son t<sub>e</sub> y pH para los extractos de CM y CPI, fueron seleccionados las menores magnitudes de estos parámetros dadas sus facilidades operacionales (24 h y pH 4). Así mismo, en esta tabla se evidencia que el extracto de CM y el extracto de CPI dependen de un único factor (% S/L), mientras que el extracto de CPL y el extracto de SM dependen de dos factores. De esta forma, para las variables que depende de un único factor (CM y CPI), fue aplicado un diseño experimental utilizando la secuencia de Fibonacci (1, 2, 3, 5, 8, 13, 21), debido a que esta secuencia mantiene una proporción que se observa en varios fenómenos en la naturaleza, geometría y matemática. Para los extractos que dependen de dos o más factores (CPL y SM), se aplicó un diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto, utilizado ampliamente para refinar modelos después de determinar los factores relevantes en un experimento (MINITAB, 2023d; Omotehinwa & Ramon, 2013). Siendo así, las condiciones de extracción del diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto para el extracto de CPL y el extracto de SM dadas sus variables significativas se observan en la siguiente tabla:

**Tabla 5.**

Niveles y parámetros de extracción del diseño central compuesto para los extractos de CPL y SM.

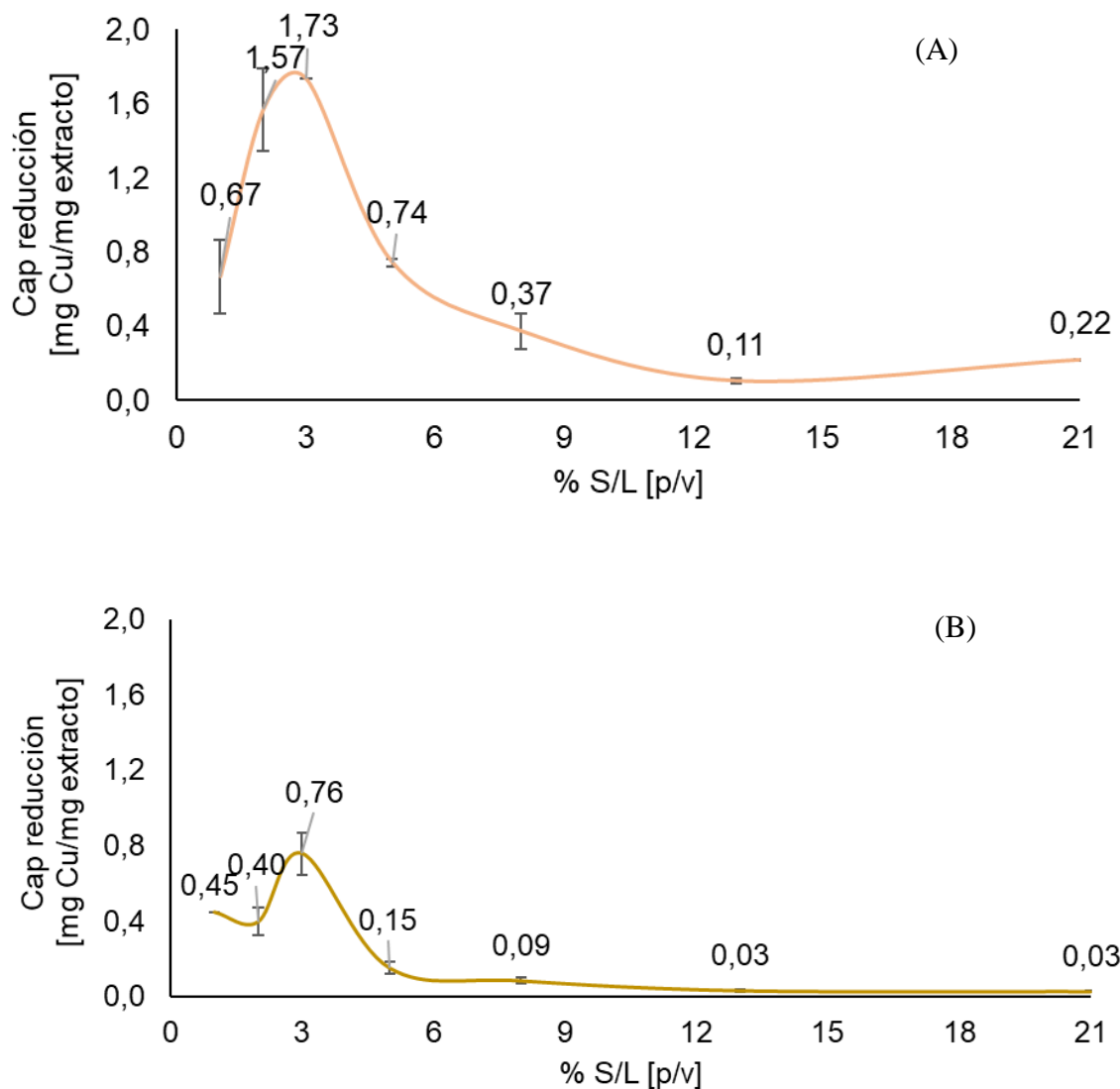
<b>Parámetro</b>	<b>Extracto CPL</b>		<b>Extracto SM</b>	
	<b>Nivel Inferior</b>	<b>Nivel Superior</b>	<b>Nivel Inferior</b>	<b>Nivel Superior</b>
<b>t<sub>e</sub> [h]</b>	-	-	12	36
<b>% S/L [%p/v]</b>	2	10	2	8
<b>pH</b>	3	5	-	-

*Nota:* Siendo el residuo de plátano (CPL), y el residuo de semilla de mora (SM).

Los resultados de este segundo diseño experimental pueden observarse en la Figura 6, la cual representa la gráfica de la maximización de capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  con la secuencia Fibonacci dada a los extractos de CM y CPI, mientras que en las Tablas 6 y 7, se encuentran los resultados del diseño experimental central compuesto para los extractos de CPL y SM, respectivamente. En el ANEXO G y H se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para las maximizaciones de los extractos de CPL y SM, respectivamente. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental central compuesto e igualmente se evidenció que todas las variables tienen un efecto estadísticamente significativo.

**Figura 6.**

Graficas de maximización de la capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  para los extractos de (A) CM y (B) CPI utilizando la secuencia de Fibonacci a un tiempo de 24 h y pH 4.



*Nota:* Siendo el residuo de cáscara de mandarina (CM) y el residuo de cáscara de piña (CPI).

Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar.

En la Figura 6 se puede observar que la capacidad de reducción de ambos extractos tiene un comportamiento similar, en el que se evidencia un crecimiento inicial hasta llegar a un valor máximo en la relación S/L alrededor de 3 % p/v para después decrecer hasta valores mínimos. Sin embargo, a pesar de que los residuos de CM y CPI comparten las mismas condiciones para maximizar la capacidad de reducción a pH 4, tiempo de extracción de 24 horas y %S/L de 3, sus valores máximos difieren, siendo la capacidad reductora del extracto de CM superior al extracto de CPI con  $1,73 \pm 0,00$  y  $0,76 \pm 0,11$  mg de Cu reducidos por mg de extracto utilizado, respectivamente. Este comportamiento identificado en ambos extractos podría evidenciar que, dada la ecuación de capacidad de reducción (Ecuación 1), aunque se puedan extraer más compuestos antioxidantes del material vegetal, éstos no tienen la capacidad suficiente para seguir reduciendo más cantidad de cobre en solución, haciendo que la gráfica decaiga al aumentar el material vegetal a tratar. Al observar la diferencia entre los valores máximos de cada extracto, es evidente que la eficiencia de la reacción dependerá de la cantidad y de las propiedades o capacidades reductoras de los compuestos que se extraigan de cada material vegetal.

Por otra parte, en la Tabla 6 pueden observarse los resultados del diseño experimental central compuesto para el extracto de CPL. En esta tabla, el mayor resultado de capacidad reductora para este extracto es de  $1,82 \pm 0,12$  mg Cu reducido por mg de extracto, obtenido tras 24 horas, a pH 3 y % S/L de 2 %p/v. Así mismo, como se evidencia en la Tabla 7, en donde se observan los resultados del diseño experimental central compuesto para el extracto de SM, el mayor resultado de capacidad reductora para este extracto es de  $3,06 \pm 0,06$  mg Cu reducido por mg de extracto, obtenido tras 12 horas, a pH 4 y % S/L de 2 %p/v.

**Tabla 6.**

Condiciones de extracción generadas y resultados del diseño experimental central compuesto para el extracto de CPL a un tiempo fijo de 24 horas.

<b>pH</b>	<b>S/L [%p/v]</b>	<b>Capacidad reductora* <math>\pm</math> Desv. Est</b>
<b>3</b>	2	1,82 $\pm$ 0,12
<b>3</b>	6	1,06 $\pm$ 0,07
<b>3</b>	10	0,76 $\pm$ 0,01
<b>4</b>	2	1,48 $\pm$ 0,04
<b>4</b>	6	0,99 $\pm$ 0,04
<b>4</b>	10	0,63 $\pm$ 0,02
<b>5</b>	2	1,44 $\pm$ 0,07
<b>5</b>	6	1,06 $\pm$ 0,02
<b>5</b>	10	0,66 $\pm$ 0,03

*Nota:* Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar. \*Las unidades de capacidad de reducción están dadas en [mg Cu reducido/mg extracto].

**Tabla 7.**

Condiciones de extracción generadas y resultados del diseño experimental central compuesto para el extracto de SM.

<b>t<sub>e</sub> [h]</b>	<b>S/L [%p/v]</b>	<b>Capacidad reductora* ± Desv. Est</b>
<b>7,02</b>	5	2,97 ± 0,03
<b>12</b>	2	3,06 ± 0,06
<b>12</b>	8	1,68 ± 0,05
<b>24</b>	0.76	2,35 ± 0,05
<b>24</b>	5	1,56 ± 0,02
<b>24</b>	9.24	1,32 ± 0,02
<b>36</b>	2	1,70 ± 0,09

*Nota:* Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar. \*Las unidades de capacidad de reducción están dadas en [mg Cu reducido/mg extracto]. *Fuente:* (Montoya Salas, 2023).

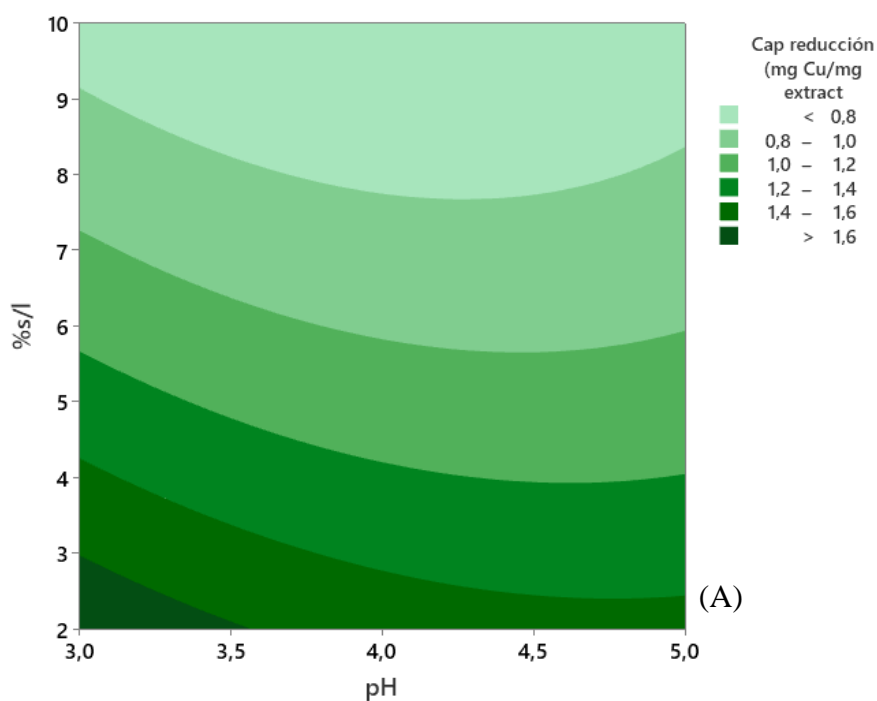
Basados en los resultados anteriores, se desarrollaron modelos matemáticos que ayudaron en la predicción de la capacidad reductora de los extractos de CPL y SM en los rangos de condiciones evaluadas. Estos modelos se pueden observar en el ANEXO I y J, junto a sus respectivos R<sup>2</sup>, para los extractos de CPL y SM, respectivamente. Como se observa en la tabla 7, y dado el potencial que se evidenció en el extracto de SM, se agregaron puntos axiales al diseño central compuesto de este extracto que ayudaron a complementar y robustecer su modelo.

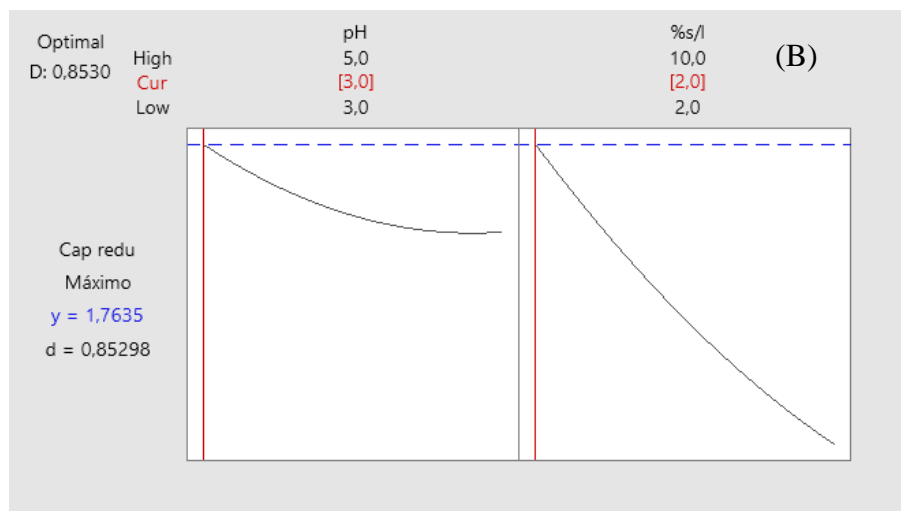
Debido a que la capacidad de reducción de los extractos de CPL y SM dependen de dos o más factores, las gráficas que ayudan al análisis del modelo matemático de maximización de esta característica no son en dos dimensiones, sino que son en tres o más, y

deben representarse mediante una gráfica de contorno o de superficie. De esta manera, en las Figuras 7 y 8, se encuentran las gráficas de contorno y optimización de respuesta de los resultados de los diseños experimentales centrales compuestos para los extractos de CPL y SM, respectivamente.

### Figura 7.

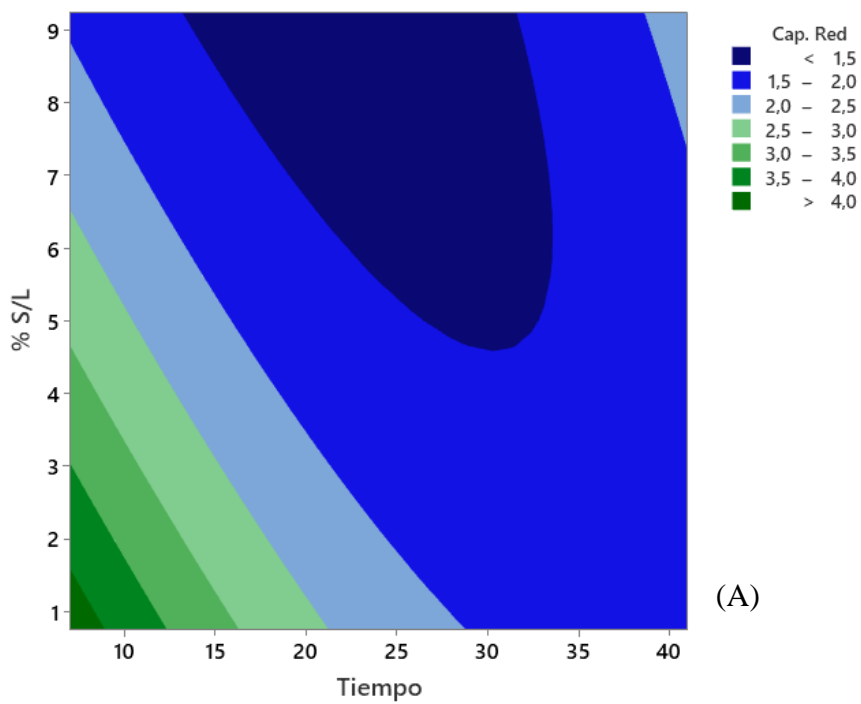
Graficas de (A) Contorno y (B) Optimización para la maximización de la capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  para el extracto de CPL, utilizando un diseño experimental central compuesto.

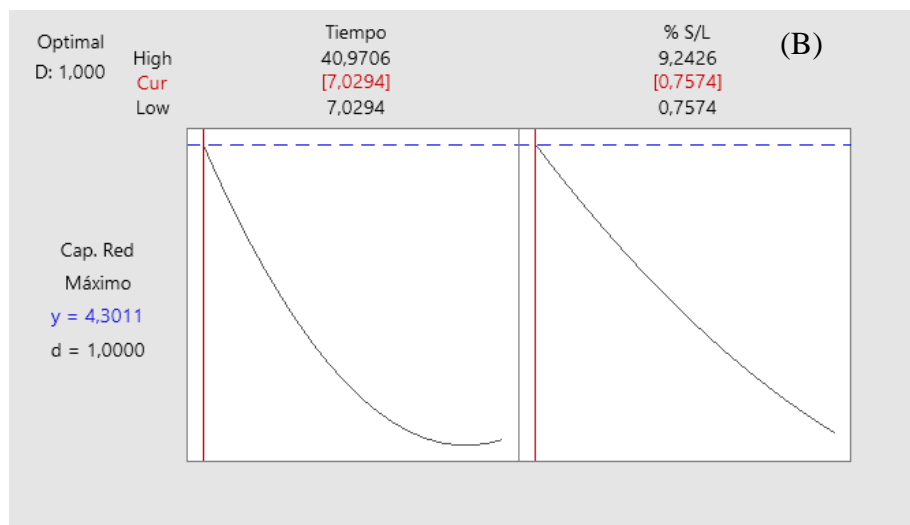




**Figura 8.**

Graficas de (A) Contorno y (B) Optimización para la maximización de la capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  para el extracto de SM, utilizando un diseño experimental central compuesto.





*Fuente:* Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).

En las Figuras 7 (A) y 8 (A), se observan las gráficas de contorno de la maximización para los extractos de CPL y SM, respectivamente. En estas gráficas, las regiones más oscuras de color verde indican capacidades de reducción más altas, mientras que los colores verdes claros y azules representan los valores más bajos para esta misma respuesta. En ambos extractos, tal y como se ha venido observando en experimentos previos, se evidencia que al disminuir las variables %SL y pH aumenta el efecto de la capacidad de reducción, siendo el caso más significativo el del extracto de SM el cual al disminuir el %S/L y el pH llega a valores superiores a 4,0 mg de Cu reducidos por mg extracto, mientras que el extracto de CPL, al disminuir el pH y el tiempo llega a valores superiores a 1,6 mg Cu reducidos por mg extracto. De manera similar, al observar las gráficas de optimización de respuesta en las Figura 7 (B) y en la Figura 8 (B), la herramienta de optimización predice que la capacidad reductora máxima que se puede obtener con un nivel de confianza del 95% con los parámetros evaluados dentro de los valores establecidos es de 1,76 mg de Cu reducidos por mg de extracto de CPL a un tiempo de 24 horas, pH de 3 y un % S/L de 2, mientras que, por otra parte, se

pueden obtener 4,30 mg de Cu reducidos por mg de extracto de SM a un pH de 3, tiempo de 7 horas y un % S/L de 0,75. Estos valores predichos fueron comparados con sus valores experimentales, los cuales pueden observarse en la siguiente tabla:

**Tabla 8.**

Comparación de valores experimentales y su correspondiente predicción de la maximización de la capacidad de reducción de Cu.

<b>Extracto</b>	<b>Predicción*</b>	<b>Experimental* ± Desv.</b>	<b>%Desviación</b>
	<b>(I.C)**</b>	<b>Est</b>	<b>teórico/experimental</b>
<b>CPL</b>	1,76 (1,68;1,84)	1,82 ± 0,12	3,40 %
<b>SM</b>	4,30 (4,21;4,39)	4,20 ± 0,11	2,32 %

*Nota:* \*Las unidades de capacidad de reducción están dadas en [mg Cu reducido/mg extracto]. \*\* Intervalo de Confianza del 95%. *Fuente:* Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).

En ambos casos se observa que, al aplicar las condiciones de extracción para cada uno de estos residuos, sus valores experimentales se encuentran en el intervalo de confianza establecido (95%) corroborando la veracidad de los modelos, evidenciando un porcentaje de error entre el valor de los modelos predictivos y experimentales de 3,40% y 2,32% para CPL y SM, respectivamente. Al igual que en los experimentos previos, se observa una clara superioridad de la capacidad de reducción del extracto de SM respecto a los otros extractos, alcanzando valores de  $4,20 \pm 0,11$  mg Cu reducido/mg extracto utilizado.

### 4.3. Conclusiones

Con base en los efectos estadísticamente significativos de los parámetros y las condiciones evaluadas, se establece que el extracto de semilla de mora (SM), obtenido por la técnica de maceración a pH 3, tiempo de extracción de 7 horas y una relación Sólido/Líquido de 0,75 % p/v, como el extracto cuya capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  es superior a los otros extractos de residuos analizados, tras obtener  $4,20 \pm 0,11$  mg de Cu reducidos por mg de extracto utilizado, siendo este valor 2.5 veces más alto que la máxima capacidad reductora del extracto de CPL y CM, y casi 6 veces más alto que la máxima capacidad reductora del extracto de CPI. Por lo anterior, y teniendo en cuenta las condiciones de extracción establecidas, el extracto de semilla de mora (SM) fue utilizado como agente reductor en la síntesis de nanopartículas metálicas en el capítulo posterior.

## CAPITULO II

### 5. Síntesis de nanopartículas metálicas de cobre, plata y bimetalicas de cobre/plata

En este capítulo se presenta la síntesis y caracterización de nanopartículas (Nps) metálicas de cobre (CuNps), plata (AgNps) y bimetalicas de cobre/plata (CuAgNps), utilizando el extracto vegetal de semilla de mora obtenido de residuos agroindustriales como agente reductor. La metodología aplicada integra un diseño experimental factorial fraccionado para identificar las condiciones de reacción que influyen significativamente en la formación de nanopartículas, evaluando variables clave como la concentración de la sal metálica precursora, la proporción del extracto vegetal, el pH y el tiempo de reacción.

El análisis de las soluciones coloidales generadas se llevó a cabo mediante métodos colorimétricos y espectrofotométricos, donde los cambios de coloración en las soluciones y los espectros UV-Vis proporcionaron evidencia inicial de la formación de nanopartículas. Además, se implementaron otras técnicas de caracterización como DLS, para la determinación del tamaño hidrodinámico, la distribución de tamaños y la estabilidad coloidal, y técnicas de microscopia SEM combinada con EDX para caracterizar las propiedades morfológicas y composicionales de las nanopartículas.

Este capítulo también incluye el desarrollo de modelos matemáticos utilizando un software estadístico, que describen la relación entre las condiciones de síntesis y las propiedades de las nanopartículas. Los modelos permitieron determinar las condiciones de reacción que favorecen una mayor formación de nanopartículas con menores tamaños. Finalmente, se evaluó la estabilidad coloidal de las soluciones tras 30 días de almacenamiento.

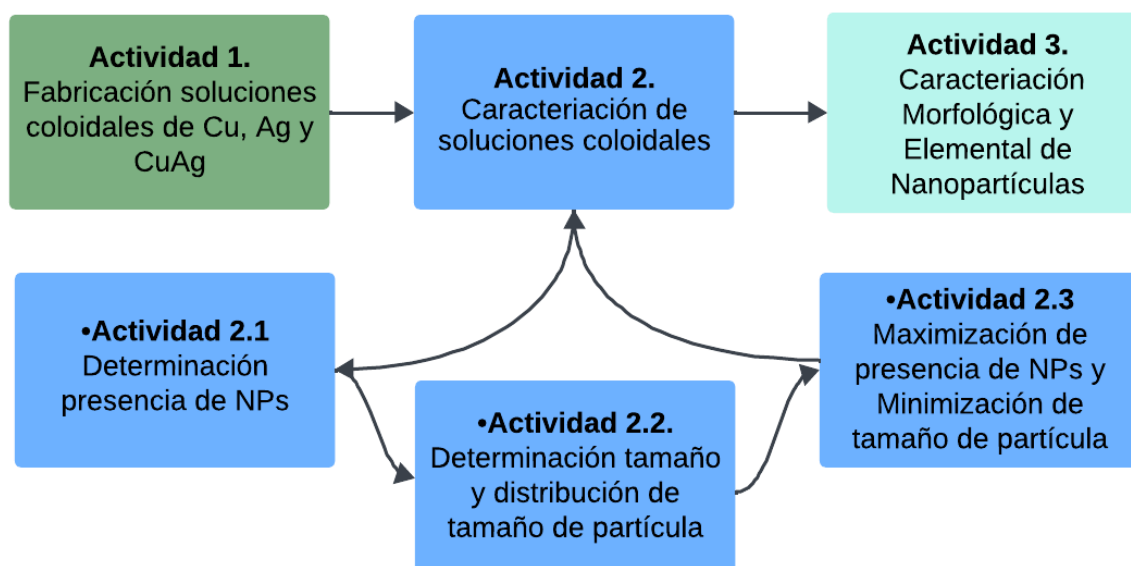
Este capítulo contribuye a entender como las condiciones de síntesis establecidas afectan las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas y a determinar los

parámetros de síntesis idóneos de estas nanopartículas metálicas para su evaluación microbiológica en capítulos posteriores.

## 5.1. Metodología

### Figura 9.

Actividades relacionadas a la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos vegetales.



### 5.1.1 Actividad 1. Fabricación de soluciones coloidales de Cu, Ag y bimetálicas de CuAg

**5.1.1.1** Materiales y reactivos. Agua desionizada, monolaurato de polioxietilen(80)sorbitano – Polisorbato/Tween 80 (C<sub>64</sub>H<sub>124</sub>O<sub>26</sub>) (>95%, Conquímica), hidróxido de sodio (NaOH) (50%, Brinsa), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O) (>99%, Panreac), sulfato de plata (>99%-Dasit)(AgNO<sub>3</sub>) y extracto de mora (preparación propia). Los reactivos fueron previamente filtrados (filtro de jeringa de 0.45 μm) y centrifugados a 6.000 rpm por 30 min, utilizando únicamente el sobrenadante.

### 5.1.1.2 Condiciones de Operación para la Síntesis de Nps de Cobre, Plata y Cobre-Plata

**Diseño experimental:** Para la síntesis de las soluciones coloidales se realizó un diseño experimental factorial fraccionado con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución en la reacción. Debido a que los diseños factoriales fraccionados forman “estructuras de Alias” (en donde los efectos principales y las interacciones podrían confundirse dada la reducción de las combinaciones de los tratamientos), no todas las interacciones pueden ser analizadas. A pesar de este inconveniente y aunque los efectos de interacción de 2 variables no se pueden estudiar por separado, se realizó una jerarquización de los efectos y se presupone que los efectos de orden superior (3 factores combinados en adelante) son insignificantes y se priorizan los efectos principales y las interacciones de orden bajo (2 factores combinados) (Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008). De esta manera, los factores o variables independientes evaluados en el diseño experimental fraccional fueron: concentración de la sal metálica precursora ([Sal]), concentración del extracto vegetal (%Extracto), pH y tiempo de reacción ( $t_r$ ). Los niveles altos y bajos de la reacción se observan en la siguiente tabla:

**Tabla 9.**

Parámetros de reacción a evaluar en el diseño experimental factorial fraccionado, con su correspondiente nivel inferior y superior.

	<b>Parámetro</b>	<b>Nivel Inferior</b>	<b>Nivel Superior</b>
<b>A</b>	Sal metálica [mMol]	1	10
<b>B</b>	%Extracto [% v/v]	25	75

<b>C</b>	pH	4	12
<b>D</b>	t <sub>r</sub> [min]	30	120

Teniendo en cuenta lo anterior, las combinaciones de las condiciones de reacción que sintetizaron las distintas soluciones coloidales caracterizadas se pueden evidenciar en el Anexo K.

Los experimentos fueron realizados para un volumen de reacción de 10 ml a una temperatura de síntesis de 80°C, utilizando Tween-80 a una concentración de 5% v/v como estabilizante. Se realizó la evaluación de los anteriores parámetros y condiciones fijas para cada sal metálica por separado (monometálica – CuNps o AgNps) y una combinación 50:50% de sales metálicas (bimetálica - CuAgNps).

La aplicación de los anteriores parámetros genera un total de 48 experimentos, los cuales se obtienen de las 8 combinaciones que se obtienen del diseño factorial fraccionado, por duplicado, por cada composición de sal metálica. Para la reacción de síntesis primero se prepararon las diluciones en medio acuoso de la sal metálica seleccionada (sulfato de cobre pentahidratado y/o nitrato de plata - 0, 50, 100 %p/v) a la composición final a evaluar (1-10 mMol) mediante agitación constante. Después se agregó el estabilizante Tween-80 (5%v/v) y se modificó el pH con NaOH al valor indicado (4-12). Se inició el calentamiento y cuando la mezcla llegó a la temperatura de 80°C se adicionó el volumen de extracto a evaluar (25-75 % v/v). Se esperó a que la mezcla alcanzara nuevamente la temperatura indicada para evaluar el tiempo de reacción (30 – 120 min). Al finalizar el tiempo de reacción, las muestras se dejaron en reposo por 48 horas, descartando los precipitados de mayor tamaño que se encontraban en el fondo y realizando las caracterizaciones y pruebas posteriores únicamente al sobrenadante.

### **5.1.2 Actividad 2. Caracterización de las soluciones coloidales**

Con el fin de determinar la presencia, tamaño y distribución de nanopartículas metálicas en las soluciones coloidales anteriormente preparadas se utilizaron las siguientes metodologías:

#### **5.1.2.1 Actividad 2.1** Determinación colorimétrica y espectrofotométrica de la presencia de NPs

Tras el tiempo establecido de reposo de 48 horas, y con el fin de determinar la presencia de nanopartículas en las soluciones coloidales, inicialmente se realizó una inspección visual de las reacciones, en donde se evidenció un cambio en la coloración de las soluciones, pasando de amarillo pálido a marrón oscuro en las AgNPs (Khalil et al., 2014) y de azul celeste a marrón oscuro en las CuNPs (Suárez-Cerda et al., 2017), lo cual daría indicio de la presencia de nanopartículas. Para determinar la longitud de onda característica de las nanopartículas se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 40/50, encontrando que para las AgNps está entre 400-450 nm, para las CuNps está entre 500-600 nm, y para la combinación de CuAgNps se encuentra entre 400-600 nm, aproximadamente (Valodkar et al., 2011). Para ello, se depositaron 2.5 ml del sobrenadante de cada solución coloidal sintetizada en una celda de cuarzo de 4 mL, realizando un barrido del espectro UV-Vis, variando la longitud de onda de 290 a 1.100 nm, operando a una resolución de 2 nm. El blanco para la línea base fue agua. A partir de esta caracterización las Nps cuya intensidad de absorción fue la mayor en su longitud de onda característica fueron elegidas para las futuras pruebas.

#### **5.1.2.2 Actividad 2.2** Determinación del tamaño y la distribución de tamaño de partícula:

Para determinar el diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño y el índice de polidispersión de las Nps se utilizó el equipo Litesizer™ 500 marca Anton Paar, donde se depositó 1 ml de esta dispersión coloidal en una celda de cuarzo a 25°C. De la misma forma, estas características fueron evaluadas a cada uno de los blancos o reactivos. En vista que se desconocía la velocidad de sedimentación de las partículas que se encontraban en el sobrenadante de la solución coloidal, la muestra se agitó suavemente y el volumen a evaluar se toma de la altura media del envase en el que estas se encuentran reposadas. El ángulo, filtro óptico, el tiempo de las corridas y la posición del foco óptimas de medición fueron determinados automáticamente por el equipo con el fin de obtener la mayor intensidad de dispersión posible de las muestras analizadas. Debido a que se esperaba ruido en las muestras, el modelo de análisis se definió en modo General y el *Cumulant model* como Avanzado. El procedimiento para la validación de los datos se puede evidenciar en el Anexo L.

**5.1.2.3 Actividad 2.3** Maximización de presencia de Nps, Minimización de tamaño de partícula y Estabilidad coloidal:

Teniendo en cuenta los resultados experimentales, mediante el programa estadístico MINITAB, se generaron modelos matemáticos que describen la presencia de Nps (absorbancia) y el tamaño de partículas. A partir de estos modelos se encontraron los valores de los parámetros de operación que maximizaran la presencia de Nps (absorbancia) y al tiempo minimizaran el tamaño de partículas para cada solución coloidal. Los resultados predictores de estos fueron comparados con valores experimentales para evaluar su validez. Así mismo, con el fin de analizar la estabilidad coloidal de las soluciones, se hicieron mediciones de absorbancia y distribución de tamaño de partícula de los tratamientos que evidenciaron los mejores resultados tras 30 días de almacenamiento y se determinó el

porcentaje de variación de dichos parámetros. Tras los resultados obtenidos en las caracterizaciones, y basados en el análisis estadístico de los datos y en la correspondiente maximización o minimización de los diseños experimentales factoriales, se tomó como criterio de selección a cada síntesis monometálica (2) y bimetálica (1) que obtuvo la mayor magnitud de absorbancia en su longitud de onda característica (presencia de nanopartículas), y el menor tamaño de partícula entre todos sus tratamientos.

**5.1.2.4 Análisis estadístico de los datos.** Para la realización del análisis estadístico de cada uno de los tratamientos, primero se estudiaron las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza (Gráficas de residuos) para después utilizar el diagrama de Pareto y las gráficas de efectos estandarizados y así evaluar la influencia de los parámetros y sus interacciones sobre las variables de respuesta (Absorbancia y tamaño de partícula). Finalmente, se analizaron los datos de estabilidad coloidal de los tratamientos al determinar su significancia estadística mediante la prueba no-paramétrica de comparación de medianas de Mood. Se utilizó el programa estadístico MINITAB infiriendo un nivel de confianza en el 95%.

### ***5.1.3 Actividad 3. Determinación de las características morfológicas, tamaño y composición de las soluciones coloidales***

El objetivo de esta etapa fue determinar las características fisicoquímicas de las soluciones coloidales con nanopartículas metálicas que obtuvieron la mayor magnitud de absorbancia en su longitud de onda característica (presencia de nanopartículas), y el menor tamaño de partícula entre todos sus tratamientos.

**5.1.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).** Esta técnica de caracterización se realizó con el fin de determinar las propiedades morfológicas y de composición de las soluciones coloidales. Esta se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopía (LabMIC) mediante un Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA FEG 650, equipado con un detector de imágenes Everhart Thornley detector (ETD) para electrones secundarios (SE) y un detector de imágenes Back Scattered Electron Detector (BSED) tipo SSD para electrones retrodispersados (BSE). Las imágenes fueron tomadas a alto vacío y con un voltaje de aceleración de 30kV. Alrededor de 50  $\mu$ L de la solución coloidal a analizar fueron depositados sobre *stubs* metálicos con cinta adhesiva de carbón y se revistieron con una capa de oro para mejorar su conductividad y facilitar su visualización.

**5.1.3.2 Espectroscopía de energía dispersa (EDX).** El análisis químico de los diferentes elementos en las soluciones coloidales se llevó a cabo mediante espectroscopía de energía dispersa (EDS, por sus siglas en inglés) utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido FEG a través de un detector EDAX APOLO X con una resolución de 126.1 eV. Para analizar la información semicuantitativa de los elementos químicos se utilizó el Software EDX Genesis.

## **5.2. Análisis y Discusión de Resultados**

### **5.2.1 Caracterización de las soluciones coloidales**

#### **5.2.1.1 Actividad 2.1** Determinación de la presencia de Nps

Una de las técnicas más utilizadas e inicialmente descritas por distintos estudios para confirmar la presencia de nanopartículas en soluciones coloidales, al igual que la reducción

de iones metálicos, es la inspección inicial y observación visual del cambio de color de éstas cuando se aplican determinadas condiciones de reacción. Esta metodología está estrechamente relacionada con la técnica de caracterización mediante espectrofotometría y las propiedades de resonancia del plasmón superficial que definen a las nanopartículas de cobre y plata, entre otras, dadas sus concentraciones, dimensiones y formas (Dang et al., 2011a; Sun & Xia, 2003). En el Anexo M se pueden observar las gráficas de los espectros de los reactivos y sus respectivas concentraciones utilizadas en la síntesis de las soluciones coloidales, en donde se evidencia que, aunque en algunos de estos se presenta absorción en determinadas longitudes de onda al inicio del espectro de absorción entre 200 y 400 nm, para ninguno de los casos se exhibe un pico que interfiera en la longitud de onda característica de las nanopartículas mono o bimetálicas de cobre o plata o en su posible identificación. Así mismo, en el Anexo N se logra evidenciar el color de las soluciones coloidales de Cu, Ag y CuAg tras 48 horas de reposo según las condiciones de síntesis aplicadas.

#### **5.2.1.2 Soluciones coloidales de Cu.**

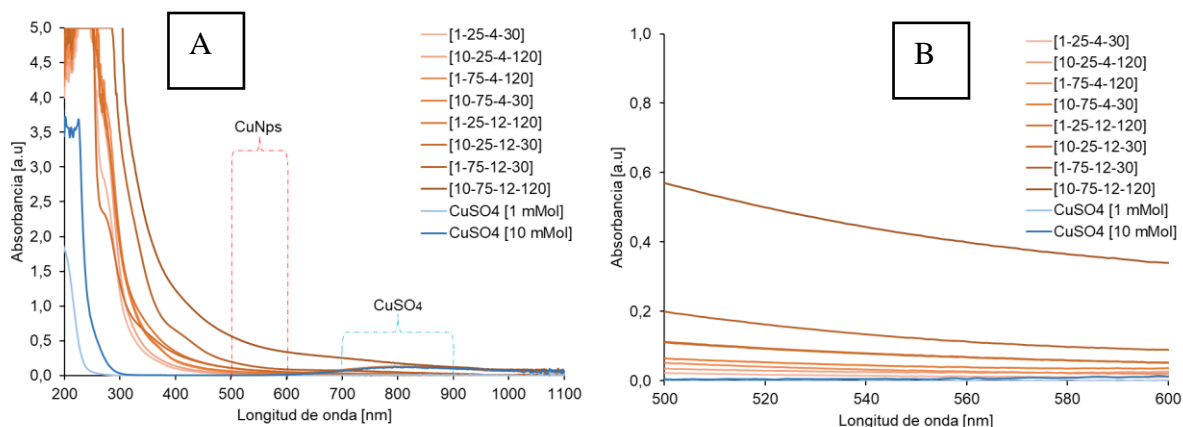
Tras observar en el anexo N el color que se obtiene en cada una de las soluciones coloidales de cobre tras ser aplicadas las condiciones de síntesis del diseño factorial propuesto, se puede evidenciar que las pruebas 1, 2, 3 y 4 son traslúcidas e incoloras, sugiriendo que estos puntos son una mezcla y no hubo reacción de síntesis o reducción de iones, los cuales se encuentran a pH 4. Por otro lado, en las pruebas 5, 6, 7, y 8, con pH 12, se generó un cambio de color al observarse un color marrón traslúcido indicando la posible presencia de nanopartículas de cobre. No obstante, en los puntos 6 y 8 se confirma visualmente la presencia significativa de precipitados, lo cual indica la poca estabilidad de dichas soluciones coloidales. Este tipo de precipitados podrían deberse a la presencia de

óxidos de cobre, los cuales son termodinámicamente más estables que los sulfatos y las nanopartículas de cobre, y se pudieron generar debido a la aglomeración de compuestos y al bajo efecto reductor y estabilizante de los extractos y agentes dispersantes utilizados (Dang et al., 2011b).

Esta inspección inicial visual se comparó con los resultados obtenidos de la caracterización por espectrofotometría UV-Vis. En la figura 10 (A y B) se puede observar el espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Cu a diferentes longitudes de onda, según las condiciones aplicadas. Al observar la figura 10 (A) no se puede evidenciar claramente el pico característico de las CuNps entre 500 y 600 nm para ninguna de las pruebas realizadas, lo que podría indicar que no hay presencia de esta clase de nanopartículas en las soluciones sintetizadas. Por otro lado, a pesar de que tampoco se observa algún pico característico en la figura 10 (B), la cual es una ampliación de la Figura 10 (A) en la longitud de onda entre 500 y 600 nm a una absorbancia de 0 a 1, existe una ligera diferencia entre los tratamientos en donde las pruebas con pH 4, traslúcidas, muestran absorbancias menores que los tratamientos a pH 12, que se tornaron en un color marrón.

***Figura 10.***

Espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Cu. (A) Longitud de onda de 200-1100 nm. Absorbancia de 0 – 5,0 [a.u] (B) Longitud de onda de 500-600 nm. Absorbancia de 0 – 1,0 [a.u].



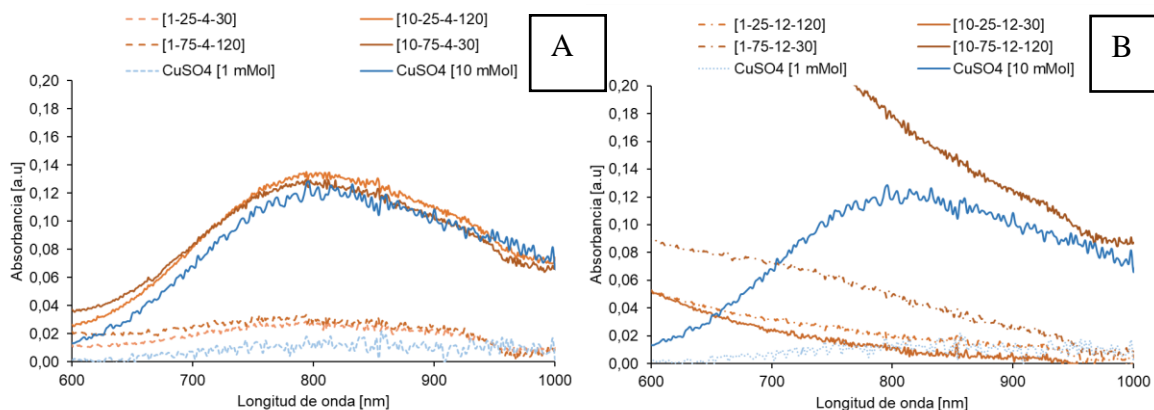
*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]]. El numero de la prueba se presenta de manera descendiente comenzando por la prueba 1, terminando en la prueba 8. Los resultados representan el promedio de las réplicas.

Siguiendo la hipótesis de que las pruebas 1-4, realizadas a pH 4, son una mezcla en la cual no hubo reacción de síntesis, y con el fin de comprobar si se generó la reducción de los iones de  $\text{Cu}^{+2}$  en las soluciones coloidales según los tratamientos propuestos, se realizó un análisis más profundo de la reacción de dicha sal metálica al examinar el espectro de absorbancia de la sal metálica  $\text{CuSO}_4$ , el cual tiene su pico característico a una longitud de onda entre 700 y 900 nm. En la Figura 11 (A) se pueden observar los resultados de dichas pruebas, en donde las muestras 1 - 3 (concentración de 1 mMol de  $\text{CuSO}_4$ ) y 2 - 4 (concentración de 10 mMol de  $\text{CuSO}_4$ ), presentan un comportamiento similar a las soluciones de  $\text{CuSO}_4$  a la misma concentración sin reaccionar. Por otra parte, en el caso de la Figura 11 (B), la cual presenta los resultados de los puntos 5 a 8 a pH 12, se evidencia una clara diferencia entre los espectros de las muestras sintetizadas y las soluciones de la sal metálica sin reacción a ambas concentraciones (1 y 10 mMol), lo cual podría indicar que, a pesar de no presentar el pico característico de las CuNps, el  $\text{CuSO}_4$  estaría consumiéndose y

reaccionando, evidenciando que el NaOH y la alcalinidad del medio cumplen un papel importante en la reacción de dicha sal metálica. *Liu et al.*, (2012) sintetizaron CuNps precipitadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor [1 Mol], CuSO<sub>4</sub> como sal metálica [0,2 Mol] y PVP como estabilizante [15 mMol], usando NaOH como regulador de pH y analizando su efecto en la reacción (LIU et al., 2012). Los autores sugieren que a medida que se agrega NaOH, y el pH de la solución aumenta hasta pH 5 o 7, se genera hidróxido de cobre (II), o cúprico (Cu(OH)<sub>2</sub>), mientras que llegando a pH 9 o 11 se forma óxido de cobre (II) (CuO), manteniendo un tiempo de reacción de 10 min. Sin embargo, tras 4 horas de reacción, el CuO formado previamente se convierte en precursor, por lo que sigue reaccionando para finalmente obtener óxido de cobre (I) (Cu<sub>2</sub>O). El Cu(OH)<sub>2</sub> es inestable y reacciona rápidamente, por lo que agentes reductores débiles, como el ácido ascórbico u otros compuestos de extractos vegetales, no lograrán una reducción completa para generar CuNps, por lo que no formarán nanopartículas y finalmente se precipitarán formando óxidos de cobre (CuO o Cu<sub>2</sub>O) insolubles en agua.

***Figura 11.***

Espectro de absorbancia UV-Vis para la síntesis de Nps a partir de soluciones coloidales de Cu. Longitud de onda de 600-1000 nm. Absorbancia de 0 – 0,2 [a.u]. Enfoque en la reducción del reactivo CuSO<sub>4</sub>. (A) Pruebas 1 – 4. pH 4. (B) Pruebas 5 – 8. pH 12.



*Nota:* (A) Pruebas 1 a 4. (B) Pruebas 5 a 8. \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]]. Los resultados representan el promedio de dos réplicas.

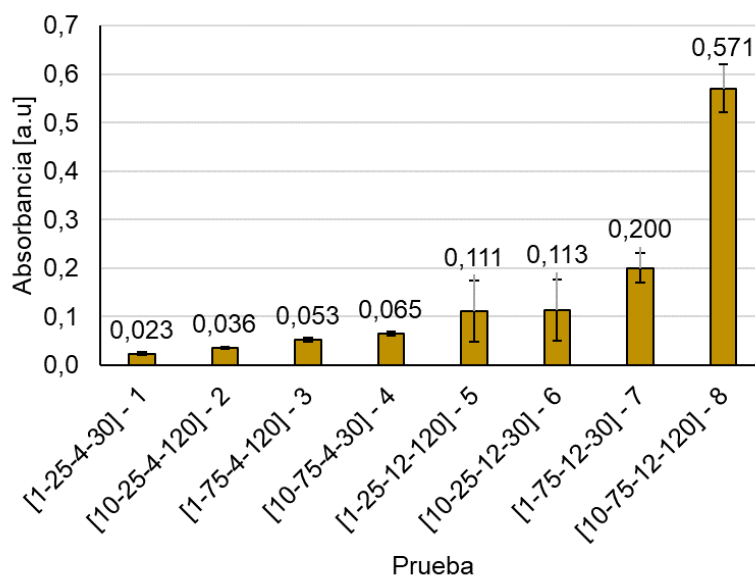
Resultados similares se observaron en el trabajo de Dang et al., (2011), quienes inicialmente intentaron sintetizar CuNps utilizando ácido ascórbico como agente reductor [0,02 Mol], CuSO<sub>4</sub> como sal metálica [0,01 Mol] y polietilenglicol como estabilizante [0,02 Mol], usando NaOH [0,1 M] como catalizador y regulador de pH. No obstante, estas condiciones no fueron suficientes para la formación de los picos característicos de las CuNps, los cuales solo fueron observados únicamente al agregar borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) [0,1 Mol], un fuerte agente reductor altamente tóxico, a la reacción anterior y potenciarla (Dang et al., 2011b). Tras observar la aparición del pico característico de CuNps, los autores analizaron el efecto del pH en el espectro de absorción. En este estudio se observó que a pH 6 no se identificaba el pico característico, mientras que éste se evidenciaba claramente a pH entre 8 y 12.

Teniendo en cuenta lo anterior, y con el fin de identificar los productos que permanecieron en el sobrenadante, se procedió a obtener el punto de absorción máxima de los espectros de cada una de las pruebas que se encontraban en la longitud de onda característica

de las CuNps entre 500 y 600 nm, cuyos resultados resumidos se pueden observar en la Figura 12. En esta figura se pueden observar más claramente los resultados de la Figura 10 (B), siendo las pruebas 1 a 4 (pH 4) las que obtuvieron absorbancias inferiores comparadas con las pruebas 5 a 8 (pH 12), donde la absorción máxima de la prueba 8 es claramente mayor a las absorciones máximas alcanzadas por los demás puntos experimentales realizados.

### Figura 12.

*Absorción máxima de las soluciones coloidales de Cu en el rango de longitud de onda entre 500 – 600 nm.*



*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. Los resultados representan el promedio de las dos réplicas y su desviación estándar.

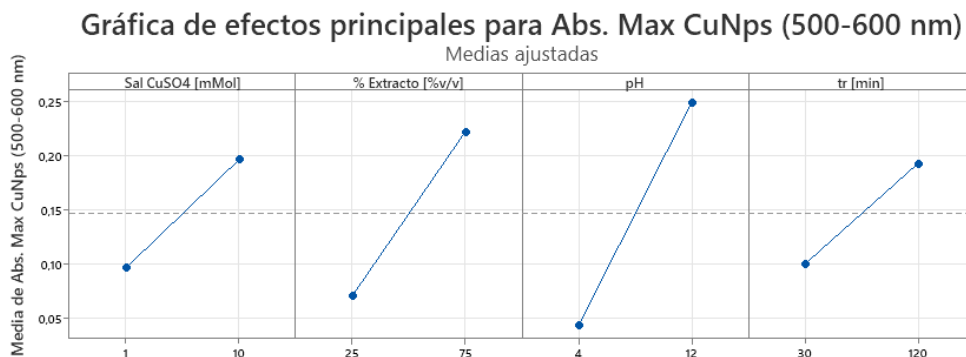
Así mismo, con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la absorbancia en el rango de 500 a 600 nm, para la síntesis de las soluciones coloidales de Cu según el diseño factorial fraccionado, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. En el ANEXO O se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de

Pareto de efectos estandarizados para la absorbancia de las soluciones coloidales de CuNps. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental factorial fraccionado e igualmente se evidenció que todas las variables y sus interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo.

En la Figura 13 se pueden observar los efectos principales para la máxima absorbancia en el rango de 500 a 600 nm relacionado con la presencia de CuNps. En esta figura se observa que hay un aumento significativo de la absorbancia del espectro a medida que aumenta el valor de todas las variables analizadas sal metálica, extracto, pH y tiempo de reacción. Este efecto podría deberse al aumento de la concentración de iones de  $\text{Cu}^{+2}$  y  $(\text{OH})^-$  disueltos en la solución, además de los compuestos reductores presentes en el extracto, lo cual favorece la formación de más productos. De la misma forma, un mayor tiempo de reacción aumenta la probabilidad de que los reactivos interactúen, generando más compuestos finales. Por otra parte, en el ANEXO O también se observan los efectos de las interacciones de los parámetros evaluados, en donde se evidencia que la interacción entre la [Sal metálica] y los demás parámetros es estadísticamente significativa, al mismo tiempo que los valores bajos de cada una de estas variables no tienen un impacto relevante en la absorbancia.

***Figura 13.***

Graficas de efectos principales de la absorbancia en el rango de 500 a 600 nm para CuNps.



Los resultados del efecto de los parámetros de síntesis del presente estudio son similares al trabajo de *Kumar et al*, (2017) en donde sintetizaron exitosamente CuNps utilizando 10 mMol de nitrato de cobre, diferentes concentraciones de extracto acuoso de fruta y hoja de mora, a 75° C por 6 horas (B. Kumar, Smita, Cumbal, Debut, et al., 2017). Estos encontraron que un aumento en la concentración de estos extractos aumenta la magnitud de la absorbancia en el espectro de nanopartículas de óxidos de cobre (Cu<sub>2</sub>O y CuO). Sin embargo, los autores analizaron la longitud de onda únicamente en el rango de 200 a 300 nm, contrario al presente trabajo en donde se analiza de 500 a 600 nm. *Asghar y Asghar* (2020) evaluaron los extractos etanólicos de hojas de seis diferentes plantas realizando la síntesis utilizando 1 mMol de CuSO<sub>4</sub> a 80° C a diferentes intervalos de tiempo. Al igual que en el presente trabajo, los autores evidenciaron que un aumento en el tiempo de reacción durante la síntesis aumenta el máximo de absorbancia en el espectro de las soluciones coloidales de CuNps; no obstante, a pesar de que éstos evaluaron el tiempo de reacción hasta 24 horas, las diferencias de magnitud entre éstos fueron mínimas y no fueron mayores a 0,6 [a.u] (*Asghar & Asghar*, 2020). *Xiong et al* (2011) evaluaron distintos tiempos de reacción y concentraciones de ácido ascórbico (compuesto presente en la fruta de mora) para la síntesis de nanopartículas de cobre utilizando cloruro de cobre [10 mMol] a 80°C, encontrando que las dispersiones resultantes exhibieron picos de absorbancia característicos alrededor de 570

nm a una concentración de 1 M de ácido ascórbico después de 2 horas de tiempo de reacción (Xiong et al., 2011). Los resultados de los autores anteriores podrían significar que, debido a que el tiempo de reacción utilizado en el presente trabajo fue de máximo 120 min o 2 horas, las diferencias en el tiempo de reacción empleados en presente trabajo fueron insuficientes para llegar a una reducción exitosa de los iones de  $\text{Cu}^{+2}$  y por consiguiente obtener en el espectro característico UV-Vis que determina la presencia de CuNps. De forma similar al tiempo de reacción, la concentración de los compuestos en el extracto de semilla de mora pudo no ser suficiente y limitó la reacción de reducción, por lo que ésta se dio de forma incompleta. Como ejemplo de este efecto, este resultado se observó igualmente en el trabajo de *Thakore et al.*, (2019), quienes intentaron sintetizar CuNps utilizando el látex natural de la fruta de sapota [1% v/v] y nitrato de cobre [0.01 M] por 30 min a 60° C; sin embargo, se evidenció un bajo efecto reductor de dicho extracto y debieron utilizar adicionalmente ácido ascórbico [10% p/v] como agente reductor con el fin de completar la reacción (Thakore et al., 2019). Es importante resaltar que, a diferencia de *Dang et al.*, (2011), quienes necesitaron añadir  $\text{NaBH}_4$ , un agente reductor altamente tóxico, para mejorar el efecto reductor del ácido ascórbico, *Thakore et al.*, (2019), lograron completar su síntesis usando únicamente este ácido y extracto de látex, sin recurrir a compuestos tóxicos, destacando este enfoque por ser más amigable con el medio ambiente.

### **5.2.1.3 Soluciones coloidales de Ag.**

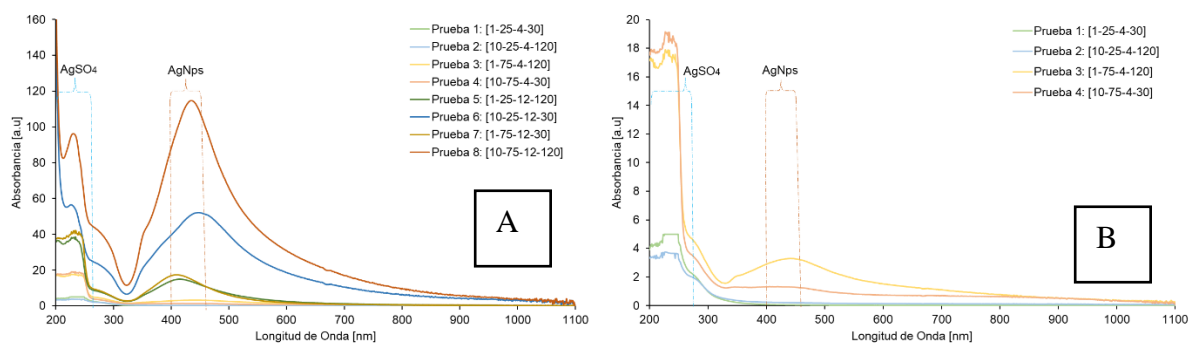
Tras observar en el Anexo N el color que se obtiene en cada una de las soluciones coloidales de plata, tras ser aplicadas las condiciones de síntesis del diseño factorial propuesto, se puede evidenciar que, a diferencia de las síntesis utilizando la sal de cobre, todas las soluciones resultantes de plata cambiaron su color de traslúcido a un color marrón oscuro, por

lo que se infiere que a partir de esta reacción se formaron AgNps. Las pruebas 1, 3 y 5 tienen un color aparentemente más claro que los demás experimentos, debido a que tienen una menor concentración de sal metálica (1 mMol de sulfato de plata). Como resultado de que las soluciones fueron muy opacas, no se pudo determinar visualmente la presencia de precipitados al igual que brindar observación alguna respecto a su estabilidad.

En la Figura 14 se puede observar el espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Ag a diferentes longitudes de onda, según el tipo de prueba aplicada. En la Figura 8 (A) se puede evidenciar que las pruebas realizadas a pH 12 (5, 6, 7, y 8), presentan un pico de absorbancia característico para las AgNps en el rango de 400 a 450 nm indicando la presencia de estas nanopartículas. No obstante, tal como se observa en la Figura 14 (B), al observar el resultado de las pruebas 1, 2, 3 y 4, realizadas a pH 4, se evidencia que no se obtuvieron picos característicos o sus magnitudes son muy pequeñas, lo cual podría indicar que la alcalinidad del medio cumple un papel significativo en la reacción del  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  y la formación de AgNps.

### Figura 14.

Espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Ag. Longitud de onda de 200-1100 nm. (A) Absorbancia de 0 – 160 [a.u.]. (B) Absorbancia de 0 – 20 [a.u].



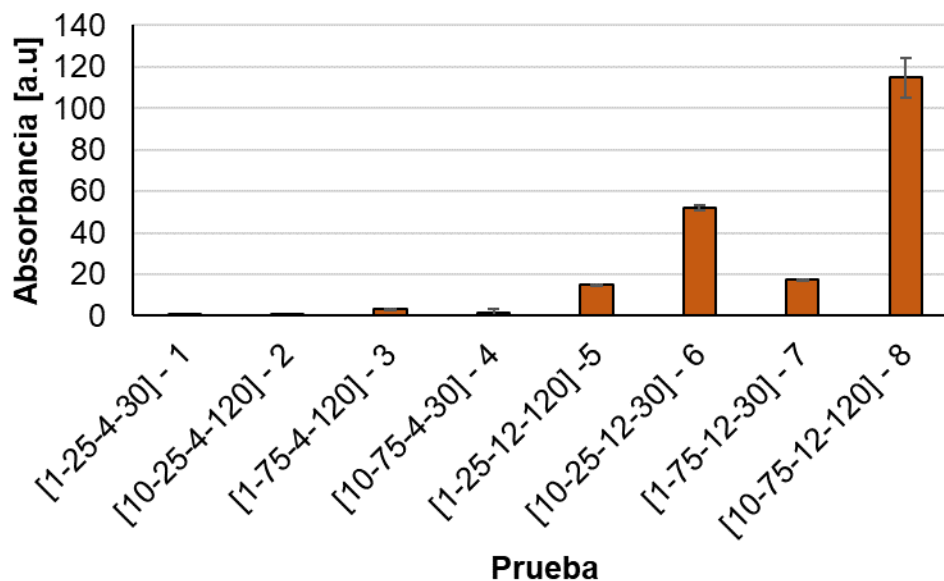
Nota: \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]]. Los resultados representan el promedio de las réplicas.

Resultados similares al presente trabajo fueron encontrados en el estudio de Kumar, Smita, Cumbal, & Debut (2017) los cuales utilizaron nitrato de plata [1 mMol] junto a un extracto de fruta de mora para sintetizar AgNps a temperatura ambiente, determinando la presencia de estas nanopartículas tras 3,5 horas de reacción al confirmar su pico de absorbancia característico a 435 nm (B. Kumar, Smita, Cumbal, & Debut, 2017). Por otro lado, Nadagouda et al (2014) observaron que al sintetizar AgNps utilizando el extracto acuoso de fruta de mora y nitrato de plata a 25°C por 24 horas se evidencian dos picos diferentes en el espectro de absorbancia, según los autores debido a que la posición y número de picos de absorción va a depender de factores como el tamaño de las partículas y su forma, siendo un único pico característico de formas únicamente esféricas (420-460 nm), mientras que al tener formas adicionales a esta, como cúbicas, generarían un segundo pico entre 550-650 nm (Nadagouda et al., 2014).

Así mismo, se procedió a obtener la absorbancia máxima en los espectros que se encontraban en la longitud de onda característica de las AgNps entre 400 y 450 nm, cuyos resultados se pueden observar en la Figura 15. En esta figura se observa claramente la diferencia entre las pruebas a pH bajo y alto, siendo ampliamente superiores las pruebas 6 y 8 sobre las demás, siendo estas caracterizadas por su mayor concentración de sal metálica [10 mMol] al igual que pH alto (12).

### **Figura 15.**

*Absorbancia máxima de las soluciones coloidales de Ag en el rango de longitud de onda entre 400 – 450 nm.*



*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar.

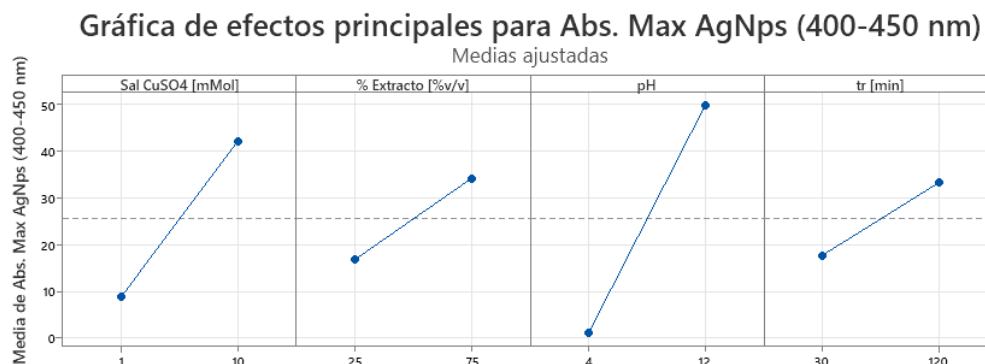
De esta manera, con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la magnitud de la absorbancia en el rango de 400 a 450 nm, para la síntesis de las soluciones coloidales de Ag según el diseño factorial fraccionado, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. En el ANEXO P se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la absorbancia de las soluciones coloidales de AgNps. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental factorial fraccionado y se evidenció que todas las variables y sus interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo.

En la Figura 16 se muestran las gráficas de los efectos principales de los factores analizados en la magnitud de la absorbancia máxima de AgNps en el rango de 400 a 450 nm,

mientras que en el Anexo P además se muestran los efectos de sus interacciones. En esta figura puede observarse que todos los factores (la concentración de la sal metálica -  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ , porcentaje de extracto, pH y tiempo de reacción) tienen un impacto positivo en la formación de AgNps, siendo el pH y la concentración de la sal los más influyentes. Este efecto se explicaría basado en la disponibilidad de reactivos, quienes promueven la reacción generando nuevos productos. Aumentar la concentración de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  involucra un incremento en la disponibilidad de iones de  $\text{Ag}^{+2}$ , lo que se resume en mayor material por ser reducido para formar AgNps. De la misma forma, un incremento de compuestos reductores provenientes del extracto genera una mayor respuesta en la absorbancia relacionada con la presencia de AgNps. Por otro lado, a pH 12, generado por la presencia de iones  $(\text{OH})^-$  provenientes del NaOH, se proporciona un entorno más favorable donde los iones metálicos y reductores interactúan, lo cual no se observa pH ácidos de 4, en donde se evidencian niveles bajos de absorbancia incluso a concentraciones altas de sal metálica o mayores tiempos de reacción (Anexo P). Consecuentemente, al prolongar el tiempo de reacción los reactivos tienen mayor oportunidad de interactuar entre ellos, generando mayor cantidad de AgNps.

**Figura 16.**

Gráficas de efectos principales para la absorbancia en el rango de 400 a 450 nm de AgNps.



#### 5.2.1.4 Soluciones coloidales de CuAg.

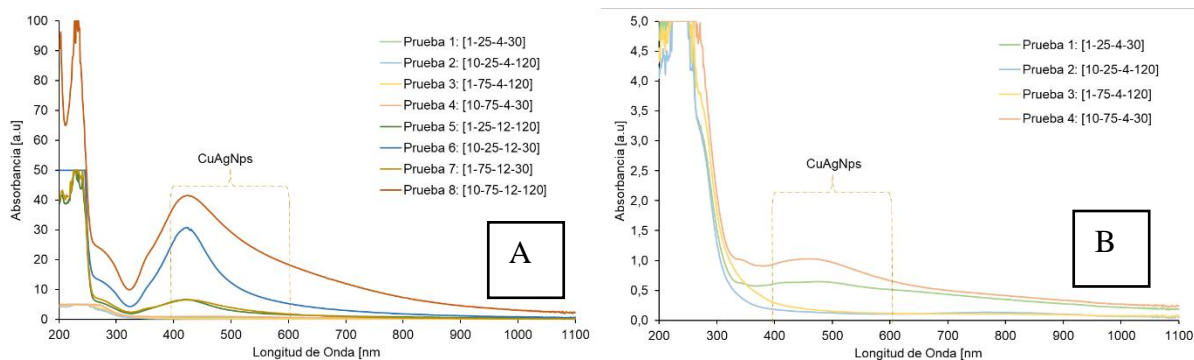
Tras observar en el anexo N el color que se obtiene en cada una de las soluciones coloidales de cobre/plata, tras ser aplicadas las condiciones de síntesis del diseño factorial propuesto, se puede observar un resultado combinado, en donde se evidencia el efecto de las reacciones de síntesis de cobre y plata individuales, siendo las pruebas 1, 2, 3 y 4, realizadas a pH bajo (4), las que obtuvieron un cambio leve de color al verse levemente marrones y con fuerte presencia de precipitados, siendo este último un indicio de su reducida estabilidad. Por otro lado, las pruebas 5, 6, 7 y 8, realizadas a pH alto (12), obtuvieron colores fuertemente marrones y opacos en donde no se observa claramente la presencia de precipitados.

En la Figura 17 se puede observar el espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de Cu/Ag a diferentes longitudes de onda y absorbancia, según el tipo de prueba aplicada. En la Figura 12 (A) se puede evidenciar que las pruebas 5, 6, 7, y 8 presentan un pico característico para las CuAgNps en el rango de 400 a 600 nm indicando una posible síntesis exitosa de esta nanopartícula bimetalica. La Figura 12 (B), muestra una ampliación del espectro de las pruebas 1, 2, 3 y 4 (realizadas a pH 4), donde se evidencia que las pruebas 2 y 3 no presentan pico característico alguno, mientras que las pruebas 1 y 4 presentan un pico leve. Esto podría indicar, de forma similar a la reacción de la síntesis de soluciones coloidales individuales de cobre y plata, que el NaOH y la alcalinidad del medio cumplen un papel importante en la reacción de reducción de estas sales combinadas al igual que separadas. Dada la evidencia de un único pico en el rango de longitud de onda de 400 a 600 nm, los resultados presentados en la gráfica anterior sugieren que el espectro que se observa pertenece a una aleación de metales y no a una mezcla de nanopartículas sintetizadas independientemente, en donde se observan los picos característicos de cada nanopartícula por

separado (Mallikarjuna & Kim, 2018; Valodkar et al., 2011). En otros trabajos se ha observado que, durante la formación de nanopartículas bimetálicas, se espera una reducción competitiva de los iones metálicos debido a su diferencia de potencial de reducción, la cual incrementaría la velocidad de reducción de estos mismos iones; sin embargo, esto no se puede concluir en el presente estudio dados los resultados de la síntesis coloidal individual de cobre, la cual no presentó ningún pico característico de este metal y por consiguiente no se puede asegurar la presencia o síntesis de dicha nanopartícula hasta este punto (Mohamad et al., 2013a). Por otra parte, otros estudios debieron utilizar agentes reductores adicionales para lograr la reducción de los iones de cobre, mientras que esto no fue necesario en el caso de los iones de plata. Thakore et al., (2019) sintetizaron exitosamente CuAgNps utilizando el látex de la fruta de sapota [1% v/v], nitrato de cobre [0.01 M] y nitrato de plata [0.01 M] por 30 min a 60° C; sin embargo, aunque este extracto logró sintetizar AgNps satisfactoriamente, su efecto reductor no fue suficiente para sintetizar CuNps y debieron utilizar adicionalmente ácido ascórbico [10% p/v] como agente reductor para completar la síntesis de las nanopartículas bimetálicas.

***Figura 17.***

Espectro de absorbancia UV-Vis de la síntesis de soluciones coloidales de CuAg. Longitud de onda de 200-1100 nm. (A) Absorbancia de 0 – 100 [a.u]. (B) Absorbancia de 0 – 5 [a.u].

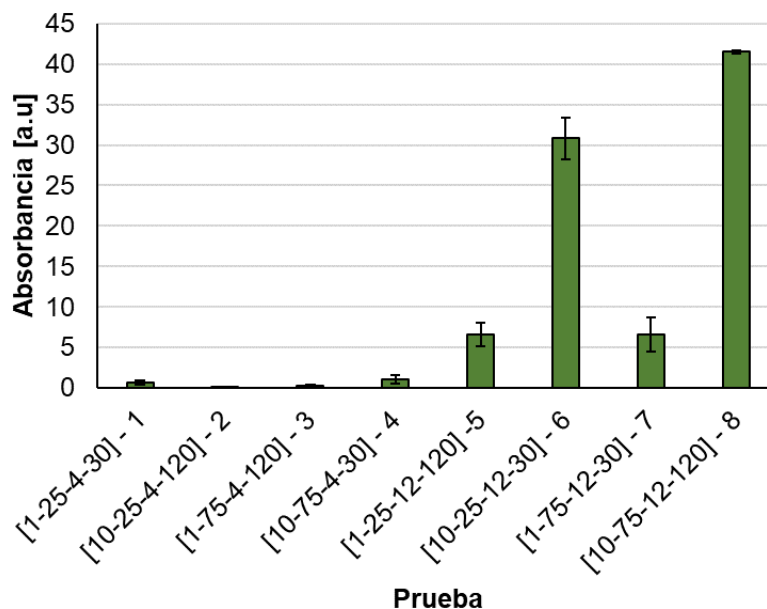


*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. El número de la prueba se presenta de manera descendiente comenzando por la prueba 1. Los resultados representan el promedio de las réplicas.

Al igual que con las demás soluciones sintetizadas individualmente, se procedió a obtener la absorción máxima de los espectros de cada una de las pruebas que se encontraban en la longitud de onda característica de las CuAgNps entre 400 y 600 nm, cuyos resultados se pueden observar en la Figura 18. En esta figura, al igual que en el comportamiento observado en las AgNps, se evidencia claramente la diferencia entre las pruebas realizadas a pH bajo y alto, siendo ampliamente superiores las pruebas 6 y 8 sobre las demás, siendo estas caracterizadas por su mayor concentración de sal metálica [10 mMol] y pH 12.

**Figura 18.**

Absorción máxima de las soluciones coloidales de Cu/Ag en el rango de longitud de onda entre 400 – 600 nm.



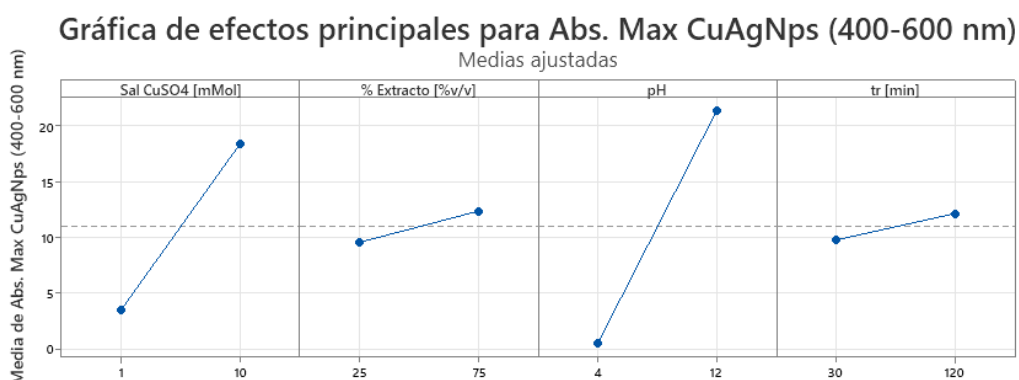
*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar.

De esta manera, con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la magnitud de la absorción en el rango de 400 a 600 nm, para la síntesis de las soluciones coloidales bimetálicas de CuAg según el diseño factorial fraccionado, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. En el ANEXO Q se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la absorbancia de las soluciones coloidales de CuAgNps. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental factorial fraccionado e igualmente se evidenció que todas las variables y sus interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo.

En la Figura 19 se pueden observar los efectos principales para la magnitud de la absorción en el rango de 400 a 600 nm, relacionado con la presencia de CuAgNps, mientras que en el Anexo Q además se muestran los efectos de sus interacciones. En esta figura puede observarse que, de manera similar a las otras nanopartículas en su forma individual, al aumentar la magnitud de los factores se presenta un aumento de la absorbancia. Factores como la concentración de la sal metálica y el pH exhiben absorbancias mucho mayores que las otras variables analizadas, como %Extracto y el tiempo de reacción. A pesar de las diferentes interpretaciones de los efectos de los factores involucrados en la reacción de síntesis de nanopartículas multimetálicas, actualmente el mecanismo de reacción de los iones metálicos y la formación de las nanopartículas no ha sido estudiado a profundidad.

**Figura 19.**

Gráficas de efectos principales y para la magnitud de la absorción en el rango de 400 a 450 nm para CuAgNps.



**Actividad 2.2** Determinación del tamaño y la distribución de tamaño de partícula

Una de las técnicas de caracterización más utilizadas para confirmar la presencia y tamaño de nanopartículas en soluciones coloidales es la dispersión de luz dinámica, o DLS por sus siglas en inglés (*Dynamic Light Scattering*). En el ANEXO R se puede observar la

distribución de tamaño de partícula obtenida mediante *DLS* de los reactivos utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas de Cu, Ag y CuAg. A todos los reactivos se les realizó un pretratamiento de filtrado y centrifugado para eliminar cualquier partícula que pudiera interferir en la medición del equipo y generar algún falso resultado. A pesar de que se obtiene una lectura de distribución y tamaño de partícula de todos los reactivos empleados, los resultados no cumplen los criterios mínimos para ser aceptados (se obtienen lecturas y señales débiles) y se entiende que son soluciones que no contienen partículas que interfieran en la evaluación de las soluciones coloidales con nanopartículas. Por otro lado, al evaluar el Tween 80 y el extracto, se evidenció que sus parámetros sí cumplieron con los requisitos mínimos establecidos y se concluye que estas soluciones presentan partículas de tamaño considerable que podrían generar interferencias en la evaluación de las soluciones con nanopartículas. A pesar del pretratamiento realizado a los reactivos, el Tween-80 presenta partículas de  $8,95 \pm 0,07$  nm, mientras que el extracto de semilla de mora presenta partículas de  $438,68 \pm 27,64$  nm. Por ello, se descartaron las mediciones de distribución de tamaño de las soluciones coloidales cuyos valores fueron cercanos a los valores observados en los reactivos (8,95 y 438,68 nm), ya que podrían representar interferencias en los valores de distribución de tamaño reales de las nanopartículas sintetizadas.

#### **5.2.1.5 Soluciones coloidales de CuNps.**

Al observar el Anexo S, el cual contiene las gráficas de distribución de tamaño de partícula de las 8 soluciones de CuNps sintetizadas, se pueden identificar de manera general que cada una de estas exhiben alrededor de dos picos de distribución de tamaño, con lo que se evidencia una clara polidispersión de las muestras. Para todas las muestras se puede observar un primer pico o dispersión en el rango de 10 nm, el cual se puede atribuir a la

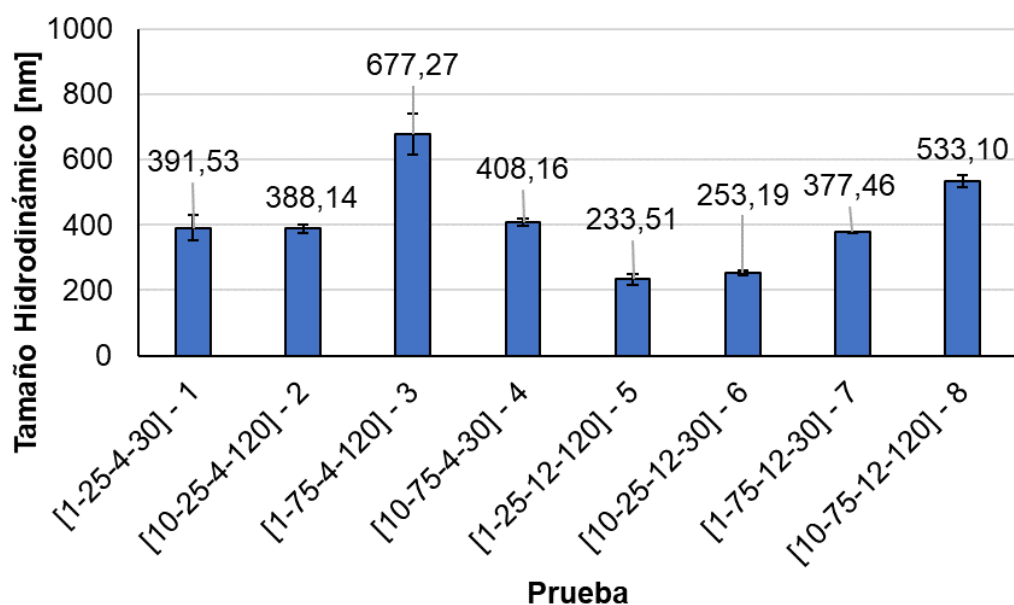
presencia del Tween-80, más que a la generación de CuNps, considerando el reducido nivel de reacción que se evidenció en el espectro de absorbancia. Esta hipótesis puede corroborarse al observar el Anexo R, en donde este reactivo presenta una distribución de tamaño similar a  $8,95\pm 0,07$  nm. Por tal razón, y tal como se explicó previamente, este primer pico es descartado y no es tenido en cuenta para posteriores análisis al deberse a una interferencia. El segundo pico o distribución que se observa en estas muestras depende de cada muestra y se encuentra entre los 100 y 1000 nm. Sin embargo, dada la poca uniformidad y gran amplitud en las repeticiones de las distribuciones de algunas de las muestras, se puede establecer estos picos tiene una menor estabilidad, al igual que una polidispersión mucho mayor, haciendo que en algunos casos las CuNps que se estén sintetizando se puedan confundir con la distribución de tamaño que se observa con el extracto de semilla de mora, el cual se encuentra alrededor de  $438,68\pm 27,64$  nm.

Teniendo en cuenta lo anterior se procedió a obtener el diámetro hidrodinámico “promedio” de las distribuciones de tamaño de los segundos picos de cada una de las soluciones de CuNps, cuyos resultados pueden observarse en la Figura 20. En esta figura se observa que los menores tamaños de partícula se obtienen de las pruebas 5 y 6 con  $233,5\pm 15,8$  y  $253,1\pm 7,7$  nm, respectivamente, caracterizadas por realizarse a pH alto (12) y %Extracto bajo [25% v/v]. Por otro lado, los mayores tamaños se obtienen de las pruebas 3 y 8 con  $677,2\pm 61,57$  y  $533,10\pm 18,73$  nm, respectivamente, caracterizadas por tener un %Extracto alto [75% v/v] y alto tiempo de reacción [120 min]. Estos resultados difieren de otros trabajos que igualmente utilizaron extracto de mora, como el de *Kumar, et al (2017)*, los cuales consiguieron nanopartículas de menores tamaños, obteniendo nanopartículas de óxido de cobre entre 43,3 nm y 52,5 nm (B. Kumar, Smita, Cumbal, Debut, et al., 2017). Sin embargo,

los autores sintetizaron estas nanopartículas tras 6 horas de reacción, sin determinar el pH, utilizando los extractos acuosos de la fruta y la hoja de esta planta, las cuales son ampliamente conocidas por contar con una mayor concentración de compuestos antioxidantes comparado con la semilla, la cual ha sido mucho menos estudiada y utilizada.

**Figura 20.**

Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuNps.



*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar.

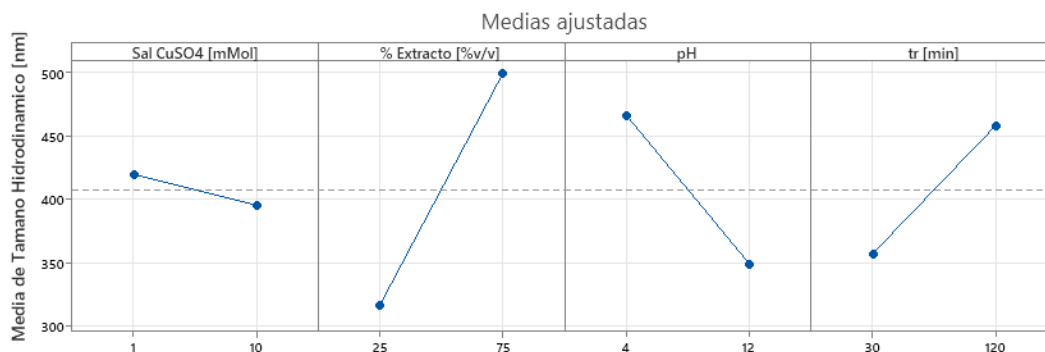
De esta manera, con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la distribución y tamaño de partícula para la síntesis de las soluciones coloidales de CuNps según el diseño factorial fraccionado, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. En el ANEXO T se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de

Pareto de efectos estandarizados para el tamaño hidrodinámico de las partículas en las soluciones coloidales de CuNps. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental factorial fraccionado e igualmente se evidenció que, a pesar de su baja magnitud, la única variable cuyo efecto es estadísticamente significativo es el %Extracto.

Considerando el análisis anterior, se generó la Figura 21, la cual muestra la Gráfica de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuNps. En esta figura se puede observar que el %Extracto tiene una mayor magnitud y pendiente comparado con las demás variables implicadas, donde a medida que aumenta la concentración del extracto en la reacción aumenta el tamaño de partícula de la solución coloidal. Teniendo en cuenta los resultados del DLS del Tween 80 y el extracto de SM de forma individual, al igual que al no evidenciarse el espectro de absorbancia UV-Vis característico de las soluciones coloidales de Cu, los resultados del tamaño de partícula pueden deberse al aparente bajo efecto de reacción del extracto de SM en la generación de CuNps, por lo que, según lo anteriormente observado en los Anexos F y G, las partículas observadas en la medición de DLS estarían relacionadas con las partículas de gran tamaño de este mismo extracto que no fue posible filtrar, y no a la presencia de CuNps.

***Figura 21.***

Graficas de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuNps.



### 5.2.1.6 Soluciones coloidales de AgNps.

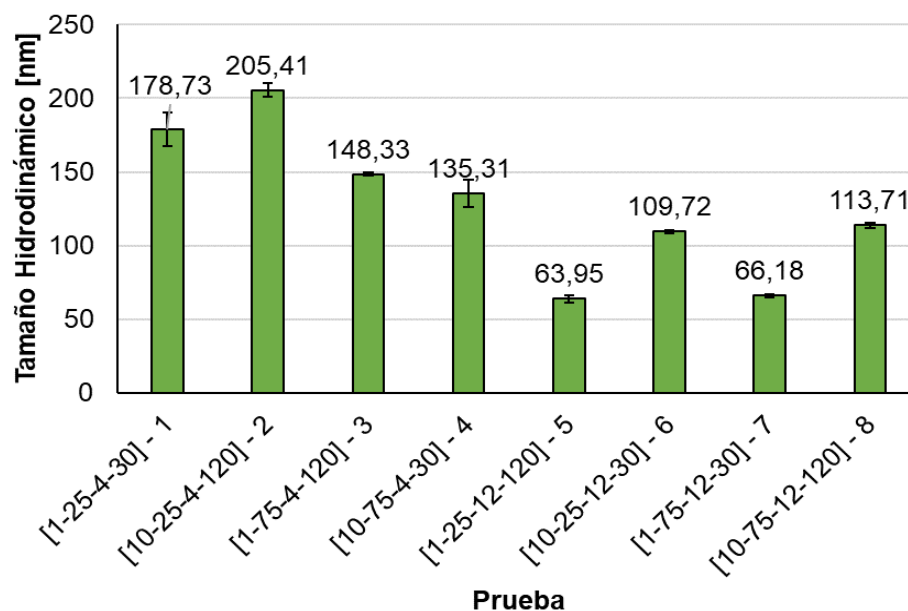
En el Anexo U se puede observar la distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de AgNps en donde, a diferencia de las soluciones coloidales de cobre, se evidencia una mayor uniformidad en las repeticiones de cada una de las muestras, lo cual les atribuye mayor estabilidad. Así mismo, se identifican dos distribuciones de tamaños en cada uno de los tratamientos. La primera distribución, de aproximadamente 10 nm, como se explicó anteriormente, se relaciona con la presencia del Tween 80, mientras que la segunda, entre los 60 y 200 nm, estaría relacionada con las AgNps. En esta distribución no se presentaron las partículas del extracto de SM ( $\approx 400$  nm), por lo que se consideró que éste no estaría generando interferencia en dicha medición. Por lo anterior, y al igual que las soluciones coloidales de Cu, únicamente se tiene en cuenta esta segunda distribución de partículas para los cálculos posteriores.

De esta manera, se procedió a obtener el diámetro hidrodinámico promedio de las distribuciones de tamaño de los segundos picos de los tratamientos para las soluciones de Ag, cuyos resultados pueden observarse en la Figura 22. En esta figura se puede observar que los menores resultados se evidencian en las Pruebas 5 y 7 con  $63,9 \pm 2,6$  y  $66,1 \pm 1,1$  nm, respectivamente, caracterizados por tener el pH más alto (12) y la concentración de sal más baja [1 mMol], mientras que los mayores tamaños se observan en las pruebas 1 y 2 con

178,7±11,3 y 205,4±4,5, respectivamente, caracterizados por tener el pH más bajo (4). Resultados similares se obtuvieron en el trabajo de *Kumar, et al (2017)*, los cuales consiguieron nanopartículas de Ag de 146,3 nm a través del extracto de la fruta de esta misma planta, aunque bajo condiciones de síntesis y extracción diferentes (B. Kumar, Smita, Cumbal, & Debut, 2017). A diferencia del presente trabajo, los autores del estudio relacionado realizaron la síntesis con una relación de %Extracto de 10%, 1 mMol de AgNO<sub>3</sub> a temperatura ambiente tras 14 días de reacción. De manera similar, *Nadagouda et al., (2014)* obtuvieron AgNps con tamaños entre 25 y 150 nm al mezclar 9 mL de extracto de fruta de mora [85% p/v] y AgNO<sub>3</sub> a temperatura ambiente por 24 horas (Nadagouda et al., 2014).

**Figura 22.**

Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de Ag.



*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar.

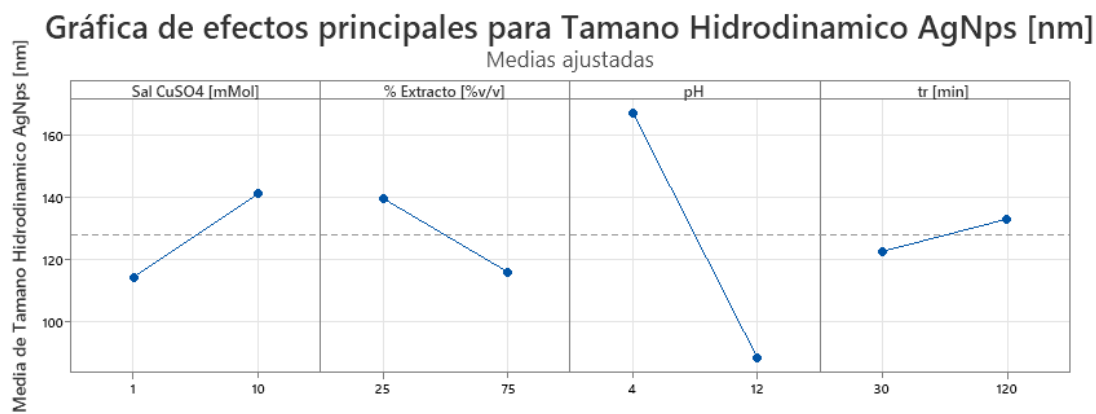
Con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la distribución y tamaño de partícula para la síntesis de las soluciones coloidales de Ag según el diseño factorial fraccionado, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. En el ANEXO V se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el tamaño hidrodinámico de las partículas en las soluciones coloidales de Ag. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental factorial fraccionado y se evidenció que todas las variables analizadas presentan un efecto estadísticamente significativo para el tamaño hidrodinámico de las partículas en las soluciones coloidales de Ag, siendo el pH la variable que ejerce una mayor influencia. Así mismo, todos sus efectos principales e interacciones mostraron ejercer una respuesta estadísticamente significativa sobre dicha característica.

Considerando el análisis anterior, se generó la Figura 23, la cual muestra la Gráfica de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de Ag, mientras que en el Anexo V además se muestran los efectos de sus interacciones. En esta figura se puede observar que al disminuir la [Sal metálica], al igual que el tiempo de reacción, disminuye el tamaño de partícula, efecto igualmente observado al aumentar las variables %Extracto y pH. En el caso de las interacciones entre variables, se observa que, sin importar la concentración de la sal metálica evaluada, cuando el %Extracto y el pH están en sus valores altos se obtienen los menores tamaños de partícula. En el caso del tiempo de reacción, no hay un cambio significativo del tamaño de partícula en tiempos

bajos, mientras que en tiempos de reacción altos se mantienen valores pequeños de tamaño de partícula únicamente cuando la concentración de la sal metálica es baja.

**Figura 23.**

Gráficas de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de Ag.



Esta fuerte influencia del pH fue observada igualmente en otros trabajos en donde se sintetizaron AgNps mediante reacciones en condiciones más estables y controladas. *Fernando y Yan Zhou (2019)* manifestaron que la formación de Nps se ve afectada negativamente cuando se utiliza pH ácido y neutro debido a fenómenos de agregación y disolución haciendo que las partículas se desestabilicen como resultado de una mayor velocidad de agregación. Por otro lado, en condiciones alcalinas, las partículas se estabilizan debido a la presencia de iones hidroxilo, lo cual genera suspensiones más estables (*Fernando & Zhou, 2019b*). *Dong et al (2019)* realizaron un estudio en el que hallaron que el pH del medio de reacción, tras reducción química, controlaba tanto el tamaño como la morfología de las AgNps sintetizadas por ellos, en donde el incremento del pH de 8.3 a 11.3 reduce el tamaño de las AgNps de 96 nm a 30 nm, observando el efecto contrario al disminuir el pH, atribuyendo este efecto principalmente a la lenta nucleación y crecimiento de las nanopartículas (*Dong et al., 2009b*).

De manera similar al efecto del pH, se evidencia que el aumento en el %Extracto promueve la disminución del tamaño de partícula, el cual podría estar influenciado al aumento en la disponibilidad de compuestos antioxidantes que, a diferencia de su efecto en la sal metálica de cobre, logran una reducción exitosa de la sal metálica de plata que cuenta con un potencial de reducción mayor (0.52 V para el Cu vs 0.80 V para la Ag), facilitando la generación de AgNps.

#### **5.2.1.7 Soluciones coloidales de CuAg.**

En el Anexo W se puede observar la distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de nanopartículas metálicas de CuAg en donde se puede observar que, en la mayoría de los tratamientos al igual que las soluciones coloidales de Cu y Ag, se identifican dos picos de distribución de tamaño, siendo el más pequeño de alrededor de 10 nm (atribuido igualmente al Tween 80) haciendo que únicamente se tenga en cuenta la segunda distribución de partículas para los cálculos posteriores. Así mismo, se logra observar cierta relación con las soluciones coloidales individuales de cobre y plata, dada la reducida uniformidad y estabilidad en las repeticiones de los segundos picos de cada tratamiento (similar a las CuNps), aunque más definidos y menos dispersos (similar a las AgNps).

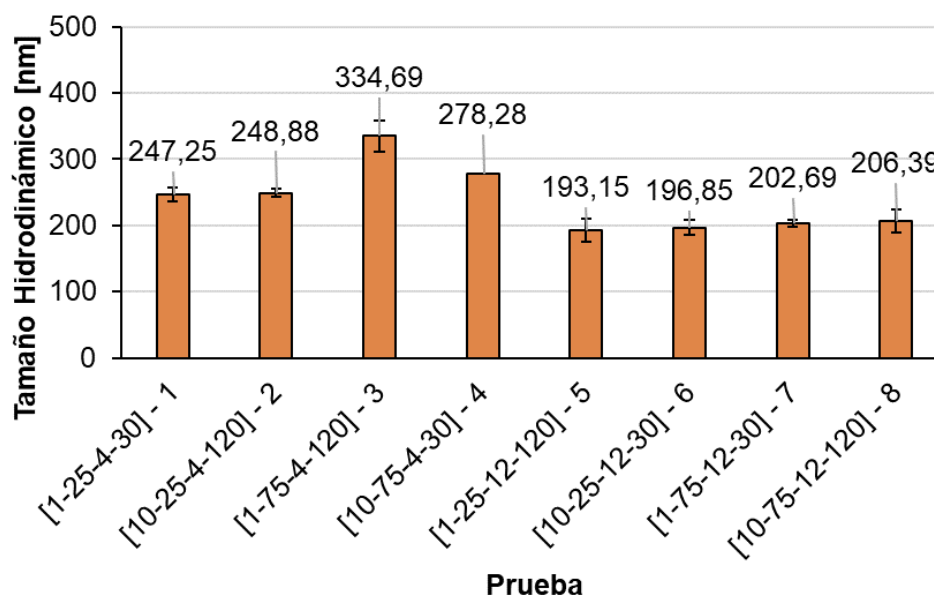
De esta manera, se procedió a obtener el diámetro hidrodinámico promedio de las distribuciones de tamaño de los segundos picos de los tratamientos para las soluciones de CuAg, cuyos resultados pueden observarse en la Figura 24. En esta figura se puede observar que los menores resultados se evidencian en las Pruebas 5 a 8 (pH 12) con un rango de tamaño entre los 193 y 206 nm, mientras que el mayor tamaño se observa en las pruebas 1 a 4 (pH 4) con un rango de tamaño entre los 247 a 334 nm. De manera similar a resultados previos, el

tamaño de partícula se observa estrechamente relacionado con el pH, siendo el pH alto (12) el cual fomenta una menor magnitud de esta propiedad.

A pesar de que no se encuentran estudios de síntesis de nanopartículas de cobre y plata utilizando extracto de semilla de mora como agente reductor, otros estudios han obtenido satisfactoriamente este tipo de nanopartículas en solución mediante diferentes condiciones y extractos empleados para su síntesis. Valodkar et al., (2011) estudiaron aleaciones de CuAgNps, sintetizadas mediante microondas (90 s) en medio acuoso usando nitrato de cobre y plata como sales metálicas [10 mMol], ácido ascórbico [10% p/v] como agente reductor y almidón [1% v/v] como estabilizante, en una relación de Cu:Ag de 1:1, obteniendo distribuciones de partícula monodispersas entre 30 y 55 nm; sin embargo, según los autores estas soluciones fueron estables por pocos días debido a la amplia diferencia entre los parámetros de red de ambos metales y la tendencia del cobre a oxidarse en medio acuoso.

***Figura 24.***

Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuAgNps.



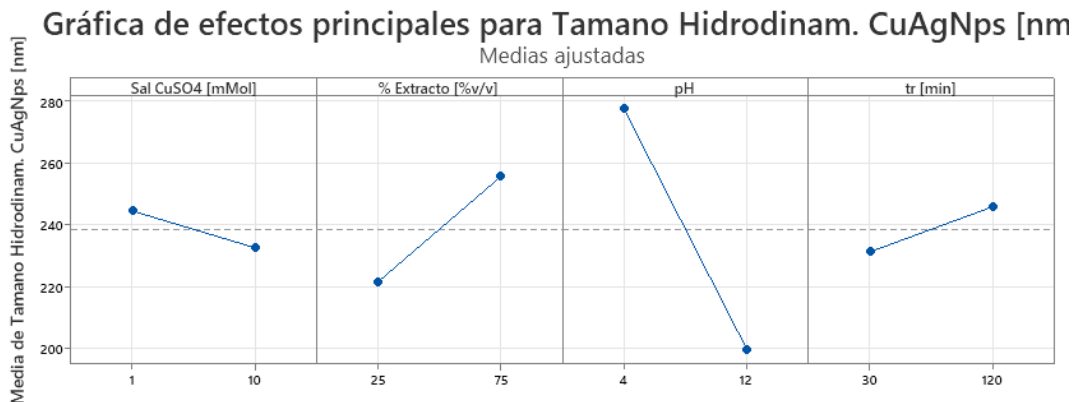
*Nota:* \*Las condiciones de síntesis son representadas por [Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min]] - #Prueba. Los resultados representan el promedio de las réplicas y su desviación estándar.

Con el fin de determinar las variables cuyos efectos representan una mayor contribución a la distribución y tamaño de partícula para las síntesis de las soluciones coloidales de CuAgNps según el diseño factorial fraccionado, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa MINITAB. En el ANEXO X se pueden verificar los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia, al igual que observar el diagrama de Pareto del Tamaño de partícula hidrodinámico para la síntesis de CuAgNps. Tras la revisión de estos resultados se concluye que los supuestos son correctos, por lo que se procedió con el análisis del diseño experimental factorial fraccionado y se evidenció que todas las variables analizadas presentan un efecto estadísticamente significativo, siendo el efecto principal del %Extracto y pH, al igual que la interacción entre [Sal metálica]\*tiempo de reacción, las variables con una mayor magnitud respecto a las demás.

Considerando el análisis anterior, se generó la Figura 25, la cual muestra la Gráfica de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuAgNps, mientras que en el Anexo X además se muestran los efectos de sus interacciones. En esta figura se puede observar que a medida que aumenta el %Extracto aumenta el tamaño de partícula, mientras que ocurre lo contrario en el caso del pH, en el cual disminuye su tamaño de partícula al aumentar dicha variable. Aunque los mecanismos de reacción de las nanopartículas bimetálicas no son del todo claros, se puede observar un comportamiento muy similar al evidenciado en la revisión del tamaño de partícula de la síntesis coloidal de cobre, lo que sugiere que esta síntesis bimetálica cobre/plata es altamente influenciada por la sal de cobre y su reacción. Las aleaciones bimetálicas suelen presentar propiedades intermedias entre las nanopartículas puras, siendo que estas tendencias pueden variar dependiendo de la interacción entre sus metales reaccionantes (Valodkar et al., 2011). Por lo que se puede observar, aunque los átomos de cobren tienden a y oxidarse más fácilmente en presencia de oxígeno, este efecto pudo verse mitigado debido a la presencia de la plata la cual presenta una mayor estabilidad, contribuyendo a la estabilidad general de la reacción.

***Figura 25.***

Graficas de efectos principales del Tamaño hidrodinámico obtenido mediante DLS para las soluciones coloidales de CuAg.



### 5.2.1.8 Actividad 2.3 Maximización de formación de Nps, Minimización de tamaño de partícula y Estabilidad coloidal

En el ANEXO Y se pueden observar las gráficas de optimización de las variables correspondientes a la maximización de la presencia de nanopartículas (absorbancia) y la minimización del tamaño de partícula de cada solución coloidal. Así mismo, en este anexo se encuentran los modelos matemáticos de primer orden que representan el comportamiento de dichas respuestas. A partir de estos modelos y gráficas se determinó que, para todos los casos de sales metálicas, las variables de operación a las cuales se obtienen los mayores valores de absorbancia mientras que también se obtienen los menores tamaños de partícula se encuentran a una concentración de Sal metálica de 10 mMol, un %Extracto de 75%, pH de 12 y tiempo de reacción de 120 min.

Así mismo, y con el fin de analizar la estabilidad coloidal de las anteriores soluciones, se hicieron mediciones de absorbancia y distribución de tamaño de partícula de estos tratamientos tras 30 días de almacenamiento. Los resultados de estas pruebas se pueden observar en las siguientes tablas:

**Tabla 10.**

Comparación de los resultados de absorbancia de cada síntesis coloidal tras un mes de almacenamiento.

Sal metálica	Absorbancia [a.u]		Valor-p	% Diferencia
	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 30</i>		
<b>Cu</b>	0,52 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,05	-27%
<b>Ag</b>	114,76 ± 3,06	114,09 ± 1,48	0,81*	-
<b>CuAg</b>	41,50 ± 0,24	34,88 ± 3,09	0,05	-16%

Nota: (\*) Valores-p mayores a 0,05 de respuestas que no representan diferencias estadísticamente significativas tras 30 días de almacenamiento.

**Tabla 11.**

Comparación de los resultados de tamaño de partícula de cada síntesis coloidal tras un mes de almacenamiento.

Sal metálica	Tamaño hidrodinámico [nm]		Valor-p	% Diferencia
	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 30</i>		
<b>Cu</b>	533,10 ± 202,45	429,42 ± 72,14	0,71*	-
<b>Ag</b>	113,71 ± 1,71	119,31 ± 11,63	0,57*	-
<b>CuAg</b>	206,39 ± 17,09	96,04 ± 7,93	0,05	-53%

*Nota:* (\*) Valores- $p$  mayores a 0,05 de respuestas que no representan diferencias estadísticamente significativas tras 30 días de almacenamiento.

En las tablas previas se puede evidenciar que, al observar los *valores-p* iguales o menores a 0,05, las síntesis coloidales que presentaron diferencias estadísticamente significativas son las de la respuesta de absorbancia de las soluciones de CuNps y CuAgNps con una disminución de su magnitud en 27 y 16%, respectivamente. De manera similar, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la estabilidad del tamaño hidrodinámico de la síntesis coloidal de CuAgNps con una disminución del 53% de su tamaño tras un mes de almacenamiento. Estos resultados demuestran la alta estabilidad de las AgNps individuales, mientras que las CuNps muestran ser poco estables, por lo que la síntesis de Nps a partir de la sal bimetalica será afectada de la misma manera. Aunque el tamaño hidrodinámico de las CuNps no presente diferencias estadísticamente significativas para la estabilidad de esta, esto es debido a la alta variabilidad de estas muestras evidenciado en su desviación estándar. El extracto de mora al igual que el tensoactivo utilizado en la síntesis, no serían suficientes para realizar una reducción exitosa del cobre al igual que su estabilización, mientras que, por el contrario, logran una reducción y estabilización exitosa de los iones de plata.

### ***5.2.2 Determinación de las características morfológicas, tamaño y composición de las soluciones coloidales***

En la mayoría de la literatura consultada las caracterizaciones fueron realizadas a los sólidos precipitados de nanopartículas mas no a soluciones coloidales de estas síntesis, el cual fue una de las primeras dificultades encontradas en la caracterización de las muestras del presente proyecto. Por otro lado, otros trabajos recomendaban la realización de etapas previas

de centrifugación y lavado de las nanopartículas que se encuentran en estas soluciones, sin embargo, tras aplicar dichas metodologías se observó que las partículas se aglomeraban significativamente, además de evidenciarse su incapacidad de solubilizarse nuevamente, afectando y dificultando su caracterización y aplicación. Por lo anterior, se decidió caracterizar las soluciones coloidales sin pasar por etapas previas de centrifugación y lavado, siendo estas analizadas directamente tras dejarse secar a temperatura ambiente por 24 horas (SEM).

#### **5.2.2.9 Caracterización Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

Después de determinar la presencia y los tamaños de las partículas presentes en las soluciones coloidales mediante la observación de los cambios de color de las soluciones y las técnicas de caracterización por espectrofotometría Uv-Vis y DLS, se procedió a determinar la morfología de estas partículas mediante el análisis de las micrografías por SEM. En las Figuras 26, 27 y 28 pueden observarse las morfologías mediante las micrografías SEM a diferentes resoluciones de las soluciones coloidales de cobre, plata y cobre/plata, respectivamente. En todos los casos, al analizar las imágenes mediante los detectores para electrones secundarios (SE) (Figuras 26, 27 y 28 - A) y retrodispersados (BSE) (Figuras 26, 27 y 28 - B), se puede observar una capa que recubre la muestra, la cual puede deberse a los compuestos orgánicos del extracto de semilla de mora, al igual que del Tween 80, como surfactante y tensoactivo utilizado para ayudar en la estabilización de las muestras. Así mismo, y a pesar de que las muestras se revistieron con una capa de oro para mejorar su conductividad previendo la posible interferencia de los compuestos orgánicos presentes en las soluciones coloidales, esta misma disminución en la conductividad por estos compuestos

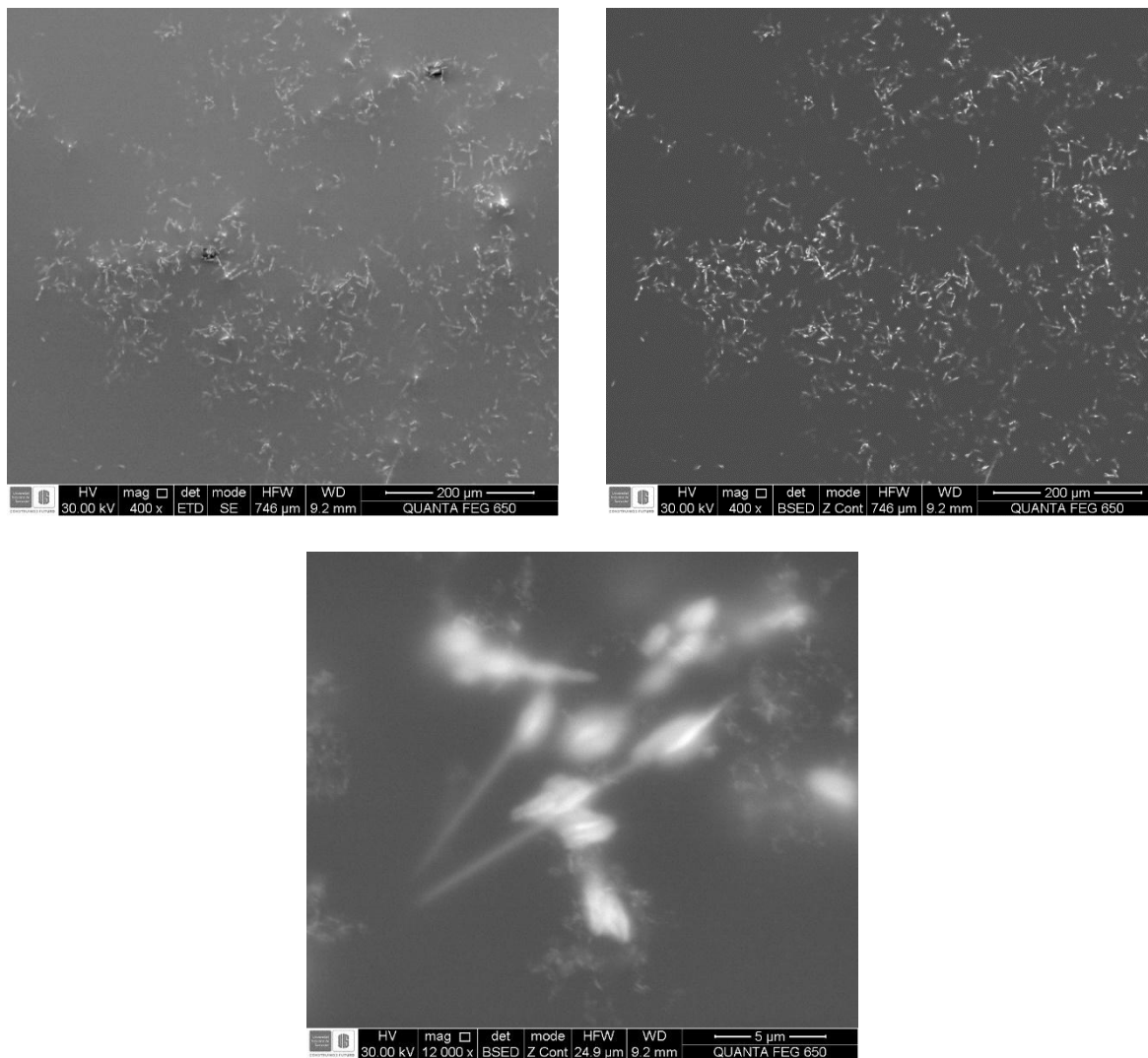
orgánicos dificulta la observación clara de las formas de las nanopartículas en aumentos mayores, visualizados en las Figuras 26, 27 y 28-C.

En la Figura 26-C, correspondiente a la solución coloidal de cobre, se observan partículas de varios micrómetros ( $\mu$ ) de tamaño, sin embargo, también se evidencia la presencia de partículas de menor dimensión que se encuentran en la parte más profunda de la muestra. En los ítems anteriores se observó la presencia de partículas de dimensiones menores a 1  $\mu\text{m}$  en las soluciones coloidales de cobre mediante DLS, las cuales son comparables con las partículas que se encuentran en la parte más profunda de esta figura. No obstante, debido a las limitaciones de SEM como técnica de caracterización, como a las características poco conductivas de la muestra de la solución coloidal de cobre, estas partículas de menor dimensión no pueden visibilizarse claramente y no se logra definir su forma. Como se explicó en el anterior capítulo, *Kumar et al.*, (2017) lograron sintetizar exitosamente CuNps analizando diferentes concentraciones de extracto acuoso de fruta y hoja de mora, sin embargo, estos autores analizaron estas nanopartículas mediante TEM, observando que estas se encontraban aglomeradas y presentaban una morfología mayoritariamente esférica con un tamaño medio de partícula entre 45 y 53 nm (B. Kumar, Smita, Cumbal, Debut, et al., 2017). Como se explicó anteriormente, los resultados de estos autores distan del presente trabajo debido a las diferencias en las condiciones de extracción (parte de la planta, temperatura y tiempo extracción) y síntesis de nanopartículas (tiempo de extracción y composición del extracto), al igual que la diferencia de capacidad entre TEM y SEM y las capacidades de sus equipos de caracterización.

### **Figura 26.**

*Micrografías SEM a diferentes resoluciones de la solución coloidal de cobre. A) Aumento a*

*400x con detector ETD (200  $\mu\text{m}$ ). B) Aumento a 400x con detector BSED (200  $\mu\text{m}$ ). C) Aumento 12.000x con detector BSED (5  $\mu\text{m}$ ).*



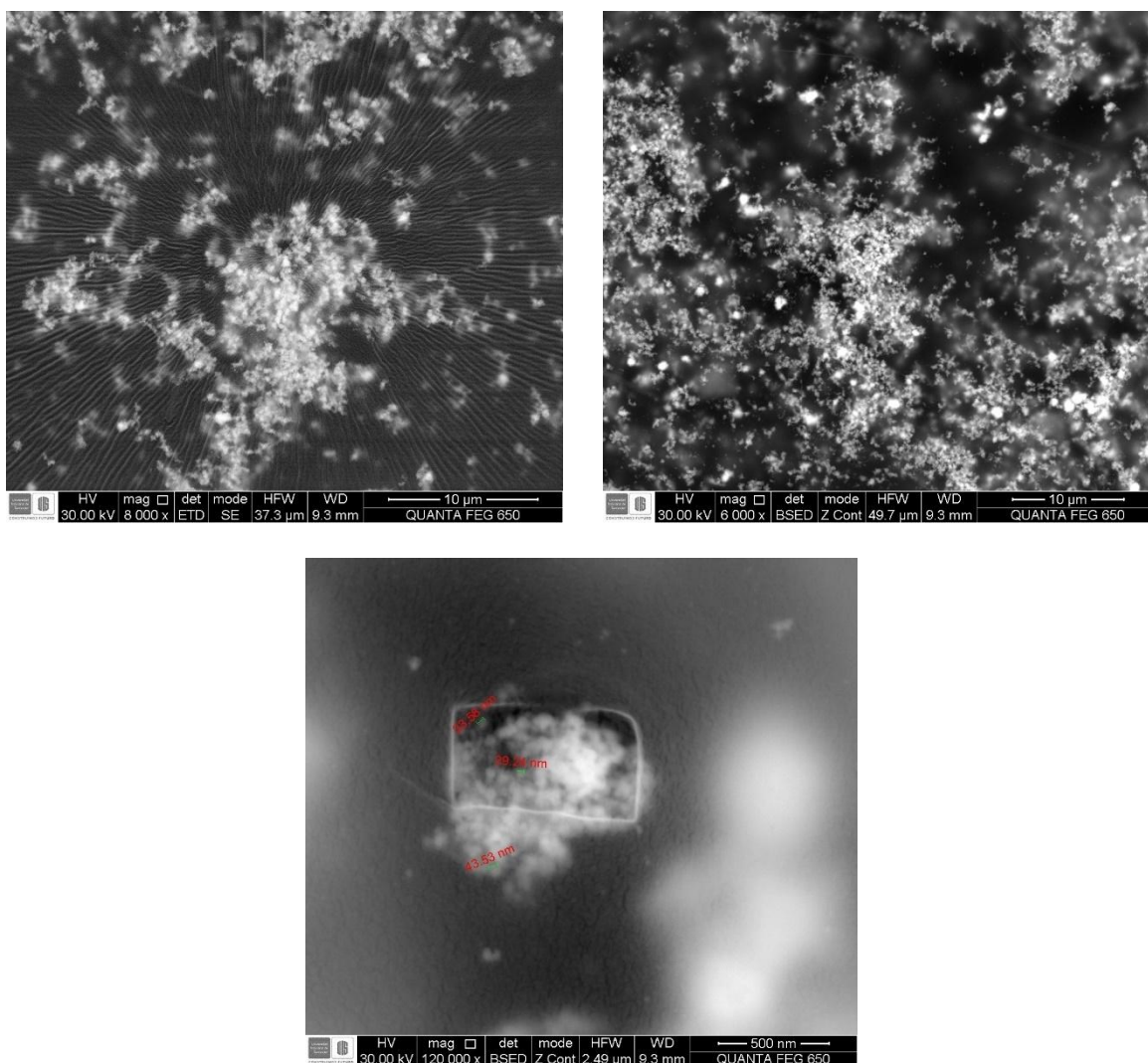
Por otro lado, las muestras de las soluciones coloidales de plata evidenciaron una mejora en la calidad de las imágenes de SEM ligada muy posiblemente a la mejora de la conductividad de la plata, siendo que se lograron mayores aumentos en las micrografías respecto a las muestras de las soluciones de cobre. En las Figuras 27 A y B se evidencia la clara aglomeración de estas partículas en esta solución coloidal. Así mismo, en la Figura 27-C se observan partículas de tamaños menores a 500 nm, específicamente de 29,24 nm, 33,58

nm y 43,53 nm. Estos valores se diferencian de los obtenidos en este trabajo mediante DLS (113,71 nm), debido a que estas técnicas tienen diferencias en sus principios de medición, siendo que DLS tiene en cuenta el diámetro hidrodinámico de partículas perfectamente esféricas, además de otros compuestos, moléculas o cargas que puedan generar capas externas en las partículas, haciendo que los compuestos que estén en los alrededores, además de la posible aglomeración de partículas, generen tamaños más grandes a los observables mediante otras técnicas de caracterización como SEM o TEM. En la figura se observa que, tras la exposición de la muestra al haz de electrones, se descompone una capa superficial dejando la muestra más expuesta. Esta capa podría componerse principalmente de materia orgánica como los extractos de plantas, y su descomposición debido al haz de electrones estaría generando compuestos carbono-hidrogeno que provocan acumulación de cargas que disminuyen la calidad de las imágenes del SEM (Soong et al., 2012). Al igual que ocurre con las soluciones coloidales de cobre, estas partículas de menor dimensión no pueden visibilizarse claramente, sin embargo, la mejora en la resolución de la imagen permite inferir, además de sus dimensiones, que estas partículas podrían tener una forma amorfa, ligeramente esférica. *Kumar, et al (2017)* sintetizaron AgNps amorfas y parcialmente esféricas mediante extracto de fruta de mora, obteniendo tamaños de partícula de alrededor de 50 nm (B. Kumar, Smita, Cumbal, & Debut, 2017). Por otra parte, *Nadagouda et al., (2014)* obtuvieron AgNps con morfologías relativamente esféricas con tamaños entre 25 y 150 nm utilizando extracto de fruta de mora [85% p/v] (Nadagouda et al., 2014). Los autores analizaron, además del extracto de fruta de mora, otros extractos de plantas como uvas, granadilla y cúrcuma, resaltando que los tamaños y formas de las AgNps variaban significativamente entre los 5 a 200 nm, con formas desde esféricas, triangulares, amorfas, o una combinación de éstas

dependiendo de, además de las condiciones de síntesis, la concentración, el tipo de extracto utilizado y su metodología de extracción previa, siendo éste evidentemente influenciado por la capacidad antioxidante de los compuestos de estos extractos.

**Figura 27.**

*Micrografías SEM a diferentes resoluciones de la solución coloidal de plata. A) Aumento a 8.000x con detector ETD (10 µm). B) Aumento a 8.000x con detector BSED (10 µm). C) Aumento 120.000x con detector BSED (500 nm).*

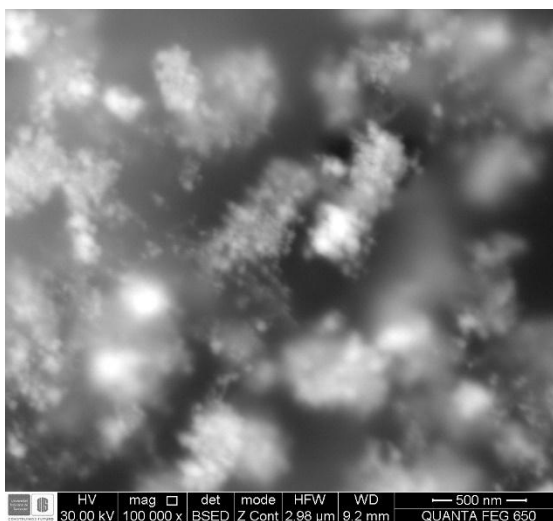
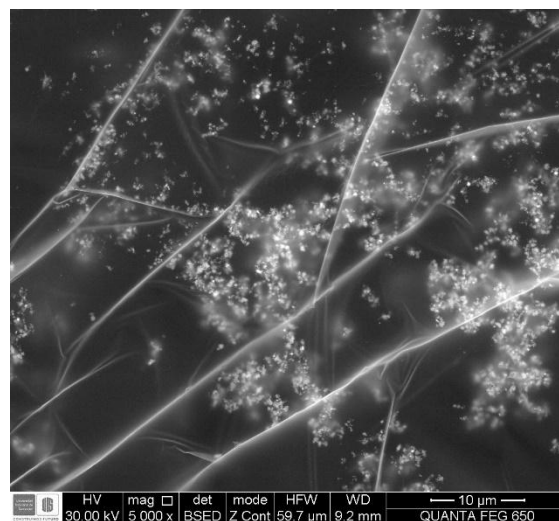
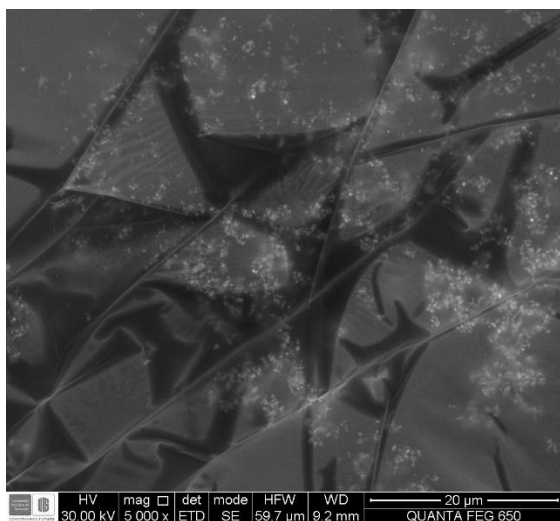


De manera similar a las AgNps, las muestras de las soluciones coloidales de cobre/plata evidenciaron una mejora de calidad en las imágenes de SEM. Esta solución obtuvo características intermedias entre sus metales constituyentes, siendo que en ésta se logran micrografías con mayores aumentos a los logrados en las soluciones de cobre individual, pero no se logran identificar debidamente los tamaños de estas nanopartículas, como sí se logra en las soluciones de plata. Para corroborar lo dicho anteriormente, en la Figura 28-C se evidencian partículas aglomeradas de tamaños menores a 500 nm, sin lograr identificar claramente su morfología o determinar su tamaño específico. Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante DLS, se comprueba la polidispersión de esta solución. Al igual que con las soluciones de plata y cobre individuales, se conjetura que estas son nanopartículas amorfas, semejantemente esféricas. *Hikmah., et al* (2016) analizaron el efecto de la proporción molar en la síntesis y morfología de nanopartículas de cobre y plata preparadas por el método polyol utilizando Tween 80 como estabilizante, en donde evidenciaron que al aumentar la concentración de cobre en esta síntesis hasta en un 40%, dificultaba la identificación individual de las partículas al igual que la lectura de las micrografías, esto debido a la reacción de reducción incompleta de los iones de cobre para formar nanopartículas (*Hikmah et al., 2016*). En ese mismo estudio se observó que a menores concentraciones de cobre, entre 20% y 30%, se obtenían micrografías SEM claras y los análisis por DRX identificaban claramente los compuestos de cobre y plata, mientras que a 40% se obtenían respuestas de la plata únicamente mas no del cobre. De manera similar, *Khan y Obaid., (2016)* evaluaron el efecto de diferentes relaciones molares entre Ag y Cu para la síntesis de CuAgNps mediante Cisteína, en donde confirmaron el impacto significativo de la relación Ag/Cu en la morfología y propiedades ópticas de las nanopartículas bimetálicas (*Khan &*

Obaid, 2016). Los autores observaron que dichas propiedades mejoraban significativamente con el aumento en la concentración de iones de plata, facilitando el análisis de estas muestras mediante SEM y Uv-Vis y evidenciando una mayor monodispersión de estas nanopartículas al igual que fomentaba la homogenización en su morfología haciéndolas claramente esféricas.

### Figura 28.

*Micrografías SEM a diferentes resoluciones de la solución coloidal de cobre/plata. A) Aumento a 5.000x con detector ETD (20  $\mu\text{m}$ ). B) Aumento a 5.000x con detector BSED (10  $\mu\text{m}$ ). C) Aumento 100.000x con detector BSED (500 nm).*



#### 5.2.2.10 Espectroscopía de energía dispersa (EDX).

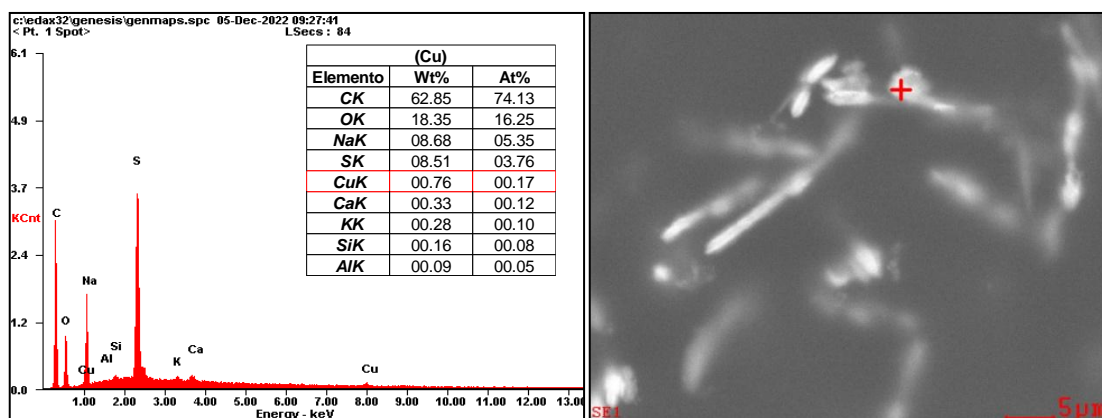
Cada una de las soluciones coloidales sintetizadas se sometió a EDX combinado con SEM para evaluar la detección elemental de sus metales relacionados. En estas pruebas, el análisis elemental mediante EDX describe el porcentaje atómico/peso (At/Wt%) de todos los elementos que están presentes en las muestras. En las Figuras 29, 30 y 31 pueden observarse los espectros EDX junto a las micrografías SEM de las muestras de las soluciones coloidales de cobre, plata y cobre/plata, respectivamente.

En la Figura 29 se puede observar el espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de cobre, en donde se identificaron elementos como carbono, oxígeno, sodio, azufre, cobre y otros compuestos en menor concentración. En esta figura se logra resalta la baja presencia de Cu (<1 At%), corroborando los resultados previos en Uv-Vis en donde no se observaron los picos representativos de las CuNps y estaría relacionado con la baja eficiencia de reacción de reducción de los extractos sobre este metal. Por el contrario, se observan picos de alta intensidad que confirman la amplia presencia de C (74,13 At%) y O (16,25 At%), los cuales estarían relacionados con los compuestos orgánicos del extracto de semilla de mora y del estabilizante Tween 80, ricos en moléculas de carbono, así como polifenoles, azúcares y otros compuestos orgánicos en el caso del extracto (Asghar & Asghar, 2020; Kaume et al., 2012; Mertz et al., 2009). De manera similar, debido al bajo porcentaje presente de Cu, el O observado en la muestra además de deberse a los compuestos orgánicos podría deberse a que este se encuentra en su forma oxidada (CuO) (Bhagathsingh & Nesaraj, 2013). Otros compuestos como el Na y el S se deben al uso del NaOH como regulador de pH y al CuSO<sub>4</sub> utilizado como sal metálica, respectivamente, cuyos iones aún permanecen en la solución (Na<sup>+</sup> y SO<sub>4</sub><sup>-</sup>). Elementos en menor proporción como Ca y K

podrían provenir del extracto de semilla de mora, mientras que elementos como el Si y el Al tendrían su origen de contaminación externa al momento de preparar las muestras (Asghar & Asghar, 2020).

### Figura 29.

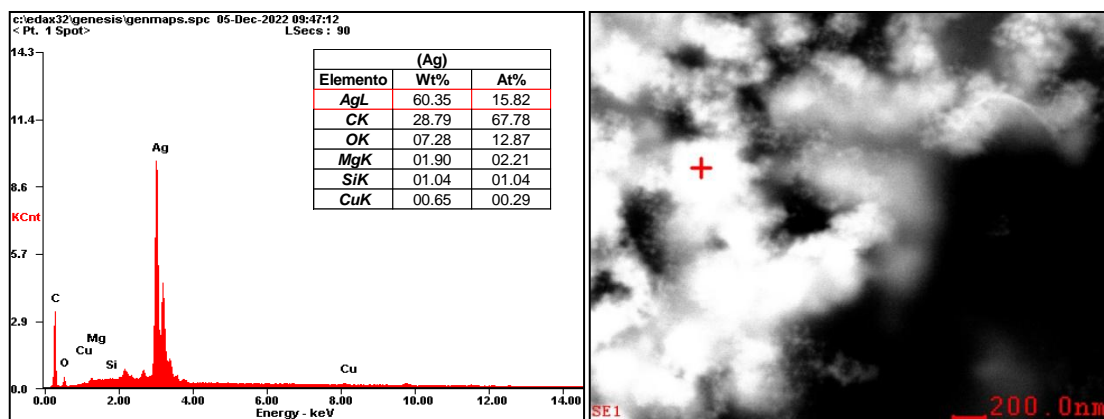
*Espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de cobre.*



A diferencia de las soluciones de Cu, las soluciones de Ag evidenciaron picos de alta intensidad que confirman la amplia presencia de Ag, igual que de C, O, Mg, Si, y Cu, los cuales se pueden observar en la Figura 30. Esta mayor presencia de Ag elemental (15,82 At%), corrobora los resultados observados en los resultados Uv-Vis en esta solución, en donde fueron claramente identificados los picos de absorbancia de las AgNps. Pequeños picos de Cu (<1 At%), en esta muestra pueden deberse a la ligera contaminación de la muestra, así como del soporte metálico en donde se encuentra la muestra para su análisis (Basavegowda & Rok Lee, 2013).

### Figura 30.

*Espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de plata.*

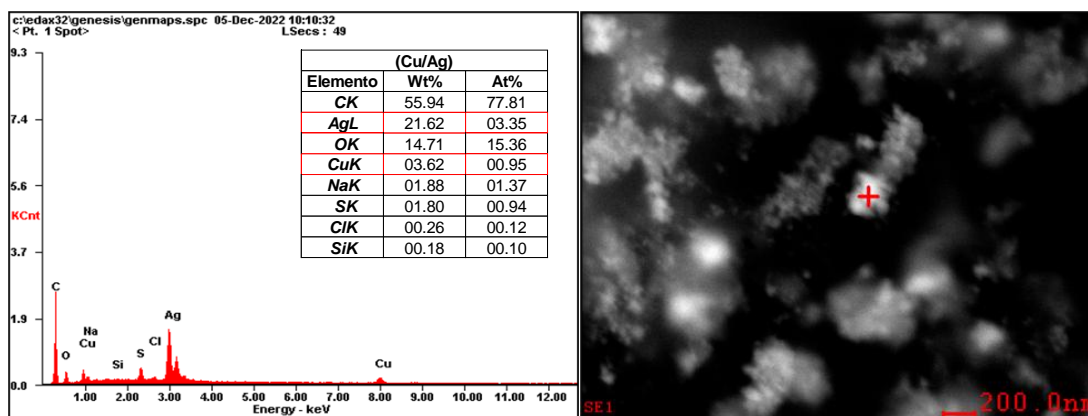


En la Figura 31 se observa el espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de cobre/plata. En esta muestra se logran identificar los picos de intensidad del C, Ag, O y Cu, seguido en menor intensidad de Na, S, Cl y S. Así mismo, la presencia de Ag elemental (3,35 At%) y Cu elemental (0,95 At%), corrobora los resultados observados en los resultados Uv-Vis en esta solución, en donde fueron claramente identificados los picos de absorbancia de las CuAgNps. Por otro lado, a pesar de que las sales metálicas de Cu y Ag fueron agregadas en la misma proporción (50:50%) y cantidad molar (10 mMol) en la reacción, se obtuvo un mayor porcentaje atómico de Ag que de Cu (3,35 vs  $\approx 1$  At%). Este efecto podría deberse a la diferencia en potenciales de reducción de  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  metálica (+0,78V) y  $\text{Cu}^+/\text{Cu}$  metálico (+0,34V), lo cual significa que los iones de Ag son más fácilmente reducidos que los iones de Cu, promoviendo una mayor cantidad de átomos de Ag presentes en la muestra. A diferencia de los resultados de las soluciones coloidales de Ag y Cu individuales, la eficiencia de reducción de iones de Ag disminuyó considerablemente (15,82 vs 3,35 At%) mientras que la de cobre aumentó ligeramente (0,17 vs 0,95 At%), aun teniendo en cuenta las diferencias molares entre la reacción individual (10 mMol) y la bimetalica (5 mMol). Este efecto pudo deberse a una reducción competitiva de los iones metálicos dada esta diferencia de potencial de reducción, la cual incrementó la velocidad de

reducción/reacción de estos mismos iones aumentando en la presencia de iones de Cu (Mohamad et al., 2013a). Sin embargo, la disminución en la disponibilidad de los agentes reductores, que fueron dirigidos hacia los iones de Cu, afectó negativamente la reacción de los iones de Ag disminuyendo su presencia en 5 veces respecto a su reacción individual.

### Figura 31.

*Espectro EDX junto a micrografía SEM de la muestra de la solución coloidal de cobre/plata.*



### 5.3. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en las caracterizaciones, basados en los efectos estadísticamente significativos de los parámetros y las condiciones evaluadas, y en la correspondiente maximización o minimización de los diseños experimentales factoriales, las variables de operación a las cuales se obtiene el mayor rendimiento de Nps (evidenciado a través de la absorbancia) al igual que los menores tamaños de partícula para todas y cada una de las síntesis de Nps de cobre, plata y plata/cobre se encuentran a una [Sal metálica] de 10 mMol, un %Extracto de 75%, pH de 12 y tiempo de reacción de 120 min.

Las soluciones coloidales individuales de AgNps fueron las únicas que evidenciaron estabilidad tras 30 días de almacenamiento en ambas propiedades, absorbancia y tamaño de partícula, mientras que las soluciones coloidales de CuNps o CuAgNps presentaron variaciones en alguna, o ambas, de estas propiedades.

Los resultados de SEM y EDX confirmaron la presencia de AgNps, al igual que corroboran el prácticamente nulo rendimiento de la síntesis de CuNps. Por otro lado, evidenciaron una mayor presencia de cobre elemental en la muestra de soluciones coloidales de CuAg, en detrimento de la presencia de plata elemental.

Finalmente, se consideró realizar las pruebas microbiológicas a estas soluciones coloidales inmediatamente después de las 48 horas de ocurrida la síntesis, con el fin de evitar una mayor variabilidad en los resultados posteriores de estas muestras.

### CAPITULO III

#### **6. Evaluación de la actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas de cobre, plata y bimetalicas de cobre/plata**

Este capítulo explora la capacidad antibacteriana de CuNps, AgNps y CuAgNps frente a la bacteria patógena de importancia clínica: *Escherichia coli* ATCC® 25922. Se llevaron a cabo pruebas *in vitro* que permiten determinar la eficacia antimicrobiana de las soluciones coloidales sintetizadas previamente, tomando en cuenta factores como la concentración de las soluciones y el tamaño de las nanopartículas.

Para evaluar la actividad antibacteriana, se aplicaron protocolos estandarizados mediante el método de microdilución en caldo de microplaca, ajustando la concentración bacteriana conforme a la escala de McFarland. Se determinó la concentración mínima inhibitoria bacteriana (CMib) de las soluciones, midiendo el crecimiento bacteriano por densidad óptica (D.O) durante el periodo de incubación. Adicionalmente, se investigaron factores que podrían influir en los resultados, como el pH final de las soluciones coloidales.

Estos análisis permitieron identificar el efecto antimicrobiano de las CuNps, AgNps y CuAgNps sintetizadas mediante extracto de semilla de mora proveniente de residuos agroindustriales como agente reductor, finalizando el ciclo de experimentación y ofreciendo una perspectiva sobre las limitaciones y el potencial de estas nanopartículas en aplicaciones antibacterianas.

## 6.1. Metodología

### 6.1.1 Materiales y reactivos

Se utilizó la siguiente cepa: *Escherichia coli* ATCC® 25922. Los demás reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico.

### 6.1.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas

Las pruebas de actividad antibacteriana fueron realizadas en el laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), cuyo objetivo está enfocado en el estudio de la actividad biológica de diferentes tipos de compuestos, incluyendo nanopartículas metálicas y extractos vegetales. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria bacteriana (CMib) de las soluciones coloidales de cobre, plata y cobre/plata mediante los protocolos estandarizados del laboratorio siguiendo la metodología descrita por *Portilla* (2024). Para ello se utilizó el método de microdilución en caldo de microplaca de 96 pozos para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las normas estándar M100, ampliamente recomendado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés)(CLSI, 2015; CLSI., 2017). Para estas pruebas se usaron 3 ml de caldo infusión Cerebro Corazón (BHI) y se llevó a incubación durante 12 h a 37°C en agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (dos réplicas biológicas) de cada una las soluciones coloidales, al igual que de los reactivos utilizados en la síntesis, tal como se observa en la siguiente tabla:

**Tabla 12.**

*Diluciones seriadas de cada una las soluciones coloidales analizadas.*

Solución coloidal	Ag y Cu/Ag	Cu
-------------------	------------	----

---

**Concentración Evaluada (% v/v)** 0,125 - 0,25 – 0,50 - 1 1,25 – 2,5 – 5 - 10

---

*Nota:* Debido a la alta turbidez de las muestras, así como a que a concentraciones mayores a 1% de surfactantes como el Tween-80 podrían promover la lisis celular completa, se debieron hacer diluciones de las muestras de las soluciones tal como se muestra en la tabla (Nandakumar et al., 2000).

Después, se colocaron 100  $\mu$ L de cada dilución de la solución coloidal y 100  $\mu$ L del pre-inóculo en una microplaca de 96 pozos, ajustando la concentración entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml, según la escala de McFarland (Portilla, 2024). Para determinar la cinética de inhibición de crecimiento de cada microorganismo se realizaron mediciones de densidad óptica (D.O) cada hora durante 8 horas utilizando un lector de microplaca (Espectrofotómetro ELISA Multiskan Sky) a una longitud de onda de 595 nm. Como control de crecimiento se emplearon 100  $\mu$ L de pre-inóculo y 100  $\mu$ L de agua peptonada estéril al 0,1%. Para el control negativo, se reemplazó el pre-inóculo por 100  $\mu$ L del medio de cultivo correspondiente a cada bacteria (Cáceres et al., 2020; Cruz et al., 2014). En el ANEXO Z se encuentra la ecuación para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano.

## 6.2. Análisis y Discusión de Resultados

Inicialmente, se evaluó el pH final en el cual se encontraban las soluciones coloidales sintetizadas tras 48 horas de reposo con el fin de identificar y evitar alguna interferencia o efecto antagónico de la concentración de NaOH o del pH de dichas soluciones en las bacterias. Se determinó que el valor del pH final de las soluciones coloidales de CuNps, AgNps, y CuAgNps fue de  $6,79 \pm 0,06$ ,  $7,59 \pm 0,08$  y  $7,67 \pm 0,08$ , respectivamente. Aunque el efecto e influencia del pH en el crecimiento de las diferentes bacterias puede variar entre cepas, *E. coli*

crece exitosamente en un rango de pH entre 5 y 8, siendo el más aceptado alrededor de pH 7 (Razmi et al., 2023). De esta manera, se evidencia que el pH final de las soluciones coloidales no influenciaría o interferiría con el efecto de la actividad antimicrobiana de las soluciones coloidales sintetizadas al encontrarse en el rango del pH de crecimiento de las bacterias evaluadas.

### **6.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana en *E. coli* ATCC 25922**

#### **6.2.1.1 Soluciones coloidales de CuNps.**

En la Figura 32 se puede observar el efecto de la actividad antimicrobiana y las cinéticas de crecimiento a 37°C y 200 rpm durante 8 h, utilizando diferentes concentraciones de la solución coloidal de CuNps sobre *E. coli* ATCC 25922. Al analizar el comportamiento de la cinética de crecimiento de *E. Coli* se puede evidenciar la nula actividad antimicrobiana que presenta la solución de CuNps ante esta bacteria durante todo el tiempo de incubación, donde para todas las concentraciones se obtiene un comportamiento similar al del control (naranja). Este mismo efecto se evidencia en la Figura 33 en donde se observa el efecto de las diferentes concentraciones de las CuNps en el porcentaje de inhibición y viabilidad sobre *E. coli* ATCC 25922. Esta figura muestra que la inhibición observada en todas las concentraciones evaluadas es nula, siendo la misma evidenciada en el control negativo. El efecto anterior puede deberse a que las concentraciones evaluadas de esta solución no fueron lo suficientemente altas para evidenciar un efecto biocida, teniendo estas una concentración máxima de 10% v/v en el caso de CuNps debido al efecto antagonista del Tween-80 que podría promover la lisis celular completa de las bacterias evaluadas (Nandakumar et al., 2000). Así mismo, este limitado efecto microbiológico se debería a la imperceptible presencia

de estas nanopartículas en la solución utilizada, la cual fue evidenciada en las caracterizaciones fisicoquímicas previas.

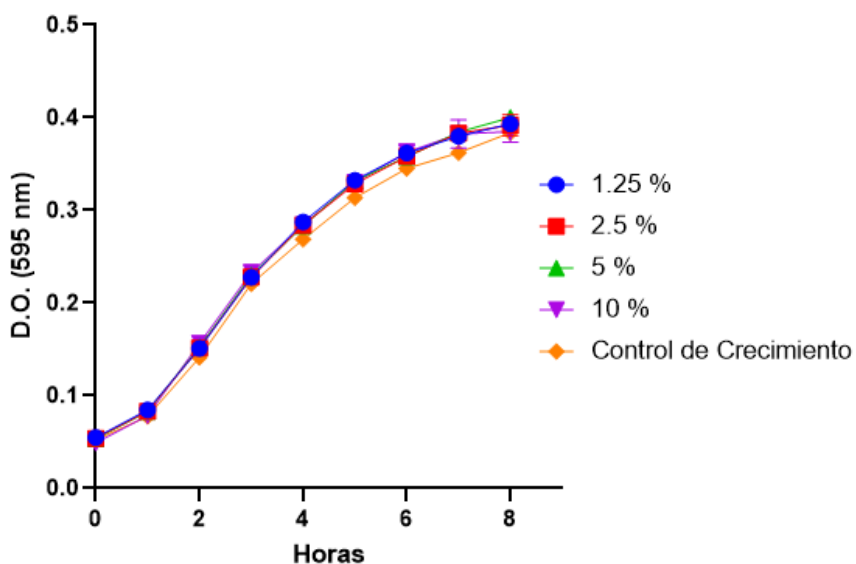
Por otro lado, *Asghar y Asghar (2020)* sintetizaron exitosamente CuNps esféricas entre 48 y 29 nm de diámetro, evaluando los extractos etanólicos de hojas de seis diferentes plantas utilizando 1 mMol de CuSO<sub>4</sub> a 80° C (*Asghar & Asghar, 2020*). Los autores confirmaron el efecto antimicrobiano de todas las CuNps, sintetizadas con cada uno de los extractos frente a distintas bacterias, entre ellas *E. coli*, siendo esta actividad variable debido a las diferencias de tamaño de las nanopartículas y el extracto utilizado para su síntesis, con un MIC entre 20 y 60 µg/ml dependiendo del microorganismo. En este estudio, las CuNps derivadas de *A. indica* fueron las más efectivas causando lisis celular tras 12 horas de exposición. Los autores sugieren que el mecanismo bactericida se genera tras la interacción de iones Cu<sup>+2</sup> con la membrana celular de las bacterias, interrumpiendo la función proteica y respiratoria. Estos trabajos también evidencian la importancia del tamaño de las CuNps en su efecto biocida, siendo las Nps de tamaño pequeño (menores a 100 nm) las de mayor actividad antimicrobiana.

Otro factor influyente en las pruebas microbiológicas es la cepa de bacteria evaluada, siendo unas cepas más sensibles a las CuNps que otras, afectando su respuesta antimicrobiana (*Ruparelia et al., 2008*). *Ruparelia et al., (2008)* evaluaron la actividad microbiana de las CuONps esféricas entre 6 y 17 nm de diámetro, obtenidas mediante síntesis química frente a cuatro cepas de *E. coli*, (ATCC 25922, 10536, 8739 y un tipo salvaje). Los autores evidenciaron diferentes sensibilidades dependiendo del tipo de cepa analizada, siendo la cepa ATCC 25922 la más sensible de todas, seguido del tipo salvaje, la ATCC 10536 y por último la cepa ATCC 8739 con MIC de 140, 200, 220 y 280 µg/ml, respectivamente. Este estudio

también fue desarrollado en AgNps evidenciando una especificidad similar, aunque sus valores MIC fueron menores a los reportados para CuNps (40, 120, 140 y 180  $\mu\text{g/ml}$ ), al igual que sus diámetros de tamaño (12-21 nm).

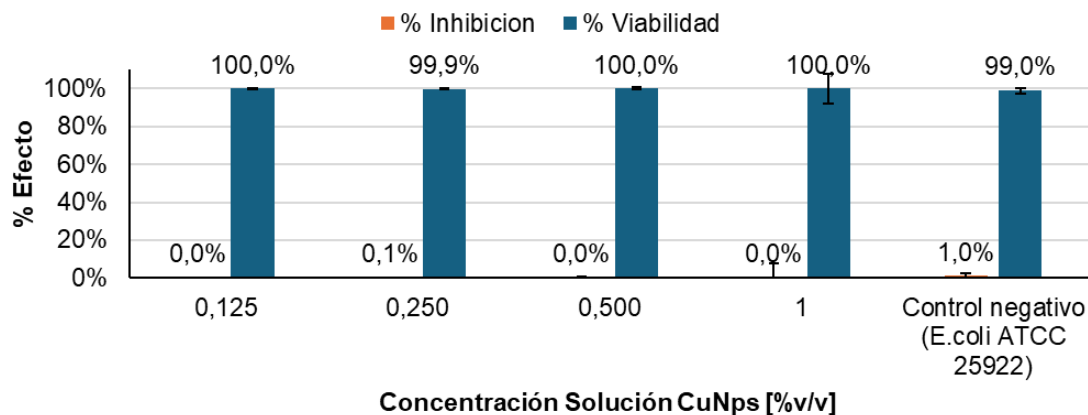
### Figura 32.

*Efecto de la aplicación de la solución coloidal de CuNps a diferentes concentraciones sobre la cinética de crecimiento de E. coli ATCC 25922 a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h de incubación.*



### Figura 33.

*Porcentaje de inhibición y viabilidad de las CuNps sobre E. coli ATCC 25922. Registro en la hora 8.*



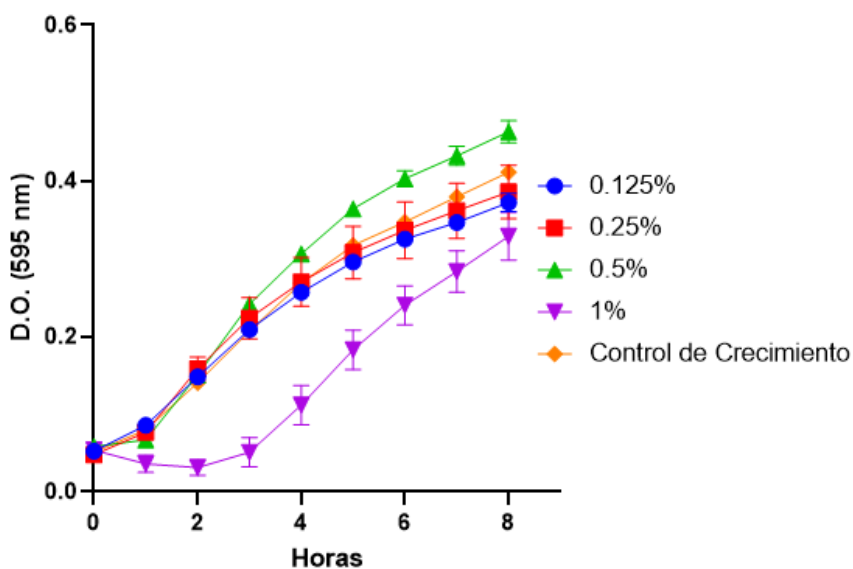
### 6.2.1.2 Soluciones Coloidales de AgNps.

En la Figura 34 se puede observar el efecto de la actividad antimicrobiana y las cinéticas de crecimiento a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h a diferentes concentraciones de la solución coloidal de AgNps sobre *E. coli* ATCC 25922. A diferencia de las CuNps, se evidencia que la solución coloidal de AgNps a la máxima concentración [1%] muestra una inhibición notable del crecimiento bacteriano durante las primeras 2 a 3 horas ( $\approx 80\%$ ). El D.O de esta solución es significativamente menor que la exhibida en el control negativo de *E. coli* ATCC 259220, con valores de 0,036 y 0,051 en la segunda y tercera hora, frente a 0,080-0,210 del control. Sin embargo, se evidencia que, a pesar de ser la mayor concentración utilizada no logra inhibir completamente esta bacteria, con lo que, después de las primeras 4 horas y tras transcurridas las 8 horas de la prueba, la D.O de la solución es similar al control de crecimiento. Para verificar lo anterior, en la figura 35 se observa el porcentaje de inhibición y viabilidad de las AgNps sobre *E. coli* ATCC 25922 en la hora 8 de la prueba microbiológica. En esta figura se evidencia que, a una concentración de 1% v/v de la solución de AgNps, esta alcanza un 23,9% de inhibición sobre *E. coli*, siendo este valor considerablemente mayor al obtenido de las demás concentraciones, las cuales correspondieron a 11,1 y 6,4% de

inhibición a una concentración de 0,123 y 0,250% v/v, respectivamente. Como consecuencia, se confirma que, aunque las soluciones coloidales de AgNps no tiene un efecto biocida sobre *E. coli* ATCC 25922, estas sí tienen un efecto inhibitorio cuando se utilizan al 1% v/v durante las primeras tres horas de tratamiento.

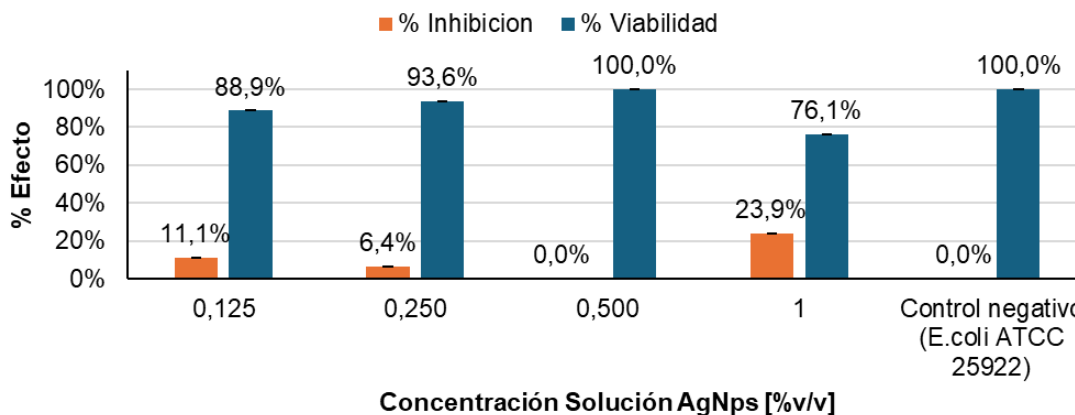
### Figura 34.

*Efecto de la aplicación de la solución coloidal de AgNps a diferentes concentraciones sobre la cinética de crecimiento de E. coli ATCC 25922 a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h de incubación.*



### Figura 35.

*Porcentaje de inhibición y viabilidad de las AgNp sobre E. coli ATCC 25922. Registro en la hora 8.*



Dentro de los factores que pueden afectar la eficacia del efecto antimicrobiano de las AgNps se encuentran la concentración, tamaño y forma de partícula, entre otros (Girma et al., 2024). Almatroudi et al., (2020) tomaron un enfoque igualmente amigable con el medio ambiente al utilizar el extracto de semillas de *Nigella sativa* junto con  $\text{AgNO}_3$  (0,1 mMol) a temperatura ambiente para la síntesis de AgNps (Almatroudi et al., 2020). Las AgNps sintetizadas mostraron forma esférica con un diámetro entre 8 y 80 nm con alta aglomeración y polidispersión. Los autores confirmaron la actividad antibacterial de estas nanopartículas al obtener valores de MIC de 15  $\mu\text{g/ml}$  para *E. coli* (MTCC 40), al igual que confirmaron que éstas reducían significativamente la generación de biofilm de éstas y otras bacterias evaluadas hasta en un 85%. Este trabajo muestra cómo en el caso de ellos se debió aumentar la concentración inhibitoria de AgNps sobre *E. coli* (MTCC 40) a más del doble para obtener el mismo efecto sobre otras bacterias, como *P. aeruginosa* (MTCC 1688), sugiriendo que la concentración de AgNps sintetizadas mediante de *Nigella sativa* pudo no ser suficiente para la observación de actividad antimicrobiana en alguna de estas bacterias. Agnihotri et al., (2014) realizaron un estudio para analizar la dependencia del tamaño y concentración de las AgNps y su efecto bacteriostático y bactericida en *E. coli* ATCC 25922 y otros microorganismos (Agnihotri et al., 2014). Estos autores analizaron tamaños de partícula entre

5 y 100 nm, evidenciando que a medida que disminuye el tamaño de las AgNps se incrementa el efecto biocida de estas partículas, siendo tamaños menores a 10 nm (20-30  $\mu\text{g/ml}$ ) los más efectivos ante esta bacteria. Sin embargo, se evidenció que, para AgNps de 100 nm, la concentración que inhibía el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 debía ser mayor a 100  $\mu\text{g/ml}$  (entre 3 y 5 veces más que para AgNps de 10 nm), demostrando así mismo la relación de tamaño/dosis-dependiente de estas soluciones coloidales. Tras analizar las bacterias tratadas en este estudio mediante FEG-TEM y SEM, *Agnihotri et al.*, (2014) observaron el encogimiento de esta bacteria e identificaron la presencia de AgNps dentro de la bacteria, en la membrana celular y adheridas a la capa de polisacáridos en la pared celular, sugiriendo que el efecto de las AgNps sintetizadas es debido a la alteración de la osmorregulación de la célula bacteriana que causaría la extrusión del material intracelular. A diferencia de estos resultados, una de las razones por las cuales se observa un reducido efecto antimicrobiano de las AgNps sintetizadas mediante semilla de mora en este estudio, podría deberse a la significativa diferencia de tamaño obtenido en las AgNps ( $113,71 \pm 1,71$  nm) que se evidenció en el apartado 6.2.1.3, y a la imposibilidad de analizar concentraciones mayores a 1% v/v de solución coloidal sintetizada. Cuando se sintetizan nanopartículas metálicas de menores tamaños, éstas se disuelven más fácilmente en diferentes medios debido a su elevada relación superficie-volumen, incrementando la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  y la producción de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés), potenciando el efecto bactericida al penetrar la pared celular de las bacterias con mayor facilidad, dañando e inactivando biomoléculas esenciales incluyendo ADN, proteínas y lípidos (Girma, 2023). De manera similar, investigaciones centradas en el estudio de los mecanismos de absorción celular de nanopartículas evidenciaron que estos mecanismos dependen igualmente del tamaño de las

AgNps (Fernández et al., 2019). *Fernández et al., (2019)* analizaron cómo las AgNps de 10 nm y 60 nm afectaban células hepáticas (HepG2), encontrando que las de menor tamaño alcanzaban el núcleo, mientras que las mayores se acumulaban en el citoplasma, afectando a la bacteria de manera diferente, a pesar de que su efecto bactericida final sea el mismo.

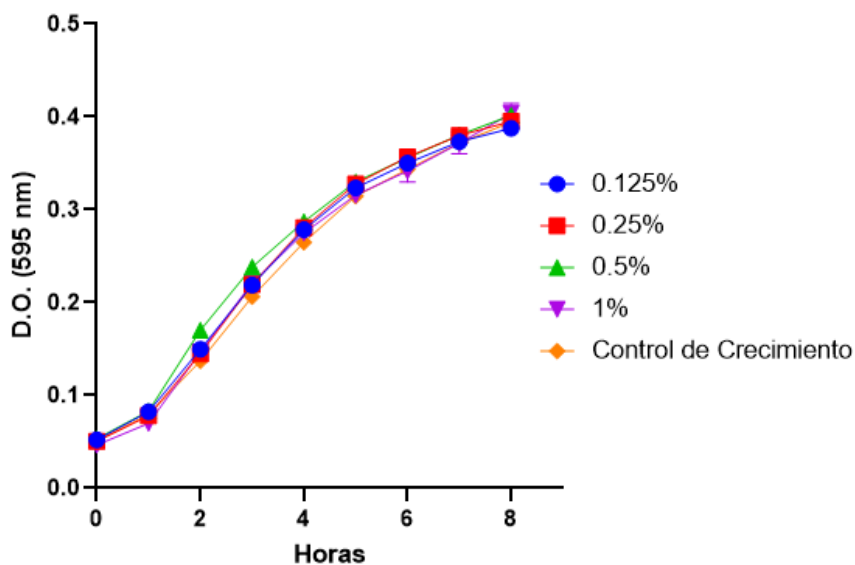
Por otro lado, se ha evidenciado que otro factor influyente en la eficacia antimicrobiana de las AgNps reside en su forma (Slavin et al., 2017b). *Cheon et al., (2019)* demostraron la actividad antibacteriana de tres diferentes formas de AgNps de tamaños similares (40-50 nm) en *E. coli*, concluyendo que el mayor efecto bactericida se observaba en las AgNps de forma esférica, seguidas de las que tienen forma de disco, y finalmente las triangulares, en mayor medida debido a sus áreas de superficie efectiva que influye en la liberación de iones de  $Ag^+$  (Cheon et al., 2019). *Pal et al., (2007)* analizaron la influencia de la forma esférica, varilla y triangulares truncadas de las AgNps en *E. coli*, observando que las triangulares truncadas eran la forma más efectiva, seguido de la forma esférica y las varillas (Pal et al., 2007a). Aunque todas evidenciaron daños en la membrana celular, los autores concluyeron que debido al mayor número de facetas, caras o superficies planas disponibles en las AgNps triangulares truncadas, éstas facilitaron la interacción, unión y absorción celular, aumentando su efectividad. Aunque la forma de las AgNps sintetizadas mediante semilla de mora no se logró identificar claramente, en el apartado 6.2.2.4 en la Figura 27 en donde se encuentran las Micrografías SEM de la solución coloidal de plata, se estima que éstas se acercan a una forma esférica, mejorando su capacidad antimicrobiana a una concentración de 1% v/v, evidenciando un efecto bacteriostático durante las primeras 4 horas de realizada la prueba microbiológica.

### **6.2.1.3 Soluciones coloidales de CuAgNps.**

En la Figura 36 se puede observar el efecto de la actividad antimicrobiana y las cinéticas de crecimiento a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h con diferentes concentraciones de la solución coloidal de CuAgNps sobre *E. coli* ATCC 25922. A diferencia del efecto microbiano de las AgNps, y al igual que en el efecto observado en las CuNps, al analizar el comportamiento de la cinética de crecimiento se puede evidenciar que la actividad antimicrobiana que presenta esta solución ante esta bacteria a las 8 horas de incubación es nula, donde para todas sus diferentes concentraciones se obtiene un comportamiento similar al del control de crecimiento (naranja). De manera similar a las CuNps, en la Figura 37 se observa el efecto de las diferentes concentraciones de las CuAgNps en el porcentaje de inhibición y viabilidad sobre *E. coli* ATCC 25922. Esta figura corrobora el reducido efecto antimicrobiano de las soluciones de CuAgNps, en donde se observó que en las concentraciones de 0,125%, 0,25% y 0,5% v/v de estas soluciones coloidales se obtienen un efecto de 3,8%, 2,5% y 1,3% de inhibición, respectivamente. Así mismo, se evidencia que las barras de error de estos resultados son lo suficientemente amplias para solaparse entre sí, y no se evidencian diferencias significativas entre ellas, concluyendo que no hay diferencia en el nulo efecto entre las concentraciones de la solución coloidal de CuAgNps.

**Figura 36.**

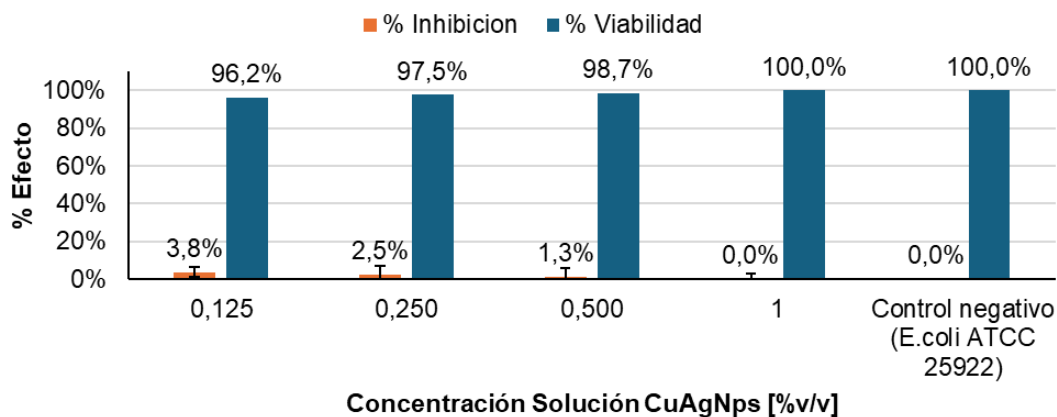
*Efecto de la aplicación de la solución coloidal de CuAgNps a diferentes concentraciones sobre la cinética de crecimiento de E. coli ATCC 25922 a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h de incubación.*



**Figura 37.**

*Porcentaje de inhibición y viabilidad de las Nps Ag/Cu 1 sobre E. coli ATCC 25922.*

*Registro en la hora 8.*



Aunque no se han encontrado estudios antimicrobianos de CuAgNps sintetizadas con extracto de semilla de mora, la literatura muestra el efecto de estas Nps en *E. coli* utilizando otros métodos de síntesis. Jayalakshmi *et al.*, (2024) sintetizaron exitosamente CuAgNps utilizando luz solar y extracto de cáscaras de maní, obteniendo nanopartículas esféricas de  $29 \pm 14$  nm que fueron efectivas contra *E. coli* a una concentración de  $156.3 \mu\text{g/ml}$

(Jayalakshmi et al., 2024). Estos autores atribuyeron su efecto biocida al daño en las membranas celulares causados por la oxidación de lípidos, debido a especies reactivas de oxígeno. *Długosz et al., (2021)* estudiaron las propiedades antimicrobianas de AgNps, CuNps y diferentes relaciones de nanopartículas bimetálicas de CuAgNps, con tamaños de 27-97 nm para las individuales (esféricas) y de 32-184 nm para las bimetálicas (aglomeradas) (*Długosz et al., 2021*). Los autores observaron que las AgNps tuvieron un mayor efecto antimicrobiano en *E. coli*, seguido de las CuAgNps (1:1) y las CuNps con valores de MIC de 10, 260 y 350 mg/dm<sup>3</sup>, respectivamente. Sin embargo, las CuAgNps presentaron un espectro de acción antimicrobiano más amplio, siendo también efectivas contra otros microorganismos como *S. aureus* y *C. albicans*, gracias a, según los autores, una sinergia entre los metales. Aunque *Valodkar et al., (2011)* hicieron un estudio similar obteniendo AgNps, CuNps y CuAgNps de forma esférica de 52 nm, 32 nm y 46 nm, respectivamente, siendo estas sintetizadas utilizando nitrato de cobre (0,01 M), AgNO<sub>3</sub> (0,01 M), ácido ascórbico (10% p/v) y fécula de maíz (1 %p/v) por 90 segundos en horno microondas, sus resultados mostraron que todas estas nanopartículas fueron efectivas frente a *E. coli*, siendo estas más sensibles a CuNps, seguido de CuAgNps y finalmente a AgNps con MIC de 0,22, 0,23 y 0,26 mg/L, relacionando su efectividad más que todo a su tamaño (*Valodkar et al., 2011*). De manera análoga, *Reyes-Blas et al., (2020)* realizaron un estudio similar sintetizando AgNps, CuNps y CuAgNps (1:1), con tamaños de 10 nm para las nanopartículas individuales (esféricas) y de 12 nm para las bimetálicas (irregulares) (*Reyes-Blas et al., 2020*). Aunque las nanopartículas individuales mostraron efectos específicos según el tipo de microorganismo evaluado, las CuAgNps mostraron mayor efectividad en *E. coli* con un MIC de 60 µg/ml en comparación con las nanopartículas individuales y demostraron un espectro antimicrobiano más amplio. *Valdez-*

*Salas et al.*, (2021) sintetizaron CuAgNps aglomeradas con morfología esférica con dos tamaños de partícula definidos (70 y 100 nm), mediante la co-reducción de nitrato de cobre y nitrato de plata, con ácido ascórbico (0,45 M) como agente reductor (10 mMol), y evaluaron el efecto en *E. coli* ATCC 25922, entre otras bacterias (Valdez-Salas et al., 2021). Los autores confirmaron la dosis-dependencia para todos los modelos bacterianos evaluados para ambos tamaños de CuAgNPS siendo *E. coli* ATCC 25922 la segunda batería más sensible con MIC de 125 y 500  $\mu\text{g/ml}$ . Este mismo estudio mostró que a bajas dosis (15,6  $\mu\text{g/ml}$ ) ambos tamaños de CuAgNps tienen una acción antimicrobiana reducida similar, independientemente de su tamaño (porcentaje de inhibición menor al 20%). En este caso, al duplicar esta concentración inicial (31,2  $\mu\text{g/ml}$ ), las CuAgNps más pequeñas (70 nm) fueron significativamente más efectivas que las de mayor tamaño (100 nm), aumentando la inhibición celular en un 60%, evidenciando la influencia del tamaño de partícula de las CuAgNps en su efecto antimicrobiano. Dados los tamaños observados en las CuAgNps sintetizadas mediante el extracto de semilla de mora (206,39 $\pm$ 17,09 nm), la reducida presencia de Cu y Ag en estas partículas y la baja concentración evaluada de esta solución coloidal es de esperarse este bajo efecto antimicrobiano.

Al igual que ocurrió con las AgNps, y a diferencia de algunos de los autores previos, una de las razones por las cuales no se observó efecto antimicrobiano alguno de las CuAgNps sintetizadas mediante semilla de mora podría deberse a la significativa diferencia de tamaño obtenido en éstas (206,39 $\pm$ 17,09 nm) que se evidenció en el apartado 6.2.1.3. Así mismo, teniendo en cuenta que aunque las sales metálicas de Cu y Ag fueron agregadas en la misma proporción molar (1:1) y concentración (5 mMol) en la reacción, se obtuvieron bajos porcentajes atómicos de Ag y de Cu en las pruebas EDX del apartado 6.2.2.5, con 3,35 y  $\approx$ 1

At%, respectivamente, lo cual, sumado a la imposibilidad de analizar concentraciones mayores a 10% v/v de esta solución coloidal, redujeron significativamente su presencia y, por consiguiente, el efecto bacteriostático que se le pudo atribuir a la acción de las AgNps individuales.

Estos resultados indican que las CuNps y CuAgNps sintetizadas mediante semilla de mora no presentaron una actividad biológica significativa. Este efecto puede atribuirse, en primer lugar, a los grandes tamaños de partícula obtenido tras la síntesis también influyeron negativamente, alcanzando valores promedio de 533,10 nm para las CuNps, 206,39 nm para las CuAgNps y 113,17 nm para las AgNps (apartado 6.2.1.3). En segundo lugar, a la reducida presencia de estas nanopartículas en las soluciones coloidales sintetizadas, con una composición atómica elemental de Cu=0,17% para las CuNps, y de Ag=3,35% y Cu=0,95% para las CuAgNps, en comparación con las AgNps (Ag=15,82%) (referenciados en el apartado 6.2.2.5). Finalmente, la baja concentración de estas soluciones evaluadas mediante la prueba microbiológica también puede haber limitado su efectividad, con un máximo de 1% v/v para las CuNps y AgNps, y de 10% v/v para las CuAgNps. A pesar de estas limitaciones, la solución coloidal de AgNps sintetizadas mediante semilla de mora es ligeramente más efectiva frente a *E. coli* ATCC 25922, en donde a una concentración únicamente de 1% v/v de esta solución de Nps, esta alcanza un 23,9% de inhibición sobre la primera bacteria, reflejando la especificidad celular de estas nanopartículas, al igual que su dosis/tamaño-dependencia, entre otros factores influyentes. Estudios como el de *Franci et al., (2015)* analizaron la capacidad de las AgNps como agentes antibacterianos en diferentes cepas (Franci et al., 2015). En este estudio, los autores identificaron que varios de los mecanismos clave de este efecto se basan en la alteración de la membrana celular y citoplasmática, la

inhibición de la replicación de ADN bacteriano, y la interferencia en el transporte de electrones, afectando los niveles intracelulares de ATP, dañando la célula irreversiblemente. No obstante, los mecanismos específicos de las CuNps, como de las AgNps y CuAgNps mediante los cuales ejercen su actividad antimicrobiana aún sigue en un debate considerable y son motivo de discusión. Por otro lado, un estudio de *Panáček et al., (2018)* evidenció que bacterias como *E. coli* (013) y *E. coli* (CCM 3954) pueden desarrollar resistencia ante ciertas AgNps tras una exposición repetida (Panáček et al., 2018). Los autores utilizaron AgNps de 28 nm las cuales evidenciaron un MIC inicial de 3,38 y 13,5 mg/ml para *E. coli* (CCM 3954) y *E. coli* (013), respectivamente. Sin embargo, *E. coli* (CCM 3954) desarrolló resistencia a las AgNps tras el 8 paso de exposición, mientras que *E. coli* (013) hizo lo mismo a MIC mayores a 54 mg/ml. Esta resistencia, según los autores, se debió a la producción de la proteína flagelina adhesiva, la cual generó que las AgNps se aglomerasen y el efecto antimicrobiano derivado por su tamaño disminuyera significativamente. Aunque los autores estabilizaron nuevamente las AgNps, este mecanismo de defensa se mantuvo superior y sólo fue posible suprimirlo tras la inhibición de la producción de flagelina de las bacterias. Notablemente, esta resistencia fue específica para AgNps, ya que estas bacterias no desarrollaron resistencia a los iones de plata (siendo esta prueba llevada en paralelo), sugiriendo que el mecanismo de resistencia bacteriana es efectivo únicamente ante las AgNps. Sin embargo, analizando la literatura presentada, y tal como lo demostraron *Asghar y Asghar (2020)*, los extractos vegetales desempeñan un papel crucial en la síntesis de nanopartículas, siendo que, además de proporcionar una alternativa sostenible eficaz en la producción de extractos con propiedades antioxidantes o reductoras, la efectividad de las nanopartículas obtenidas a raíz de estos puede variar en función del extracto vegetal utilizado, tal como se

observa en sus resultados de sensibilidad en diferentes bacterias (Asghar & Asghar, 2020). Este enfoque permite una respuesta personalizada contra una amplia gama de microorganismos, donde ciertas bacterias muestran mayor sensibilidad a nanopartículas de ciertos metales sintetizadas con efectos específicos, representando una ventaja ante dichas bacterias, dificultando el desarrollo de resistencia bacteriana, reduciendo así el riesgo asociado a la exposición repetida a un solo tipo de agente antimicrobiano.

Estos estudios demuestran que, controlando las condiciones de síntesis específicamente para cada nanopartícula, así como utilizar extractos vegetales o compuestos amigables con el medio ambiente que sean agentes reductores y estabilizantes eficientes entre otros, se pueden obtener CuNps o AgNps individuales, o CuAgNps bimetálicas, monodispersas, de menores tamaños, morfológicamente definidas y estables que muestren excelentes propiedades antimicrobianas ante un amplio espectro de bacterias.

### **6.3. Conclusiones**

De acuerdo con los resultados obtenidos tras las pruebas microbiológicas, las CuNps presentaron una MIC mayor al 10% para *E. coli* ATCC 25922, mientras que las AgNps y las CuAgNps presentaron una MIC mayor al 1%, ante la misma bacteria. Se confirma el nulo efecto antimicrobiano de todas las soluciones coloidales de nanopartículas sintetizadas utilizando semilla de mora debido, entre otras razones, a la reducida presencia de estas nanopartículas en las soluciones coloidales, a los grandes tamaños de partícula obtenidos tras las síntesis y a la baja concentración de estas nanopartículas en las soluciones evaluadas microbiológicamente, tal como se comprobó en las caracterizaciones fisicoquímicas en los capítulos previos.

## 7. Conclusiones Generales

En esta investigación se cumplió el objetivo general de evaluar el uso de extractos acuosos de residuos agroindustriales como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de nanopartículas metálicas (CuNps, AgNps y CuAgNps) con propiedades biocidas frente a la bacteria patógena *E. coli* ATCC 25922. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis planteada, demostrando que los metabolitos presentes en estos extractos permiten la síntesis de nanopartículas a escala laboratorio, aunque con limitaciones en su actividad biológica dependiendo de las condiciones experimentales.

Se determinó que el extracto de semilla de mora (SM), obtenido por la técnica de maceración a pH 3, tiempo de extracción de 7 horas y una relación Sólido/Líquido de 0,75 % p/v, como el extracto utilizado como agente reductor para la síntesis de nanopartículas metálicas debido a que presentó una capacidad de reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  superior a los otros extractos de residuos analizados, tras obtener  $4,20 \pm 0,11$  mg de Cu reducidos por mg de extracto utilizado.

A partir de este extracto se sintetizaron y caracterizaron CuNps, AgNps y CuAgNps cuyas condiciones de síntesis se establecieron como concentración de Sal metálica de 10 mMol, 75% v/v de extracto, pH de 12 y tiempo de reacción de 120 minutos. Las caracterizaciones fisicoquímicas revelaron que los tamaños promedio de las partículas obtenidas fueron  $533,10 \pm 202,45$  nm para las CuNps,  $113,17 \pm 1,71$  nm para las AgNps y de  $206,39 \pm 17,09$  nm para las CuAgNps. Aunque los análisis obtenidos mediante SEM únicamente mostraron que la morfología de las AgNps se aproxima a la forma esférica, los análisis de composición atómica indicaron que las CuAgNps contenían 3,35 % de Ag y 0,17%

de Cu, mientras que las AgNps tenían una proporción de Ag de 15,82% y las CuNps apenas un 0,17% de Cu.

De esta manera, las pruebas microbiológicas evidenciaron que las CuNps y CuAgNps no presentaron actividad biológica significativa frente a *E. coli* ATCC 25922. Estas limitaciones se atribuyen a los grandes tamaños de partícula y reducida composición metálica elemental, características previamente descritas, así como a la baja concentración de las soluciones evaluadas, por consiguiente, de nanopartículas en solución, con máximos de 10 % v/v para soluciones de CuAgNps y 1 % para las correspondientes a CuNps y AgNps.

Esta investigación aporta conocimientos sobre la síntesis verde de nanopartículas metálicas utilizando extractos de residuos agroindustriales, identificando los retos asociados a la optimización de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, así como su aplicabilidad como agentes biocidas.

## Referencias

Abdol Aziz, R. A., Abd Karim, S. F., Ibrahim, U. K., & Sanuddin, N. (2019). Precursor Concentration Effect on Physicochemical Properties of Zinc Oxide Nanoparticle Synthesized with Banana Peel Extract. *Key Engineering Materials*, 797(1), 262–270. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.797.262>

Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>

Aguilar-Tapia, A., & Zanella, R. (2018). Las nanopartículas bimetálicas y algunas de sus aplicaciones. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 10(19), 72. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2017.19.61783>

Ahmad, T., Irfan, M., Bustam, M. A., & Bhattacharjee, S. (2016). Effect of Reaction Time on Green Synthesis of Gold Nanoparticles by Using Aqueous Extract of Elaise Guineensis (Oil Palm Leaves). *Procedia Engineering*, 148, 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.465>

Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>

Almatroudi, A., Khadri, H., Azam, M., Rahmani, A. H., Al Khaleefah, F. K., Khateef, R., Ansari, M. A., & Allemailem, K. S. (2020). Antibacterial, antibiofilm and

anticancer activity of biologically synthesized silver nanoparticles using seed extract of *Nigella sativa*. *Processes*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/PR8040388>

Andal, V., & Buvaneswari, G. (2017). Effect of reducing agents in the conversion of Cu<sub>2</sub>O nanocolloid to Cu nanocolloid. *Engineering Science and Technology, an International Journal*, 20(1), 340–344. <https://doi.org/10.1016/j.jestch.2016.09.003>

Asghar, M. A., & Asghar, M. A. (2020). Green synthesized and characterized copper nanoparticles using various new plants extracts aggravate microbial cell membrane damage after interaction with lipopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 1168–1176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.198>

Attard, K., Oztop, M. H., & Lia, F. (2022). The Effect of Hydrolysis on the Antioxidant Activity of Olive Mill Waste. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(23). <https://doi.org/10.3390/app122312187>

Balentic, J. P., Ačkar, Đ., Jokic, S., Jozinovic, A., Babic, J., Miličević, B., Ubaric, D., & Pavlovic, N. (2018). Cocoa shell: A by-product with great potential for wide application. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061404>

Banco Mundial, & McCourtie, S. D. (2021, March 26). *La economía circular: un modelo económico que lleva al crecimiento y al empleo sin comprometer el medio ambiente* | *Noticias ONU*. <https://news.un.org/es/story/2021/03/1490082>

Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R., & Laglaoui, A. (2014a). The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(11), 399–412.

Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R., & Laglaoui, A. (2014b). The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(11), 399–412.

Barros, R. G. C., Andrade, J. K. S., Denadai, M., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017a). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. *Food Research International*, 102(September), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.082>

Barros, R. G. C., Andrade, J. K. S., Denadai, M., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017b). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. *Food Research International*, 102(July), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.082>

Basavegowda, N., & Rok Lee, Y. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) peel extract: A novel approach towards waste utilization. *Materials Letters*, 109, 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.07.039>

Benedict, S. R. (1908). A Reagent For the Detection of Reducing Sugars. *J. Biol. Chem.*, 5, 485–487.

Benzie, I. F. F., & Choi, S.-W. (2014). Antioxidants in Food: Content, Measurement, Significance, Action, Cautions, Caveats, and Research Needs. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 71, pp. 1–53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8>

Bhagathsingh, W., & Nesaraj, A. S. (2013). Low temperature synthesis and thermal properties of Ag–Cu alloy nanoparticles. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23(1), 128–133. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(13\)62438-3](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(13)62438-3)

Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>

Chakraborty, N., Banerjee, J., Chakraborty, P., Banerjee, A., Chanda, S., Ray, K., Acharya, K., & Sarkar, J. (2022). Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review. In *Green Chemistry Letters and Reviews* (Vol. 15, Issue 1, pp. 185–213). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17518253.2022.2025916>

Chaves, J. O., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, A. P. da F., Forster-Carneiro, T., Vázquez-Espinosa, M., González-de-Peredo, A. V., Barbero, G. F., & Rostagno, M. A. (2020). Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.507887>

Chen, M. L., Yang, D. J., & Liu, S. C. (2011a). Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(6), 1179–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02605.x>

Chen, M. L., Yang, D. J., & Liu, S. C. (2011b). Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus

fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(6), 1179–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02605.x>

Cheon, J. Y., Kim, S. J., Rhee, Y. H., Kwon, O. H., & Park, W. H. (2019). Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2773–2780. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>

Chowdhury, N. R., MacGregor-Ramiasa, M., Zilm, P., Majewski, P., & Vasilev, K. (2016). ‘Chocolate’ silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 482, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.08.003>

CLSI. (2015). *M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Vol. 35 No. 2* (Issue January). [www.clsi.org](http://www.clsi.org).

CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI Document M100-S27. In *CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).

Crespo Gutiérrez, J. (2014). *Síntesis de nanoestructuras metálicas de oro y plata a partir de precursores organometálicos: Propiedades plasmónicas y catalíticas*. Universidad De La Rioja.

Cruz, J., Ortiz, C., Guzman, F., Cardenas, C., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Biopolymers*, 101(4), 319–328. <https://doi.org/10.1002/bip.22360>

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, *194*, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>

da Silva, D. I. S., Nogueira, G. D. R., Duzzioni, A. G., & Barrozo, M. A. S. (2013a). Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. *Industrial Crops and Products*, *50*, 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.001>

da Silva, D. I. S., Nogueira, G. D. R., Duzzioni, A. G., & Barrozo, M. A. S. (2013b). Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. *Industrial Crops and Products*, *50*, 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.001>

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, *7*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>

DANE. (2020). *Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA)*.

Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., & Dang, M. C. (2011a). Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, *2*(1), 015009. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/2/1/015009>

Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., & Dang, M. C. (2011b). Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical

reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2(1). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/2/1/015009>

Devi, P., Singh, S., Sihag, S., Moond, M., & Sangwan, S. (2022). Effect of pH on Phytochemical and Antioxidant Potential of Satawar Tubers (*Asparagus Racemosus* Willd.). *Journal of Antioxidant Activity*, 2(2), 42–50. <https://doi.org/10.14302/issn.2471-2140.jaa-21-3996>

Dicko, A., Muanda, F., Koné, D., Soulimani, R., & Younos, C. (2011). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medicinal plant parts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep109>

Din, M. I., Arshad, F., Hussain, Z., & Mukhtar, M. (2017). Green Adeptness in the Synthesis and Stabilization of Copper Nanoparticles: Catalytic, Antibacterial, Cytotoxicity, and Antioxidant Activities. *Nanoscale Research Letters*, 12. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2399-8>

Długosz, O., Sochocka, M., Ochnik, M., & Banach, M. (2021). Metal and bimetallic nanoparticles: Flow synthesis, bioactivity and toxicity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 586, 807–818. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.11.005>

Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J., & Yang, W. (2009a). Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(16), 6573–6576. <https://doi.org/10.1021/jp900775b>

Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J., & Yang, W. (2009b). Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(16), 6573–6576. <https://doi.org/10.1021/jp900775b>

Durdun, C., Papuc, C., Gajaila, I., & Valentin Goran, G. (2017). *The Influence of Solid-to-Solvent Ratio and Extraction Method on Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Properties of Some Ethanolic Plant Extracts*.  
<https://www.researchgate.net/publication/309740361>

Escalante Hernández, H., Orduz Prada, J., Zapata Lesmes, H. J., Cardona Ruiz, M. C., & Duarte Ortega, M. (2011). *Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia* (Universidad Industrial de Santander, Ed.).  
<http://bdigital.upme.gov.co/handle/001/1058>

Fernández, M. N., Muñoz-Olivas, R., & Luque-Garcia, J. L. (2019). SILAC-based quantitative proteomics identifies size-dependent molecular mechanisms involved in silver nanoparticles-induced toxicity. *Nanotoxicology*, 13(6), 812–826.  
<https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1579374>

Fernando, I., & Zhou, Y. (2019a). Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297–305.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>

Fernando, I., & Zhou, Y. (2019b). Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297–305.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>

fin, OLML, MLA, & LOF. (2020, August 28). *Residuos de palma africana se aprovecharían como biofertilizante*. Agencia UNAL - Medioambiente.  
[http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/residuos-de-palma-africana-se-  
aprovecharian-como-biofertilizante](http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/residuos-de-palma-africana-se-aprovecharian-como-biofertilizante)

Fink, J. K. (2015). Bacteria control. In *Petroleum Engineer's Guide to Oil Field Chemicals and Fluids* (pp. 181–213). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803734-8.00005-9>

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane determinations in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *73*(2), 627–648.

Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, O. M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, *63*(4), 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00065-X)

Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*, *20*(5), 8856–8874. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>

Fui Seung Chin, C., Phin Chong, K., Atong, M., Kui Wong, N., Chin, F.-S., Chong, K.-P., & Markus, A. (2013). Tea polyphenols and alkaloids content using Soxhlet and direct extraction method Tea Polyphenols and Alkaloids Content Using Soxhlet and Direct Extraction Methods. *World Journal of Agricultural Sciences*, *9*(3), 266–270. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.3.1737>

Gail Lorenz Miller. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(III), 426–428.

García-Culqui, R., Jácome-Pilco, C., Guevara-Narváez, Lady, & Moreta-Guangasi, T. (2023). Revalorización del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) como residuo importante para la agroindustria. *593 Digital Publisher CEIT*, *8*(3), 134–148. <https://doi.org/10.33386/593dp.2023.3.1661>

Garzón, G. A., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science*, 74(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01092.x>

Girma, A. (2023). Alternative mechanisms of action of metallic nanoparticles to mitigate the global spread of antibiotic-resistant bacteria. *The Cell Surface*, 10, 100112. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.w.2023.100112>

Girma, A., Alamnie, G., Bekele, T., Mebratie, G., Mekuye, B., Abera, B., Workineh, D., Tabor, A., & Jufar, D. (2024). Green-synthesised silver nanoparticles: antibacterial activity and alternative mechanisms of action to combat multidrug-resistant bacterial pathogens: a systematic literature review. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 17(1). <https://doi.org/10.1080/17518253.2024.2412601>

Gómez Gómez, E. F., & Sampayo Velásquez, G. Y. (2020). *Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos vegetales producidos a partir de desechos agroindustriales generados en el departamento de Santander* [Investigacion]. Universidad Industrial de Santander.

Gómez Rueda, D., & Parra Cepeda, J. M. (2013). *Caracterización fisicoquímica de residuos agrícolas en Santander: “cacao, cítricos, fique y tomate.”* Universidad Industrial de Santander.

Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75–80. <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27.n2.2018.191>

Grande-Tovar, C., Araujo Pabón, L., Flórez López, E., & Aranaga Arias, C. (2020). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Informador Técnico*, 85(1), 64–82. <https://doi.org/10.23850/22565035.2932>

Gutierrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (McGraw-Hill Interamericana, Ed.; 2nd ed.).

Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C. W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L. F., Moskaug, Ø., Jacobs, D. R., & Blomhoff, R. (2002). A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461–471. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.461>

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008a). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* (International Centre for Science and High Technology, Ed.).

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008b). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* (International Centre for Science and High Technology, Ed.). [https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction\\_technologies\\_for\\_medicinal\\_and\\_aromatic\\_plants\\_0.pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf)

Happi Emaga, T., Andrianaivo, R. H., Wathelet, B., Tchango, J. T., & Paquot, M. (2007). Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry*, 103(2), 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006>

Hernández-López, A., Sanchez Felix, D. A., Sierra, Z. Z., Bravo, I. G., Dinkova, T. D., & Avila-Alejandre, A. X. (2020). Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict. *ACS Omega*, *5*(50), 32403–32410. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04467>

Hikmah, N., Idrus, N. F., Jai, J., & Hadi, A. (2016). Synthesis and characterization of silver-copper core-shell nanoparticles using polyol method for antimicrobial agent. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *36*(1), 012050. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012050>

Hossain, M. A., & Rahman, S. M. M. (2011a). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, *44*(3), 672–676. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.036>

Hossain, M. A., & Rahman, S. M. M. (2011b). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, *44*(3), 672–676. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.036>

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

International Organization for Standardization. (2022). *Fruit and vegetable products — Determination of soluble solids — Refractometric method (ISO 2173:2003)*. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:35851:en>

Iqbal, P., Preece, J. A., & Mendes, P. M. (2012). Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. In *Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc195>

Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. *Molecules*, 24(11), 2133. <https://doi.org/10.3390/molecules24112133>

Jayalakshmi, S., Singaravelu, D. K., Mariappan, M., Ameen, F., & Veerappan, A. (2024). Sunlight-assisted synthesis of bimetallic silver–copper nanoparticles using peanut shell extract and its reusable activity against drug-resistant bacteria. *New Journal of Chemistry*, 48(39), 17310–17320. <https://doi.org/10.1039/D4NJ03882G>

Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., & Bugarski, B. M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>

Kankara, S. S., Mustafa, M., Ibrahim, H. M., Nulit, R., & Go, R. (2014a). Effect of Drying Methods, Solid-Solvent Ratio, Extraction Time and Extraction Temperature on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae) Leaves Water Extract. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(12), 1378–1392.

Kankara, S. S., Mustafa, M., Ibrahim, H. M., Nulit, R., & Go, R. (2014b). Effect of Drying Methods, Solid-Solvent Ratio, Extraction Time and Extraction Temperature on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae) Leaves Water Extract. *American Journal of Phytomedicine and Clinical*

*Therapeutics*, 2(12), 1378–1392.

<http://www.ajpct.org/index.php/AJPCT/article/view/221>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Karsa, D. R. (2007). Biocides. In I. Johansson & P. Somasundaran (Eds.), *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces* (Vol. 1, Issue May 2000, pp. 593–623). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044451664-0/50018-8>

Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>

Keasler, V., De Paula, R. M., Nilsen, G., Grunwald, L., & Tidwell, T. J. (2017). Biocides overview and applications in petroleum microbiology. In *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies* (pp. 539–562). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101105-8.00023-1>

Khalil, M. M. H., Ismail, E. H., El-Baghdady, K. Z., & Mohamed, D. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131–1139. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.007>

Khan, Z., & Obaid, A. Y. (2016). Seedless, copper-induced synthesis of stable Ag/Cu bimetallic nanoparticles and their optical properties. *RSC Advances*, 6(35), 29116–29126. <https://doi.org/10.1039/C5RA26732C>

Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2015). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>

Kokila, T., Ramesh, P. S., & Geetha, D. (2016a). Biosynthesis of AgNPs using Carica Papaya peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *134*, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.021>

Kokila, T., Ramesh, P. S., & Geetha, D. (2016b). Biosynthesis of AgNPs using Carica Papaya peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *134*, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.021>

Kothari, V., Gupta, A., & Naraniwal, M. (2012a). Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *Journal of Natural Remedies*, *12*(2), 162–173. <https://doi.org/10.18311/jnr/2012/271>

Kothari, V., Gupta, A., & Naraniwal, M. (2012b). Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *Journal of Natural Remedies*, *12*(2), 162–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.18311/jnr/2012/271>

Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.006>

Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., & Angulo, Y. (2017). Biofabrication of copper oxide nanoparticles using Andean blackberry (*Rubus glaucus*

Benth.) fruit and leaf. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, S475–S480.  
<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.01.009>

Kumar, V. V., & Anthony, S. P. (2016). Antimicrobial studies of metal and metal oxide nanoparticles. In *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-42861-3.00009-1>

Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.jsp.2014.11.013>

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Nirola, R., Lee, Y. B., & Naidu, R. (2016). Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. *Industrial Crops and Products*, 83, 630–634.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.060>

Lee, J., Dossett, M., & Finn, C. E. (2012). Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130(4), 785–796.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.022>

Lee, S. Y., Krishnamurthy, S., Cho, C.-W., & Yun, Y.-S. (2016). Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Ocimum sanctum* Extracts by Solvents with Different Polarity. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(5), 2651–2659.  
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00161>

Levaj, B., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D., & Krasnić, N. (2009). Determination of Flavonoids in Pulp and Peel of Mandarin Fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74(3), 221–225. <https://hrcak.srce.hr/file/73120>

Li, T., Shen, P., Liu, W., Liu, C., Liang, R., Yan, N., & Chen, J. (2014). Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. *International Journal of Food Properties*, *17*(8), 1805–1817. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.732168>

Li, X., Cong, Y., Ovais, M., Cardoso, M. B., Hameed, S., Chen, R., Chen, M., & Wang, L. (2023). Copper-based nanoparticles against microbial infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *15*(4), e1888. <https://doi.org/10.1002/WNAN.1888>

LIU, Q., YASUNAMI, T., KURUDA, K., & OKIDO, M. (2012). Preparation of Cu nanoparticles with ascorbic acid by aqueous solution reduction method. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, *22*(9), 2198–2203. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(11\)61449-0](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(11)61449-0)

Logeswari, P., Silambarasan, S., & Abraham, J. (2013). Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica*, *20*(3), 1049–1054. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.029>

Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. de, Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, *119*(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>

López Téllez, G., Morales Luckie, R. A., Olea Mejía, O. F., Sánchez Mendieta, V., Trujillo Reyes, J., Varela Guerrero, V., & Vilchis Nestor, A. R. (2013). *Nanoestructuras metálicas*.

Lubaina, A. S., Renjith, P. R., & Roshni, A. S. (2020). Identification and Quantification of Polyphenols from Pineapple Peel by High Performance Liquid Chromatography Analysis. *Advances in Zoology and Botany*, 8(5), 431–438. <https://doi.org/10.13189/azb.2020.080507>

Makanjuola, S. A. (2017a). Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. *Food Science & Nutrition*, 5(6), 1179–1185. <https://doi.org/10.1002/fsn3.509>

Makanjuola, S. A. (2017b). Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. *Food Science & Nutrition*, 5(6), 1179–1185. <https://doi.org/10.1002/fsn3.509>

Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). “Green” Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae*, 6(20), 35–44.

Mallikarjuna, K., & Kim, H. (2018). Synthesis of shape and size-dependent CuAg bimetallic dumbbell structures for organic pollutant hydrogenation. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 102(April), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2018.04.033>

Manrique Waldo, R. J. (2018). *Estudio de la Combustión de Pélet de Cisco de Café* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/68662v>

Manthey, J. A., & Jaitrong, S. (2016). Handling & Processing Section An HPLC-MS Analysis of Phenolic Antioxidants in Banana Peel. In *Proc. Fla. State Hort. Soc* (Vol. 129).

Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 12, Issue 5, pp. 1531–1551). <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>

McGoverin, C., Steed, C., Esan, A., Robertson, J., Swift, S., & Vanholsbeeck, F. (2021). Optical methods for bacterial detection and characterization. *APL Photonics*, 6(8). <https://doi.org/10.1063/5.0057787>

Mejía González, J., & Rondón Roa, J. V. (2013). *Caracterización fisicoquímica de biomasa agrícola representativa en Santander: “papa, yuca, mora, papaya, cebolla junca.”* Universidad Industrial de Santander.

Mendoza Uribe, G., & Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales*, 29(1), 161–186.

Mertz, C., Gancel, A. L., Gunata, Z., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Vaillant, F., Perez, A. M., Ruales, J., & Brat, P. (2009). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.008>

MINITAB. (2023a). *Consideraciones acerca de los datos para Prueba de Kruskal-Wallis.* <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/how-to/kruskal-wallis-test/before-you-start/data-considerations/>

MINITAB. (2023b). *Explicación de los métodos no paramétricos*.  
[https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/supporting-topics/understanding-nonparametric-methods/)

[to/statistics/nonparametrics/supporting-topics/understanding-nonparametric-methods/](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/supporting-topics/understanding-nonparametric-methods/)

MINITAB. (2023c). *Gráficas de efectos para Analizar diseño factorial*.  
[https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/)

[modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/)  
[statistics-and-graphs/effects-plots/](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/)

MINITAB. (2023d). *Gráficas de residuos para Analizar diseño factorial*.  
[https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/residual-plots/)

[modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/residual-plots/)  
[statistics-and-graphs/residual-plots/](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/residual-plots/)

MINITAB. (2023e). *Interpretar los resultados clave para Analizar diseño factorial*. [https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/key-results/)  
[modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/key-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/key-results/)  
[results/](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/key-results/)

MINITAB. (2023f). *¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken?* [https://support.minitab.com/es-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/)  
[mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/)  
[surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/)

MINITAB. (2023g). *Revisión general de Prueba de Kruskal-Wallis*.  
[https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/how-to/kruskal-wallis-test/before-you-start/overview/)

[to/statistics/nonparametrics/how-to/kruskal-wallis-test/before-you-start/overview/](https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/how-to/kruskal-wallis-test/before-you-start/overview/)

Mohamad, N. A. N., Jai, J., Arham, N. A., & Hadi, A. (2013a). A short review on the synthesis of bimetallic nanoparticles using plant extract. *2013 IEEE International Conference on Control System, Computing and Engineering*, 334–339. <https://doi.org/10.1109/ICCSCE.2013.6719985>

Mohamad, N. A. N., Jai, J., Arham, N. A., & Hadi, A. (2013b). A short review on the synthesis of bimetallic nanoparticles using plant extract. *Proceedings - 2013 IEEE International Conference on Control System, Computing and Engineering, ICCSCE 2013*, 334–339. <https://doi.org/10.1109/ICCSCE.2013.6719985>

Mohammed Fayaz, A., Balaji, K., Kalaichelvan, P. T., & Venkatesan, R. (2009). Fungal based synthesis of silver nanoparticles—An effect of temperature on the size of particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.002>

Monge, M. (2009). Investigación Química Nanopartículas de plata : métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Real Sociedad Española de Química*, May, 33–41. <https://doi.org/ISSN 1575-3417>

Montoya Salas, D. F. (2023). *Síntesis a Escala Laboratorio de Nanopartículas de Compuestos de Cobre a Partir de Extracto de Residuo de Mora (Rubus glaucus Benth)*. [Investigacion]. Universidad Industrial de Santander.

Murillo, E., Fernández, K., Viña, A., & Méndez Jairo, J. (2007). Actividad antioxidante in vitro y antimicrobial de extractos metanólicos de cuatro albahacas cultivadas en Ibagué. *Revista Tumbaga*, 2(2007), 72–84.

Mythili, R., Selvankumar, T., Kamala-Kannan, S., Sudhakar, C., Ameen, F., Al-Sabri, A., Selvam, K., Govarthanan, M., & Kim, H. (2018). Utilization of market

vegetable waste for silver nanoparticle synthesis and its antibacterial activity. *Materials Letters*, 225(1), 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.04.111>

Nadagouda, M. N., Iyanna, N., Lalley, J., Han, C., Dionysiou, D. D., & Varma, R. S. (2014). Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Antioxidants from Blackberry, Blueberry, Pomegranate, and Turmeric Extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(7), 1717–1723. <https://doi.org/10.1021/sc500237k>

Nandakumar, R., Gounot, A. M., & Mattiasson, B. (2000). Gentle lysis of mucous producing cold-adapted bacteria by surfactant treatment combined with mechanical disruption. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 83). [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

Oduje, A. A., G. O., Ayodele, A. J., & Stephen, A. A. (2015). Assessment of the Nutritional, Anti nutritional and Antioxidant capacity of Uripe, ripe, and over ripe Plantain (*Musa paradisiaca*) Peels. *International Journal of Advanced Research*, 3(2), 63–72. <http://www.journalijar.com>

Olajire, A. A., & Adesina, E. O. (2017). Green Approach to Synthesis of Pt and Bimetallic Au @ Pt Nanoparticles Using Carica Papaya Leaf Extract and Their Characterization. *Journal of Nanostructure*, 7(4), 338–344.

Ouattara, L. Y., Appiah Kouassi, E. K., Soro, D., Soro, Y., Yao, K. B., Adouby, K., & Drogui, A. P. (2021). Cocoa pod husk: A review. *BioResources*, 16(1), 1988–2020. <https://www.researchgate.net/publication/357157254>

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese*

*Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315.

<https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

Padil, V. V. T., & Černík, M. (2013). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 889–898. <https://doi.org/10.2147/IJN.S40599>

Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007a). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007b). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle ? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli* ♡. *Applied and Enviromental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Pucek, R., Tomanec, O., & Zbořil, R. (2018). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>

Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., & Panwar, J. (2017). Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 9(7), 527–544. <https://doi.org/10.1166/ asem.2017.2027>

Passo Tsamo, C. V., Herent, M. F., Tomekpe, K., Happi Emaga, T., Quetin-Leclercq, J., Rogez, H., Larondelle, Y., & Andre, C. (2015). Phenolic profiling in the

pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.). *Food Chemistry*, 167, 197–204.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.095>

Patel, P., Agarwal, P., Kanawaria, S., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2015). Nanotechnology and Plant Sciences. In M. H. Siddiqui, M. H. Al-Whaibi, & F. Mohammad (Eds.), *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants* (pp. v–vi). Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>

Phiwdang, K., Suphankij, S., Mekprasart, W., & Pecharapa, W. (2013). Synthesis of CuO Nanoparticles by Precipitation Method Using Different Precursors. *Energy Procedia*, 34, 740–745. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.808>

Phongtongpasuk, S., Poadang, S., & Yongvanich, N. (2016). Environmental-friendly Method for Synthesis of Silver Nanoparticles from Dragon Fruit Peel Extract and their Antibacterial Activities. *Energy Procedia*, 89, 239–247.  
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.05.031>

Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., & Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(6), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003>

Polatoglu, K. (2013). “Chemotypes”– A Fact that should not be Ignored in Natural Product Studies. *The Natural Products Journal*, 3(1), 10–14. <https://doi.org/10.2174/2210315511303010004>

Portilla, R. (2024). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Lippia origanoides quimiotipo timol-carvacrol nanoencapsulado en polímeros biodegradables*. Universidad Industrial de Santander.

Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>

Raffi, M., Mahmood Bhatti, T., Akhter, J. I., & Hameed, A. (2007). Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against E. Coli ATCC-15224. In *Article in Journal of Material Science and Technology* (Vol. 24, Issue 2). <https://www.researchgate.net/publication/221720622>

Raza, M., Kanwal, Z., Rauf, A., Sabri, A., Riaz, S., & Naseem, S. (2016). Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes. *Nanomaterials*, 6(4), 74. <https://doi.org/10.3390/nano6040074>

Razmi, N., Lazouskaya, M., Pajcin, I., Petrovic, B., Grahovac, J., Simic, M., Willander, M., Nur, O., & Stojanovic, G. M. (2023). Monitoring the effect of pH on the growth of pathogenic bacteria using electrical impedance spectroscopy. *Results in Engineering*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101425>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization

essay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Reyes-Blas, M., Maldonado-Luna, N. M., Rivera-Quiñones, C. M., Vega-Avila, A. L., Roman-Velázquez, F. R., & Perales-Perez, O. J. (2020). Single Step Microwave Assisted Synthesis and Antimicrobial Activity of Silver, Copper and Silver-Copper Nanoparticles. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 08(08), 13–29.  
<https://doi.org/10.4236/msce.2020.88002>

Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J., & Jiang, Y. (2008). Effects of Various Temperatures and pH Values on the Extraction Yield of Phenolics from Litchi Fruit Pericarp Tissue and the Antioxidant Activity of the Extracted Anthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7), 1333–1341.  
<https://doi.org/10.3390/ijms9071333>

Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttgupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>

Saraswaty, V., Risdian, C., Primadona, I., Andriyani, R., Andayani, D. G. S., & Mozef, T. (2017). Pineapple peel wastes as a potential source of antioxidant compounds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 60, 012013.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/60/1/012013>

Saratale, R. G., Shin, H. S., Kumar, G., Benelli, G., Ghodake, G. S., Jiang, Y. Y., Kim, D. S., & Saratale, G. D. (2018). Exploiting fruit byproducts for eco-friendly nanosynthesis: Citrus × clementina peel extract mediated fabrication of silver nanoparticles with high efficacy against microbial pathogens and rat glial tumor C6 cells.

*Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10250–10263.

<https://doi.org/10.1007/s11356-017-8724-z>

Sardsaengjun, C., & Jutiviboonsuk, A. (2009). Effect of Temperature and Duration Time on Polyphenols Extract of Areca catechu Linn. Seeds. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 5(1), 14–17.

Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363.

Sepúlveda, L., Romaní, A., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. (2018). Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47(September 2017), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.012>

Sharif, M. F., & Bennett, M. T. (2016). THE EFFECT OF DIFFERENT METHODS AND SOLVENTS ON THE EXTRACTION OF POLYPHENOLS IN GINGER (Zingiber officinale). *Jurnal Teknologi*, 78(11–2), 19–25. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.9943>

Sharma, J. K., Akhtar, M. S., Ameen, S., Srivastava, P., & Singh, G. (2015). Green synthesis of CuO nanoparticles with leaf extract of Calotropis gigantea and its dye-sensitized solar cells applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 632, 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.01.172>

Shorbagi, M., Fayek, N. M., Shao, P., & Farag, M. A. (2022). Citrus reticulata Blanco (the common mandarin) fruit: An updated review of its bioactive, extraction types, food quality, therapeutic merits, and bio-waste valorization practices to maximize

its economic value. *Food Bioscience*, 47, 101699.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101699>

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, 109114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114>

Singleton, V. . L., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with PHOSPHOMOLYBDIC-PHOSPHOTUNGSTIC ACID REAGENTS. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>

Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., & Bach, H. (2017a). Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>

Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., & Bach, H. (2017b). Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>

Solano Hernández, A. U., & Mendoza Jaimes, C. A. (2013). *Caracterización de los residuos de cultivos agrícolas de aguacate, arracacha, frijol, guayaba y piña producidos en Santander, Colombia*. (Vol. 53, Issue 9). Universidad Industrial de Santander.

Song, F.-L., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., & Li, H.-B. (2010). Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2362–2372. <https://doi.org/10.3390/ijms11062362>

Song, J. Y., & Kim, B. S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(1), 79–84. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0224-6>

Soong, C., Woo, P., & Hoyle, D. (2012). Contamination Cleaning of TEM/SEM Samples with the ZONE Cleaner. *Microscopy Today*, 20(6), 44–48. <https://doi.org/10.1017/s1551929512000752>

Soto, K. M., Quezada-Cervantes, C. T., Hernández-Iturriaga, M., Luna-Bárcenas, G., Vazquez-Duhalt, R., & Mendoza, S. (2019a). Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens. *LWT*, 103(January), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.023>

Soto, K. M., Quezada-Cervantes, C. T., Hernández-Iturriaga, M., Luna-Bárcenas, G., Vazquez-Duhalt, R., & Mendoza, S. (2019b). Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens. *LWT*, 103(January), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.023>

Suárez-Cerda, J., Espinoza-Gómez, H., Alonso-Núñez, G., Rivero, I. A., Gochi-Ponce, Y., & Flores-López, L. Z. (2017). A green synthesis of copper nanoparticles using native cyclodextrins as stabilizing agents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(3), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2016.10.005>

Sun, Y., & Xia, Y. (2003). Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *The Analyst*, 128(6), 686. <https://doi.org/10.1039/b212437h>

Suramwar, N. V., Thakare, S. R., & Khaty, N. T. (2016). One pot synthesis of copper nanoparticles at room temperature and its catalytic activity. *Arabian Journal of Chemistry*, *9*, S1807–S1812. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.034>

Syafiuddin, A., Salmiati, Hadibarata, T., Salim, M. R., Kueh, A. B. H., & Sari, A. A. (2017a). A purely green synthesis of silver nanoparticles using *Carica papaya*, *Manihot esculenta*, and *Morinda citrifolia*: synthesis and antibacterial evaluations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*(9), 1349–1361. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1793-z>

Syafiuddin, A., Salmiati, Hadibarata, T., Salim, M. R., Kueh, A. B. H., & Sari, A. A. (2017b). A purely green synthesis of silver nanoparticles using *Carica papaya*, *Manihot esculenta*, and *Morinda citrifolia*: synthesis and antibacterial evaluations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*(9), 1349–1361. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1793-z>

Tamuly, C., Hazarika, M., Borah, S. C., Das, M. R., & Boruah, M. P. (2013). In situ biosynthesis of Ag, Au and bimetallic nanoparticles using *Piper pedicellatum* C.DC: Green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *102*, 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.007>

Tay, P. Y., Tan, C. P., Abas, F., Yim, H. S., & Ho, C. W. (2014). Assessment of extraction parameters on antioxidant capacity, polyphenol content, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG) and iriflophenone 3-C- $\beta$ -glucoside of agarwood (*Aquilaria crassna*) young leaves. *Molecules*, *19*(8), 12304–12319. <https://doi.org/10.3390/molecules190812304>

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5), S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>

Thakore, S. I., Nagar, P. S., Jadeja, R. N., Thounaojam, M., Devkar, R. V., & Rathore, P. S. (2019). Sapota fruit latex mediated synthesis of Ag, Cu mono and bimetallic nanoparticles and their in vitro toxicity studies. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(5), 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.042>

Truong, D.-H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>

Umer, A., Naveed, S., Ramzan, N., Rafique, M. S., & Imran, M. (2014). A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 19(3), 197–203. <https://doi.org/10.1590/S1517-70762014000300002>

UPRA, & Agronet. (2023). *Reporte: Evaluaciones Agropecuarias - EVA y Anuario Estadístico del Sector Agropecuario*. [https://www.agronet.gov.co/Lists/Boletin/Attachments/16811/20230704\\_BaseEVA\\_Agr%C3%ADcola20192022.xlsx](https://www.agronet.gov.co/Lists/Boletin/Attachments/16811/20230704_BaseEVA_Agr%C3%ADcola20192022.xlsx)

Valdez-Salas, B., Beltrán-Partida, E., Zlatev, R., Stoytcheva, M., Gonzalez-Mendoza, D., Salvador-Carlos, J., Moreno-Ulloa, A., & Cheng, N. (2021). Structure-activity relationship of diameter controlled Ag@Cu nanoparticles in broad-spectrum antibacterial mechanism. *Materials Science and Engineering C*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111501>

Valodkar, M., Modi, S., Pal, A., & Thakore, S. (2011). Synthesis and antibacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: A green approach. *Materials Research Bulletin*, 46(3), 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2010.12.001>

Varshney, R., Bhadauria, S., & Gaur, M. S. (2012). A Review: Biological Synthesis Of Silver and Copper Nanoparticles. *Nano Biomedicine and Engineering*, 4(2), 99–106. <https://doi.org/10.5101/nbe.v4i2.p99-106>

Venkatesan, T., Choi, Y.-W., & Kim, Y.-K. (2019). Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of Pinus densiflora Bark Extract. *BioMed Research International*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/3520675>

Vijayaraghavan, K., & Ashokkumar, T. (2017). Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(5), 4866–4883. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.09.026>

World Health Organization. (2018, February 7). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

World Health Organization. (2024, May 17). *WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health*. <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>

Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., & Wu, X. (2011). Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid. *Green Chemistry*, 13(4), 900. <https://doi.org/10.1039/c0gc00772b>

Ye, X. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., Wu, D., Xu, J. G., & Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, *124*(4), 1561–1566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.013>

Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(1), 27–32. <https://doi.org/10.1021/jf00049a007>

Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N. S., Quintero-Lira, A., Gómez-Aldapa, C. A., Alanís-García, E., Cervantes-Elizarrarás, A., Güemes-Vera, N., & Ramírez-Moreno, E. (2016). Application of ultrasound in a closed system: Optimum condition for antioxidants extraction of blackberry (*Rubus fruticosus*) residues. *Molecules*, *21*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070950>

Zaiter, A., Becker, L., Karam, M. C., & Dicko, A. (2016). Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(4), 2025–2032. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2201-4>

Zaleska-Medynska, A., Marchelek, M., Diak, M., & Grabowska, E. (2016). Noble metal-based bimetallic nanoparticles: the effect of the structure on the optical, catalytic and photocatalytic properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, *229*, 80–107. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.12.008>

Zanella, R. (2005). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: Controlando Forma y Tamaño. *Mundo Nano*, *19*(6), 2039–2039. [https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00323\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00323_1.x)

Zapata, I. C., Álzate, A. F., Zapata, K., Arias, J. P., Puertas, M. A., & Rojano, B. (2019). Effect of pH, temperature and time of extraction on the antioxidant properties of *Vaccinium meridionale* Swartz. *Journal of Berry Research*, 9(1), 39–49. <https://doi.org/10.3233/JBR-18299>

Zhao, J., Zhang, D., & Zhao, J. (2011). Fabrication of CuAg coreshell bimetallic superfine powders by eco-friendly reagents and structures characterization. *Journal of Solid State Chemistry*, 184(9), 2339–2344. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.06.032>

Ziege, R., Tsigoni, A.-M., Large, B., Serra, D. O., Blank, K. G., Hengge, R., Fratzl, P., & Bidan, C. M. (2021). Adaptation of *Escherichia coli* Biofilm Growth, Morphology, and Mechanical Properties to Substrate Water Content. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(11), 5315–5325. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.1c00927>

## Apéndices

### Apéndice A. Producción Anual de Cultivo en Colombia.

	<b>Cultivo</b>	<b>Producción [Ton]</b>	<b>Estado /producción</b>	<b>físico</b>	<b>Nombre científico</b>
<b>1</b>	Caña Panelera	2.073.097	Caña O Verde		<i>Saccharum officinarum L.</i>
<b>2</b>	Pina	388.214	En Fresco		<i>Ananas comosus L. Merr.</i>
<b>3</b>	Palma de Aceite	379.850	Aceite Crudo		<i>Elaeis guineensis Jacq.</i>
<b>4</b>	Mandarina	141.128	En Fresco		<i>Citrus reticulata</i>
<b>5</b>	Limón	116.329	En Fresco		<i>Citrus limon L.</i>
<b>6</b>	Yuca	90.507	En Fresco		<i>Manihot esculenta</i>
<b>7</b>	Plátano	88.248	En Fresco		<i>Musa paradisiaca L.</i>
<b>8</b>	Cebolla rama	86.225	En Fresco		<i>Allium fistulosum</i>
<b>9</b>	Naranja	76.146	En Fresco		<i>Citrus sinensis L. OSBECK</i>
<b>10</b>	Tomate	75.189	En Fresco		<i>Lycopersicon esculentum</i>
<b>11</b>	Guayaba	60.852	En Fresco		<i>Psidium guajava L.</i>
<b>12</b>	Papa	57.271	En Fresco		<i>Solanum tuberosum</i>
<b>13</b>	Café	48.028	Pergamino		<i>Coffea arabica L.</i>
<b>14</b>	Aguacate	38.983	En Fresco		<i>Persea americana</i>
<b>15</b>	Cacao	33.945	Grano Seco		<i>Theobroma cacao L.</i>
<b>16</b>	Mora	32.136	En Fresco		<i>Morus ssp</i>
<b>17</b>	Arroz	24.925	Paddy O Cascara Verde		<i>Oryza sativa</i>
<b>18</b>	Banano	21.970	En Fresco		<i>Musa cavendishii</i>
<b>19</b>	Maíz	20.408	Grano Seco		<i>Zea mays</i>

*Nota:* Elaboración propia a partir de la información obtenida del Anuario Estadístico del Sector Agropecuario del MADR, EVA y ENA del año 2019-2021 (UPRA & Agronet, 2023).

## Apéndice B. Producción Anual de Residuos en Colombia.

<b>Cultivo</b>	<b>Tipo Residuo</b>	<b>F.R.A *</b>	<b>Cantidad [Ton]</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cebolla rama</b>	Descarte	-	-	(Mejía González & Rondón Roa, 2013)
<b>Tomate</b>	Descarte	-	-	(Gómez Rueda & Parra Cepeda, 2013)
<b>Guayaba</b>	Descarte	-	-	(Solano Hernández & Mendoza Jaimes, 2013)
<b>Maíz</b>	Rastrojo, Tusa	-	-	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Caña Panela</b>	Bagazo	2,53	5.244.936	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Cacao</b>	Cacota	15,25	517.657	(Gómez Rueda & Parra Cepeda, 2013)
<b>Palma Aceite</b>	Fibra	0,63	239.305	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Mandarina</b>	Cáscara	0,50	70.564	(Gómez Rueda & Parra Cepeda, 2013)
<b>Limón</b>	Cáscara	0,50	58.164	(Gómez Rueda & Parra Cepeda, 2013)
<b>Pina</b>	Cáscara	0,13	50.468	(Solano Hernández & Mendoza Jaimes, 2013)
<b>Naranja</b>	Cáscara	0,52	39.596	(Gómez Rueda & Parra Cepeda, 2013)
<b>Aguacate</b>	Cáscara Semilla	y 0,52	20.271	(Solano Hernández & Mendoza Jaimes, 2013)
<b>Plátano</b>	Rechazo	0,15	13.237	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Café</b>	Cisco	0,21	10.086	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Mora</b>	Semilla	0,25	8.034	(Mejía González & Rondón Roa, 2013)
<b>Papa</b>	Cáscara	0,14	8.018	(Mejía González & Rondón Roa, 2013)
<b>Arroz</b>	Cascarilla	0,20	4.985	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Banano</b>	Rechazo	0,15	3.296	(Escalante Hernández et al., 2011)
<b>Yuca</b>	Cáscara	0,02	1.810	(Mejía González & Rondón Roa, 2013)

*Nota:* \* Factor de Residuo Agrícola Industrial. Fuente: Elaboración propia a partir de las contribuciones de Mejía González & Rondón Roa (2013), Gómez Rueda & Parra Cepeda (2013) y Solano Hernández & Mendoza Jaimes (2013), y la información recopilada del Anuario Estadístico del Sector Agropecuario del MADR, EVA y ENA del año 2019-2021.

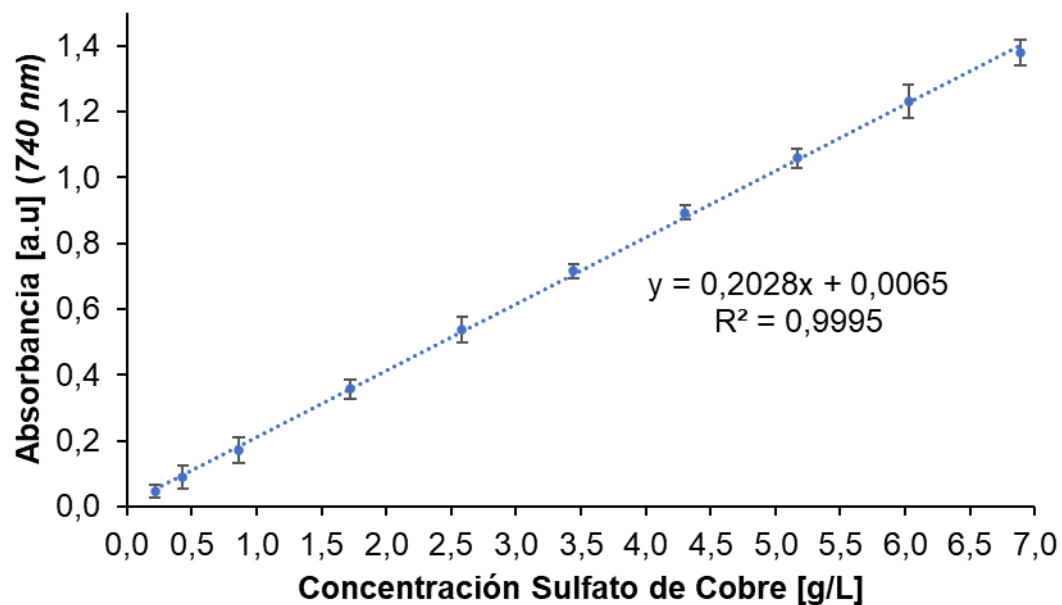
## Apéndice C. Resultados y Curvas de calibración de la Prueba De Benedict Modificada.

Extracciones por Maceración y Soxhlet.

<b>Residuo</b>	<b>Método de Extracción</b>	<b>°Brix*</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>CuSO<sub>4</sub> [g]</b>	<b>Poder Reductor Cu<sup>2+***</sup></b>
<b>Cáscara Mandarina</b>	<i>Maceración</i>	3,2	0,109	3,057	0,185
		3,2	0,409	11,933	0,119
		3,2	0,121	3,412	0,182
	<i>Soxhlet</i>	5,0	0,189	5,424	0,107
		6,6	0,247	7,140	0,075
		4,0	0,193	5,542	0,133
<b>Cáscara Plátano Verde</b>	<i>Maceración</i>	1,2	0,884	25,988	0,038
		1,2	0,872	25,632	0,045
		1,2	0,898	26,402	0,030
	<i>Soxhlet</i>	1,6	0,737	21,638	0,093
		1,0	0,891	26,195	0,040
		1,1	0,876	25,751	0,046
<b>Cáscara Piña</b>	<i>Maceración</i>	2,6	0,697	20,455	0,068
		2,6	0,796	23,384	0,041
		2,6	0,733	21,520	0,058
	<i>Soxhlet</i>	3,8	0,580	16,993	0,068
		3,4	0,629	18,443	0,066
		4,0	0,560	16,401	0,068
<b>Semilla Mora</b>	<i>Maceración</i>	0,1	0,835	24,538	0,799
		0,1	0,894	26,283	0,384
		0,1	0,833	24,479	0,813
	<i>Soxhlet</i>	0,1	0,813	23,887	0,954
		0,3	0,788	23,147	0,377
		0,1	0,877	25,780	0,503

Nota: \* La medida de °Brix se encuentra en [g sólidos disueltos/100ml de solución]. \*\* La medida de capacidad de reducción se encuentra en [g CuSO<sub>4</sub> reducido/g extracto].

### Curva de Calibración Reactivo Benedict



Fuente: Elaboración propia a partir de las contribuciones de Gómez G & Sampayo V, 2020.

Apéndice D. Prueba No-paramétrica de la mediana De Mood. Diferencias Estadísticamente Significativas de los Extractos de Residuos Agroindustriales.

A) Cáscara de Mandarina (CA)

Tecnica	Mediana	Mediana general de N <=	Mediana general de N >	Q3 – Q1	IC de la mediana de 95%
M	0,182167	1	2	0,0660455	(0,118763; 0,184808)
S	0,107006	2	1	0,0581786	(0,0748739; 0,133052)
General	0,125908				

Los niveles con < 6 observaciones tienen confianza < 95%  
 IC de 99,8% para mediana(M) - mediana(S): (-0,0142897; 0,109934)

Hipótesis nula H<sub>0</sub>: Las medianas de población son todas iguales  
 Hipótesis alterna H<sub>1</sub>: Las medianas de población no son todas iguales

GL Chi-cuadrada Valor p

1	0,67	0,414
---	------	-------

B) Cáscara de Plátano (CPL)

Tecnica	Mediana	Mediana general de N <=	Mediana general de N >	Q3 – Q1	IC de la mediana de 95%
M	0,0378420	2	1	0,0152639	(0,0296230; 0,0448868)
S	0,0464057	1	2	0,0526271	(0,0404789; 0,0931061)
General	0,0426829				

Los niveles con < 6 observaciones tienen confianza < 95%  
 IC de 89,8% para mediana(M) - mediana(S): (-0,0634831; 0,00440787)

Hipótesis nula H<sub>0</sub>: Las medianas de población son todas iguales  
 Hipótesis alterna H<sub>1</sub>: Las medianas de población no son todas iguales

GL Chi-cuadrada Valor p

1	0,67	0,414
---	------	-------

C) Cáscara de Piña (CPI)

Tecnica	Mediana	Mediana general de N <=	Mediana general de N >	Q3 – Q1	IC de la mediana de 95%
M	0,0583799	2	1	0,0268246	(0,0413096; 0,0681343)
S	0,0683089	1	2	0,0022235	(0,0661924; 0,0684159)
General	0,0671634				

Los niveles con < 6 observaciones tienen confianza < 95%  
 IC de 89,8% para mediana(M) - mediana(S): (-0,0271063; 0,00194188)

Hipótesis nula  $H_0$ : Las medianas de población son todas iguales  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : Las medianas de población no son todas iguales

GL Chi-cuadrada Valor p

1 0,67 0,414

#### D)Semilla de Mora (SM)

Tecnica	Mediana	Mediana general de N <=	Mediana general de N >	Q3 – Q1	IC de la mediana de 95%
M	0,799301	1	2	0,429736	(0,383655; 0,813391)
S	0,503417	2	1	0,577485	(0,376803; 0,954288)
General	0,651359				

*Los niveles con < 6 observaciones tienen confianza < 95%*  
*IC de 89,8% para mediana(M) - mediana(S): (-0,570633;0,436588)*

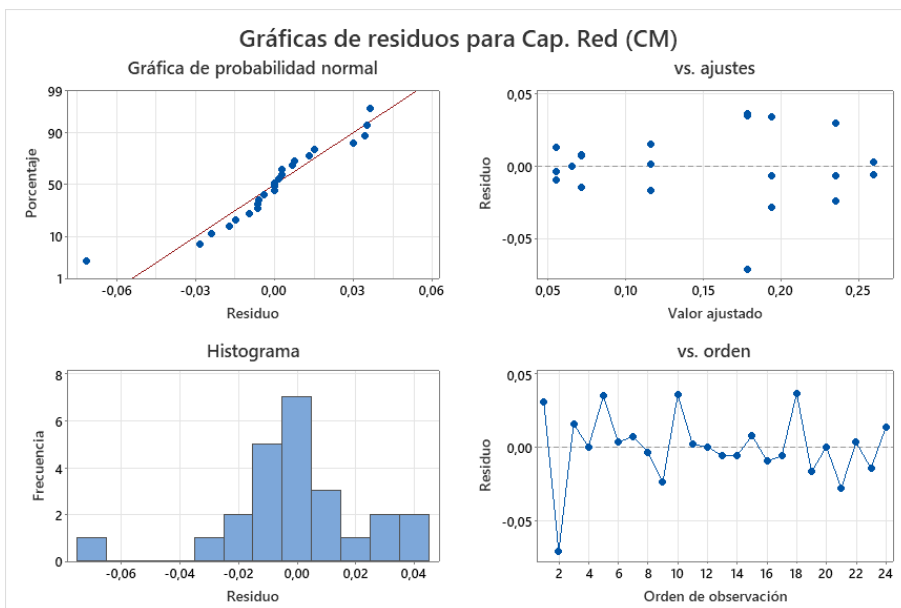
Hipótesis nula  $H_0$ : Las medianas de población son todas iguales  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : Las medianas de población no son todas iguales

GL Chi-cuadrada Valor p

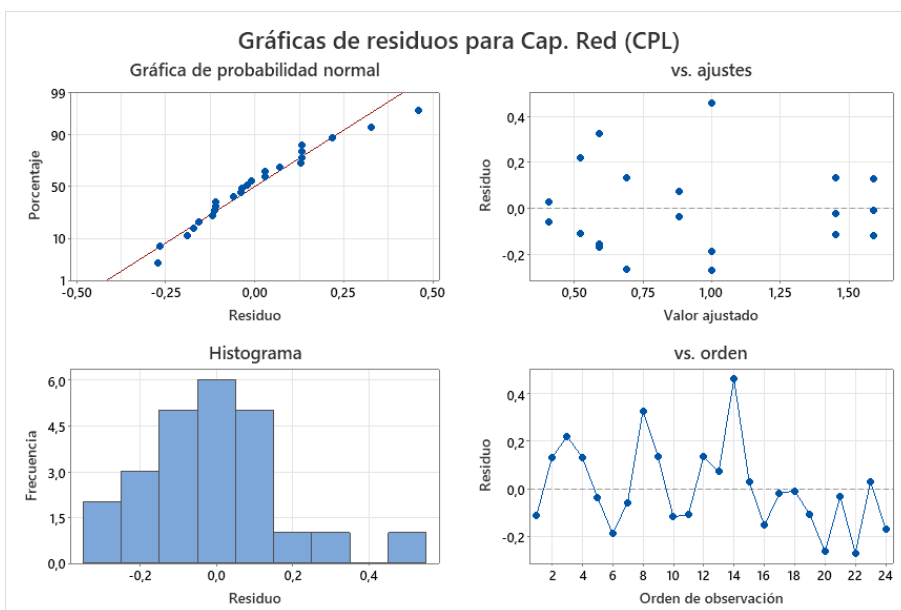
1 0,67 0,414

Apéndice E. Verificación de los Supuestos de Normalidad, Varianza Constante e Independencia del Análisis de Varianza de las Pruebas Estadísticas.

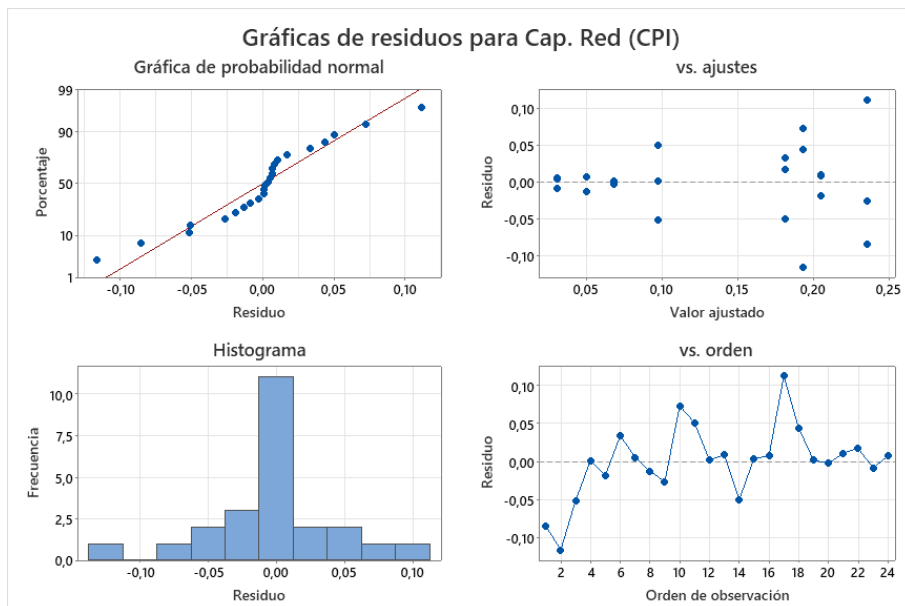
A) Cáscara de Mandarina (CM)



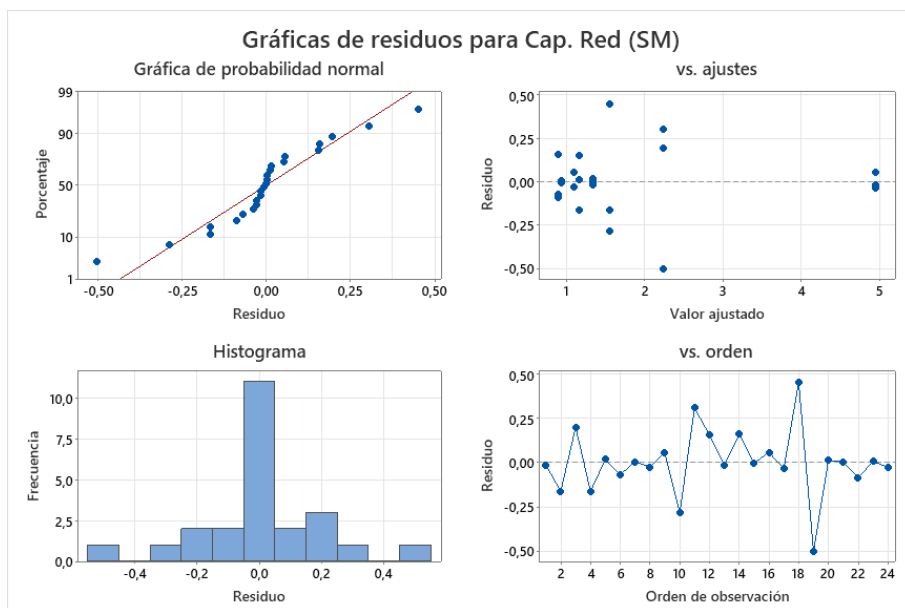
B) Cáscara de Plátano (CPL)



## C) Cáscara de Piña (CPI)

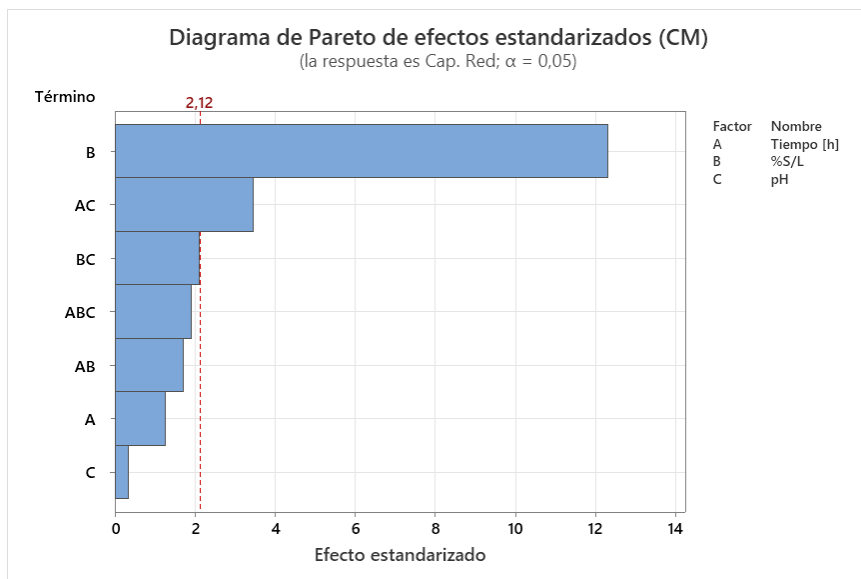


## D) Semilla de Mora (SM)

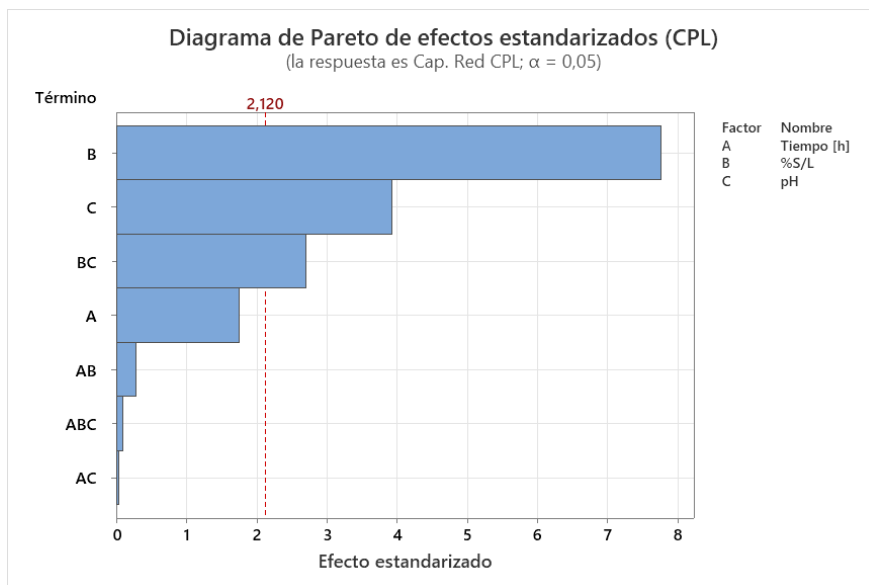


Apéndice F. Análisis de Diseño Factorial. Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados de las Pruebas Estadísticas de los Extractos de Residuos Agroindustriales.

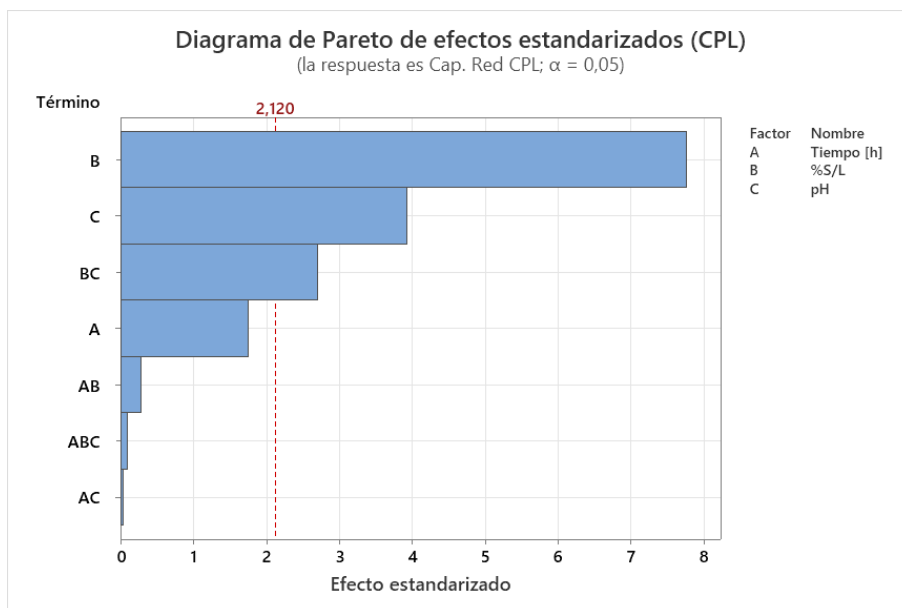
A) Cáscara de Mandarina (CM)



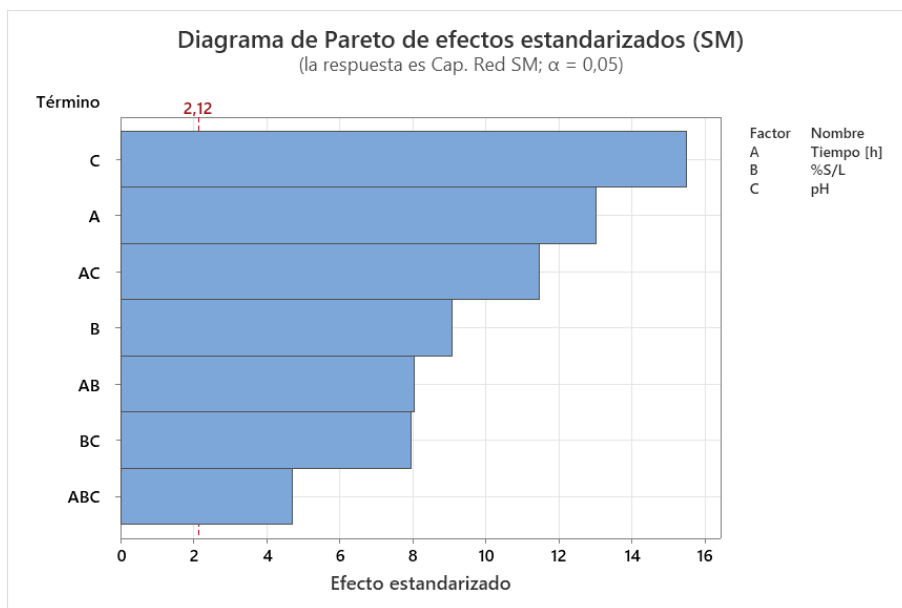
B) Cáscara de Plátano (CPL)



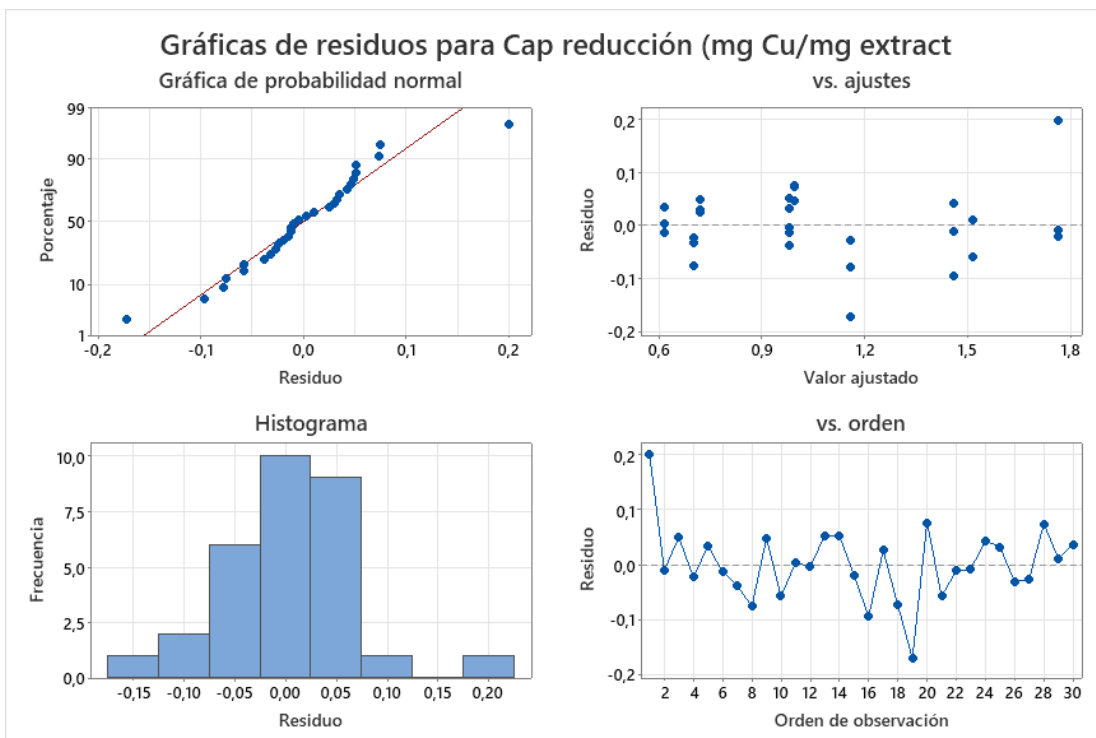
## C) Cáscara de Piña (CPI)



## D) Semilla de Mora (SM)

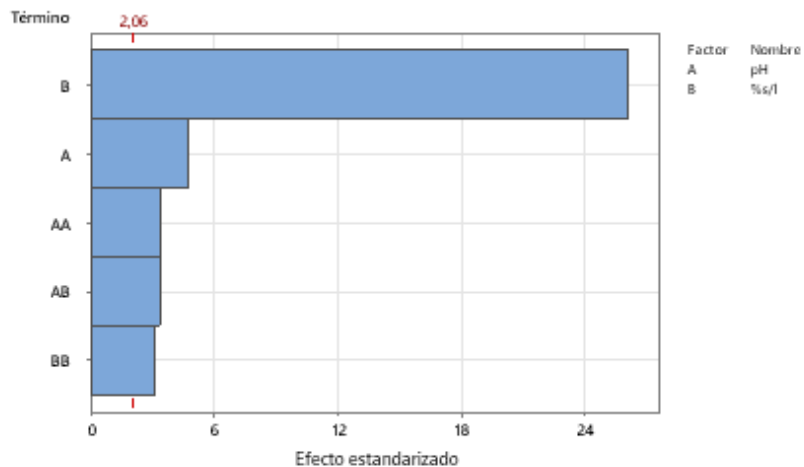


Apéndice G. Análisis de Diseño Central Compuesto de la Cap. Reducción del Extracto de Cáscara de Plátano (CPL). Verificación de los Supuestos de Normalidad, Varianza Constante e Independencia. Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados.

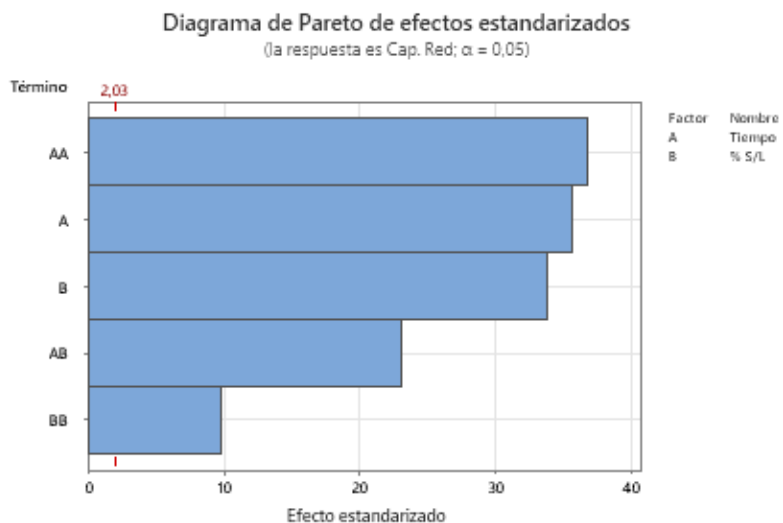
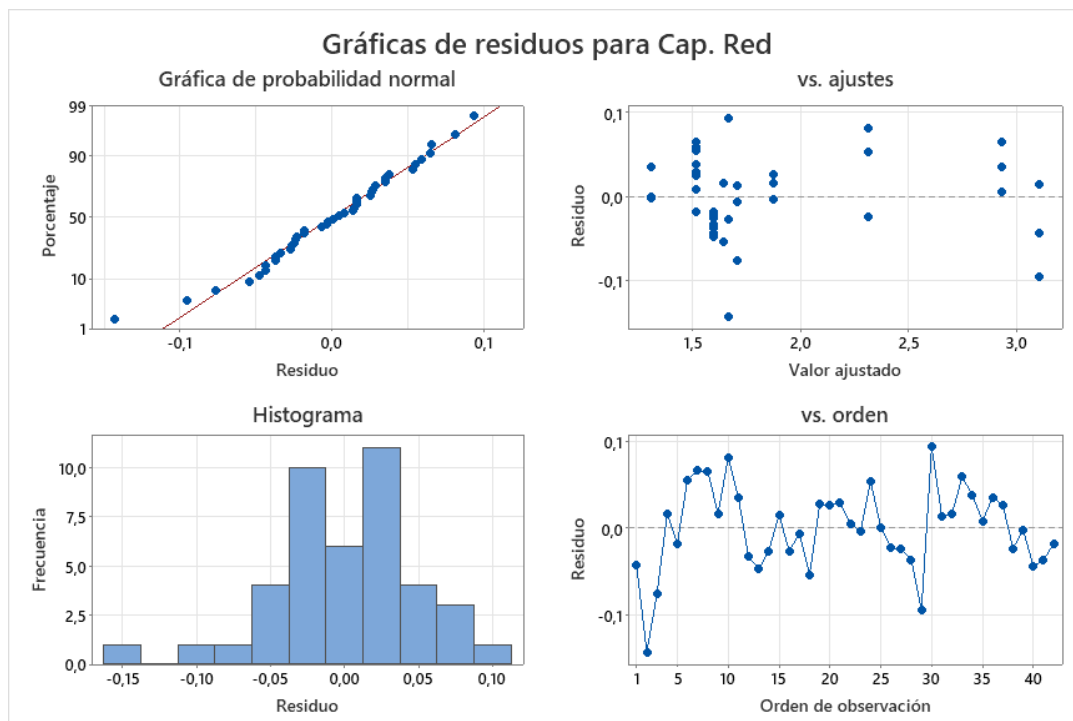


**Diagrama de Pareto de efectos estandarizados**

(la respuesta es Cap reducción (mg Cu/mg extract;  $\alpha = 0,05$ )



Apéndice H. Análisis de Diseño Central Compuesto de la Cap. Reducción del Extracto de Semilla de Mora (SM). Verificación de los Supuestos de Normalidad, Varianza Constante e Independencia. Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados.



Fuente: Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).

Apéndice I. Modelo Matemático con la Predicción de la Capacidad de Reducción del Extracto de CPL.

### Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Cap reducción (mg Cu/mg extract)} = 4,121 - 0,948 \text{ pH} - 0,2479 \text{ \%s/l} + 0,0951 \text{ pH}^2 + 0,00539 \text{ \%s/l}^2 + 0,01771 \text{ pH} \cdot \text{\%s/l}$$

### Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0,0731801	96,85%	96,20%	94,82%

### Predicción de respuesta múltiple

Variable configuración	Valor de			
pH	3			
\%s/l	2			
Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Cap reducción (mg Cu/mg extract)	1,7635	0,0377	(1,6856; 1,8414)	(1,5936; 1,9334)

Apéndice J. Modelo Matemático con la Predicción de la Capacidad de Reducción del Extracto de SM.

### Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Cap. Red} = 5,9589 - 0,21340 \text{ Tiempo} - 0,4671 \% \text{ S/L} + 0,002799 \text{ Tiempo} * \text{Tiempo} \\ + 0,01193 \% \text{ S/L} * \% \text{ S/L} + 0,009555 \text{ Tiempo} * \% \text{ S/L}$$

*Ecuación promediada sobre los bloques.*

### Resumen del modelo

	S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
	0,0516140	99,20%	99,07%	98,76%

### Predicción de respuesta múltiple

Variable configuración	Valor de			
Tiempo	7,02944			
% S/L	0,757359			
Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Cap. Red	4,3011	0,0439	(4,2120; 4,3901)	(4,1636; 4,4386)

*Fuente: Elaboración propia con contribuciones de (Montoya Salas, 2023).*

Apéndice K. Condiciones de extracción generadas según el diseño factorial fraccionado propuesto.

<b>N° Prueba</b>	<b>Sal metálica [mMol]</b>	<b>%Extracto [%v/v]</b>	<b>pH</b>	<b>t<sub>r</sub> [min]</b>
<b>1</b>	1	25	4	30
<b>2</b>	10	25	4	120
<b>3</b>	1	75	4	120
<b>4</b>	10	75	4	30
<b>5</b>	1	25	12	120
<b>6</b>	10	25	12	30
<b>7</b>	1	75	12	30
<b>8</b>	10	75	12	120

Apéndice L. Procedimiento para la validación de los datos de la medición del diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño y el índice de polidispersión a partir de la técnica de caracterización mediante DLS.

Determinar los valores de los parámetros *Intercept  $gI^2$* , *Baseline* y *Mean Intensity*.

Evaluar los parámetros según los criterios que se observan en la siguiente tabla:

<b>Parámetro</b>	<b><i>Intercept <math>gI^2</math></i></b>	
<b>Rango</b>	<b>Criterio</b>	<b>Respuesta</b>
<0.8	Dispersión débil	Rechazado
[0.8,0.95]	Fiable/Válido	Aprobado
>0.95	Partículas de polvo o agregados	Rechazado

<b>Parámetro</b>	<b><i>Baseline</i></b>	
<b>Rango</b>	<b>Criterio</b>	<b>Respuesta</b>
<0.99	No-Fiable	Rechazado
[0.99,1.01]	Fiable/Válido	Aprobado
>1.01	No-Fiable	Rechazado

<b>Parámetro</b>	<b><i>Intensity</i></b>	
<b>Rango [kcps/s]</b>	<b>Criterio</b>	<b>Respuesta</b>
<250	Dispersión débil	Rechazado
[250,600]	Buena señal/Válido	Aprobado
>600	Posible dispersión múltiple	Rechazado

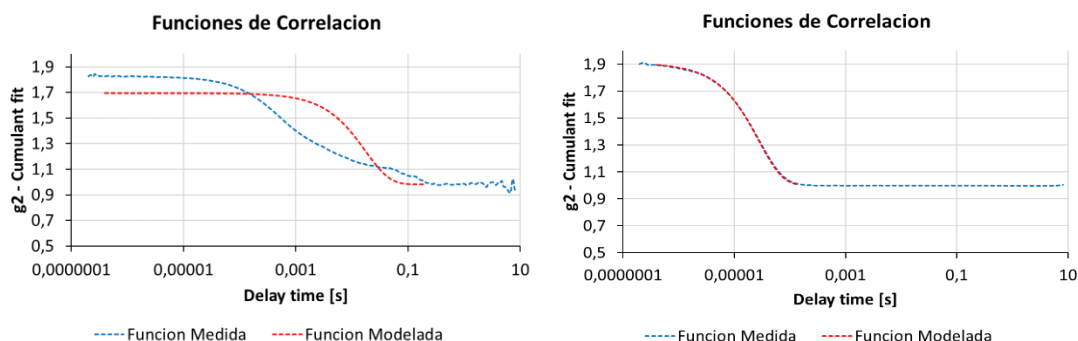
*Nota:* Dado que estos criterios están directamente correlacionados, si al menos dos (2) de estos tres (3) son considerados válidos la medida es aprobada. En el caso en el que este criterio no se cumpla, la medida es rechazada y se analiza si esta muestra está muy diluida, tiene partículas muy grandes y/o puede estar generando dispersión de luz múltiple para, según el caso, ser evaluada nuevamente.

Ejemplo:

Parámetro	Respuesta	
<i>Intercept <math>gI^2</math></i>	Dispersión débil (X)	Dispersión débil (X)
<i>Baseline</i>	No-Fiable (X)	Fiable/Válido (OK)
<i>Mean intensity</i>	Dispersión débil (X)	Buena señal/Válido (OK)
Veredicto	Rechazada	Aprobada

Comparar las *Funciones de autocorrelación* medidas y modeladas. La función de autocorrelación medida y la función de ajuste acumulada modelada deben ser lo más similares posible. Una diferencia muy alta entre éstas genera que los valores de los *Diagramas de distribución de tamaño de partícula* no sean válidos debido a la poca estabilidad y alta sedimentación de la muestra.

Ejemplo:

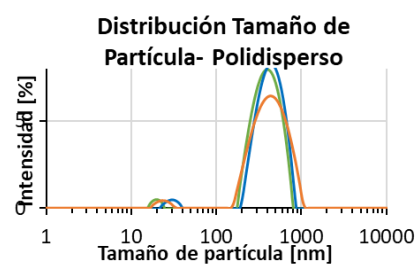
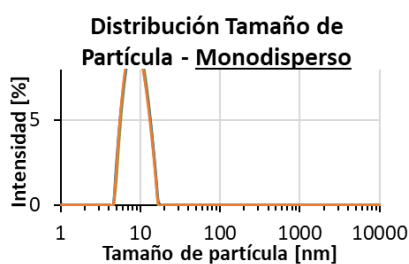


(Rechazada)(Aprobada)

Observar el *Diagrama de distribución de tamaño de partícula* de la muestra analizada. Si en este se evidencia un (1) pico único, esta se determina como monodispersa y se tiene en cuenta el valor de tamaño de partícula tomado por el equipo. En el caso en el que se evidencien dos (2) o más picos, la muestra se determina como polidispersa y, si la magnitud de intensidad es muy alta, se toma como válido el pico de mayor tamaño dada su prevalencia sobre los demás. Sin embargo, si sus tamaños son relativamente similares, se tendrá en cuenta el pico de menor

tamaño debido a que pocas moléculas grandes pueden tener una mayor magnitud de intensidad, ya que dispersan una mayor cantidad de luz, a pesar de estar en mucha menor cantidad.

Ejemplo:

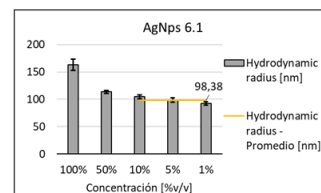


\*El equipo realiza tres (3) de cada una de estas mediciones para (1) una misma muestra, por lo que el valor final de estas es un promedio aritmético.

Realizar el procedimiento anterior (puntos 1, 2 y 3) a diferentes concentraciones para validar la medición realizada y verificar su independencia respecto a su concentración. Se comienza con el 100% y esta medida se diluye consecutivamente hasta que se evidencie una estabilización en la medida y no se observe una variación considerable en el valor del tamaño de partícula.

Ejemplo:

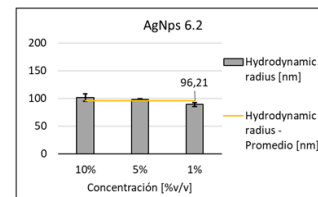
Name	Concentration	Hydrodynamic radius [nm]	DESV [nm]	Polydispersity index	DESV	Hydrodynamic radius - Promedio [nm]	DESV [nm]
6.1	100%	162,96	9,99	1,41	1,04		
	50%	113,45	2,48	0,27	0,17		
	10%	104,51	3,66	0,16	0,01	98,38	6,26
	5%	98,64	3,83	0,18	0,01	98,38	6,26
	1%	92,00	3,03	0,19	0,04	98,38	6,26



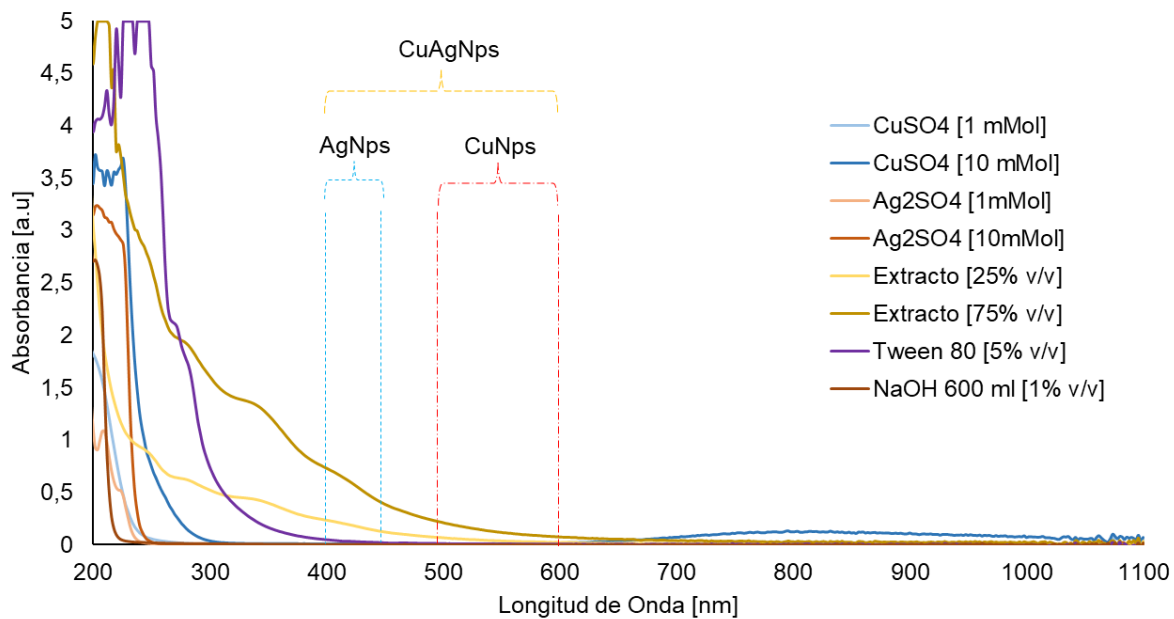
Se realiza la medición del duplicado, pero esta se verifica iniciando en los puntos establecidos como independientes de la muestra previa y confirmar su independencia.

Ejemplo:

Name	Concentration	Hydrodynamic radius [nm]	DES [nm]	Polydispersity index	DES	Hydrodynamic radius - Promedio [nm]	DES [nm]
6.2	10%	101,73	6,77	0,17	0,04	96,21	6,38
	5%	97,67	1,53	0,18	0,04	96,21	6,38
	1%	89,22	3,46	0,15	0,04	96,21	6,38



Apéndice M. Gráficas de los espectros de los reactivos utilizados en la síntesis de las soluciones coloidales.



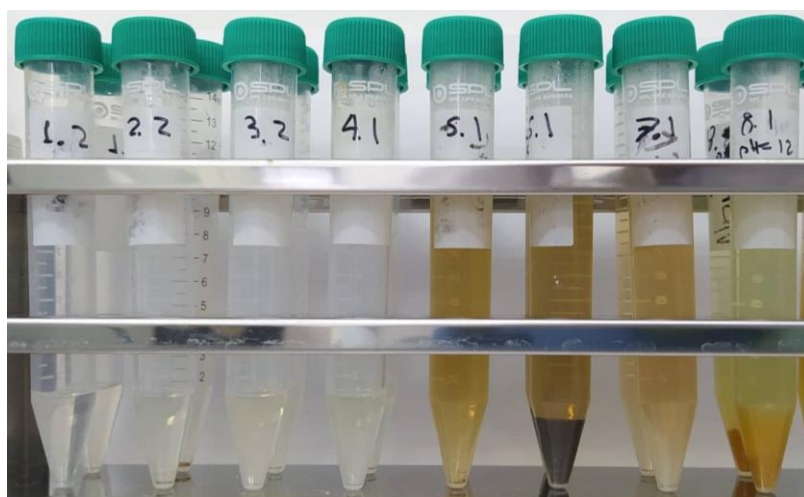
*Nota: Según la bibliografía consultada, para la identificación de nanopartículas, la longitud de onda característica de las AgNps se evidencia entre 400-450 nm, para las CuNps entre 500-600 nm y para las CuAgNps se observa entre 400-600 nm (Valodkar et al., 2011).*

Apéndice N. Color de soluciones coloidales de Cu, Ag y CuAg tras 48 horas de reposo, según las condiciones de síntesis aplicadas.

1	2	3	4	5	6	7	8
1-25-4-30	10-25-4-120	1-25-4-120	10-75-4-30	1-75-12-120	10-75-12-30	1-75-12-30	10-75-12-120

*Nota: \*Las condiciones de síntesis son representadas por Sal metálica [mMol] – Extracto [%v/v] – pH – Tiempo reacción [min].*

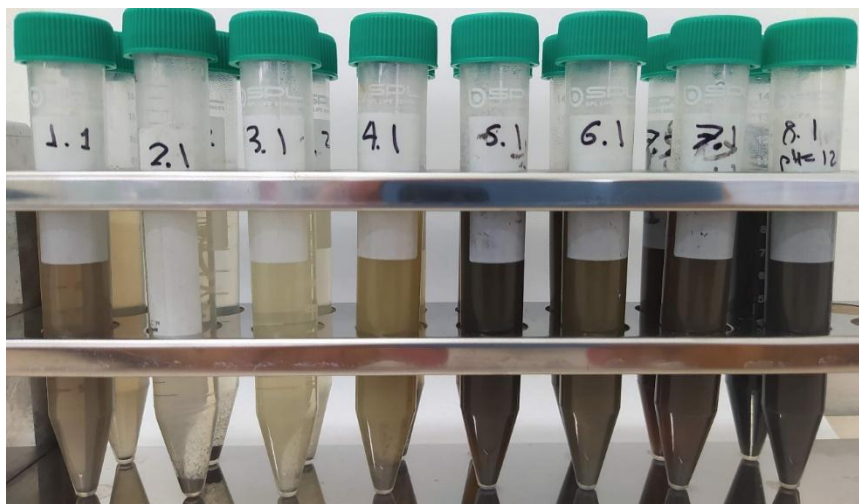
Solución coloidal de cobre



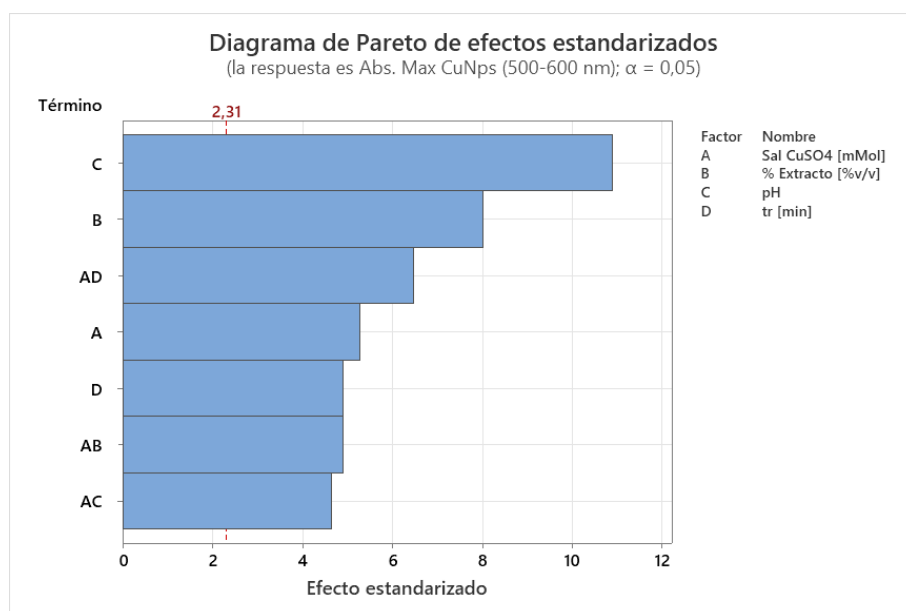
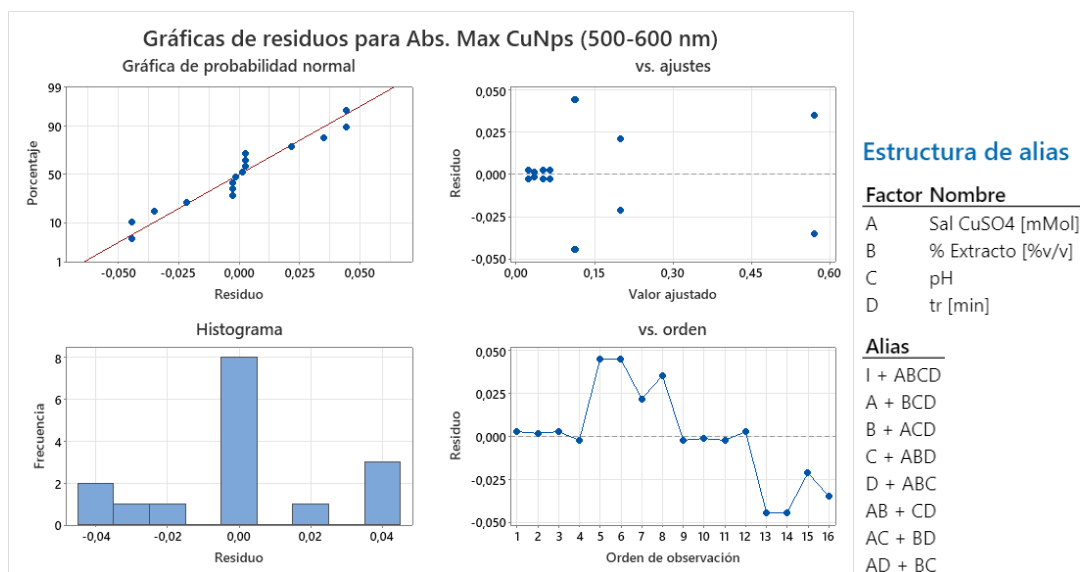
Solución coloidal de plata



## Solución coloidal de cobre/plata

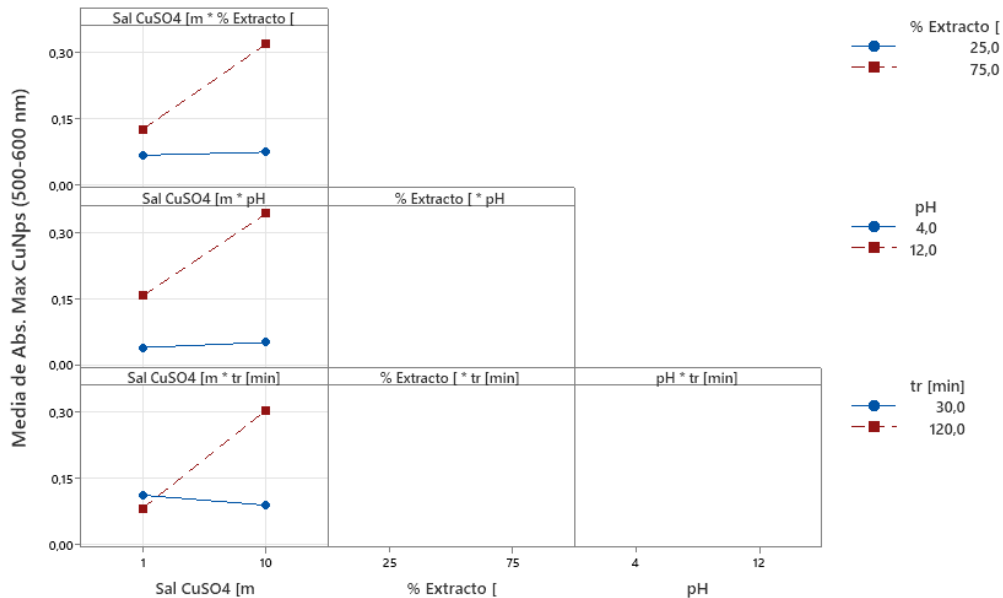


Apéndice O. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado de la máxima absorbancia entre 500 y 600 nm para la Síntesis de CuNps.



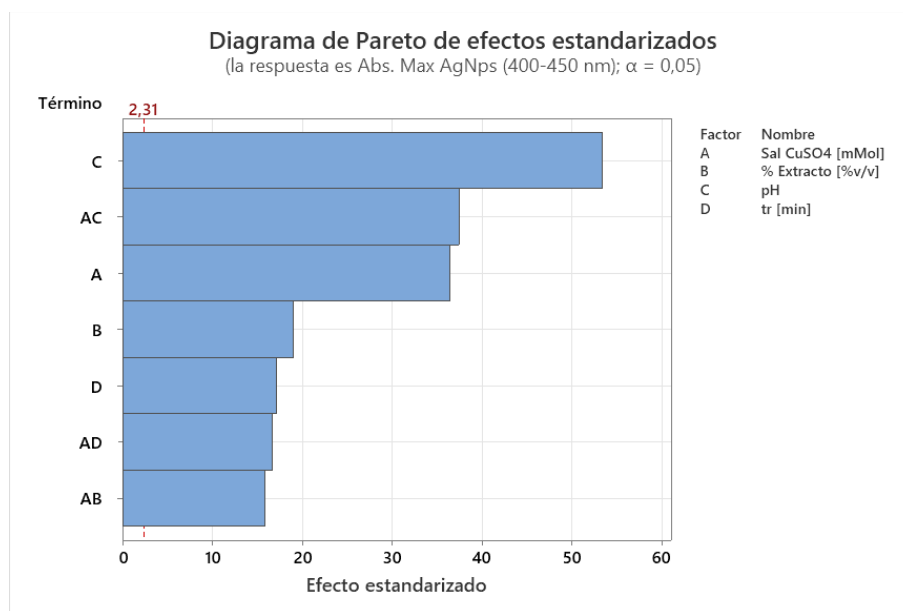
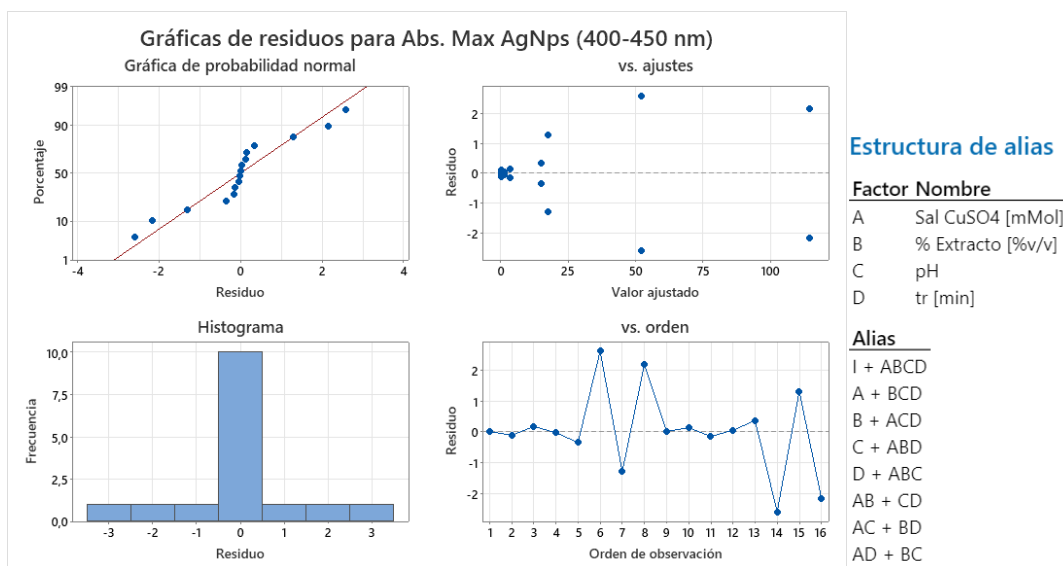
### Gráfica de interacción para Abs. Max CuNps (500-600 nm)

Medias ajustadas

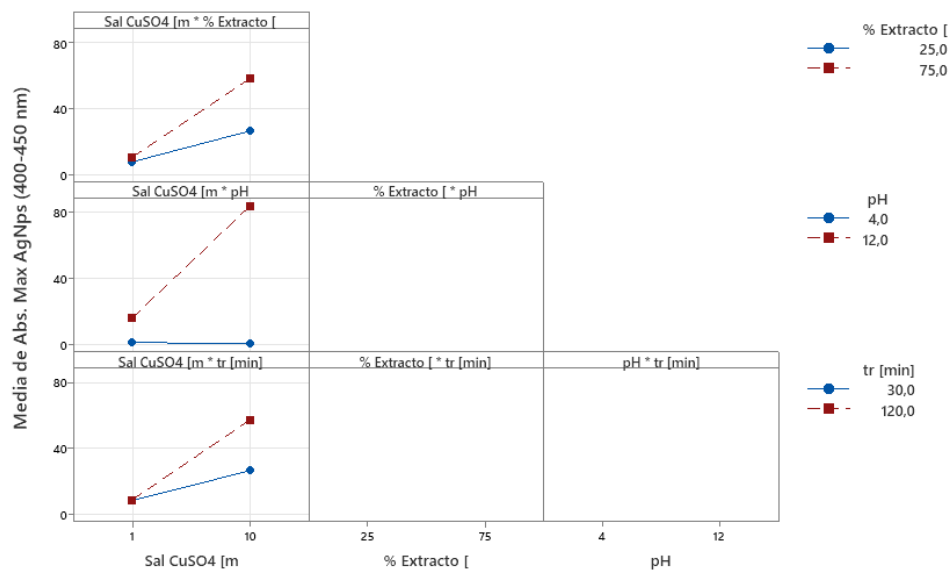


*Nota: Los recuadros vacíos en la gráfica de interacción representan las interacciones que formaron estructuras de alias y no pueden ser identificadas en el diseño factorial fraccionado.*

Apéndice P. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado de la máxima absorbancia entre 400 y 450 nm para la Síntesis de AgNps.

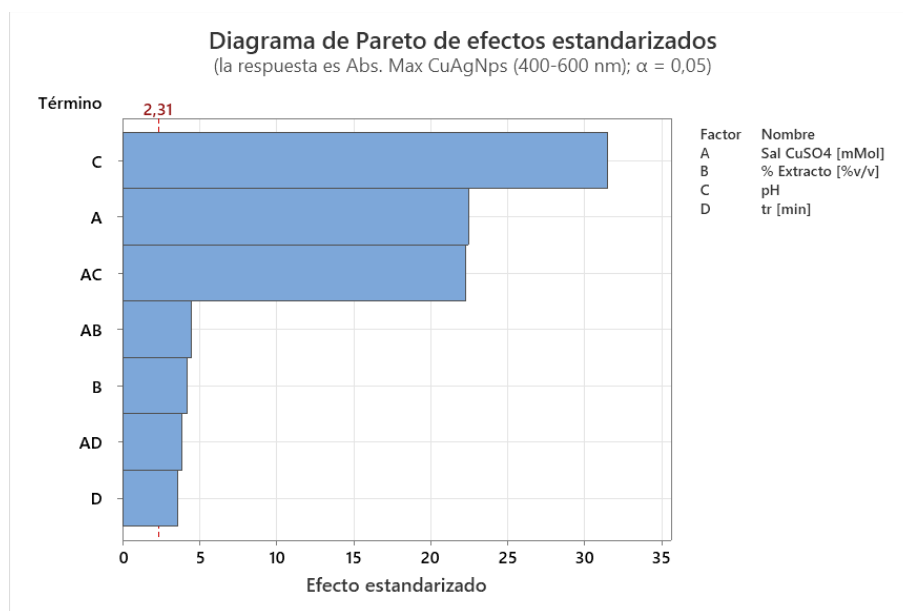
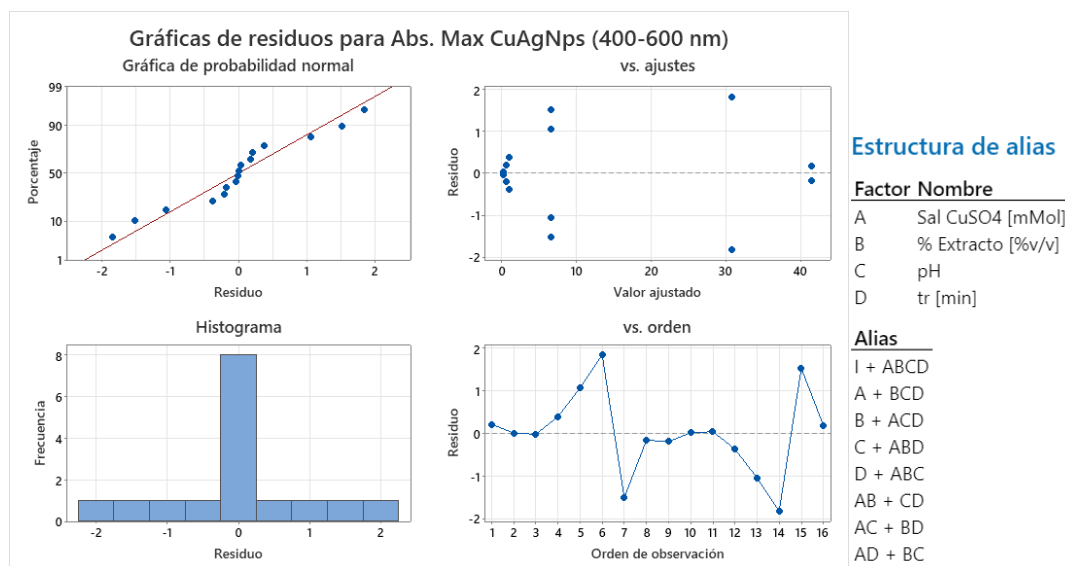


Gráfica de interacción para Abs. Max AgNps (400-450 nm)  
Medias ajustadas

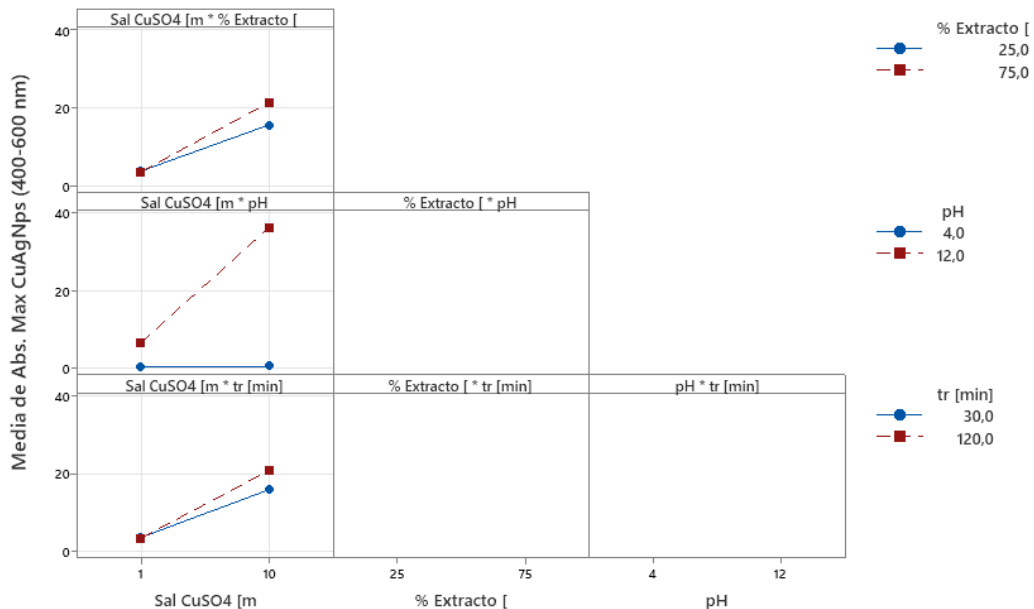


*Nota: Los recuadros vacíos en la gráfica de interacción representan las interacciones que formaron estructuras de alias y no pueden ser identificadas en el diseño factorial fraccionado.*

Apéndice Q. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado de la máxima absorbancia entre 400 y 600 nm para la Síntesis de CuAgNps.



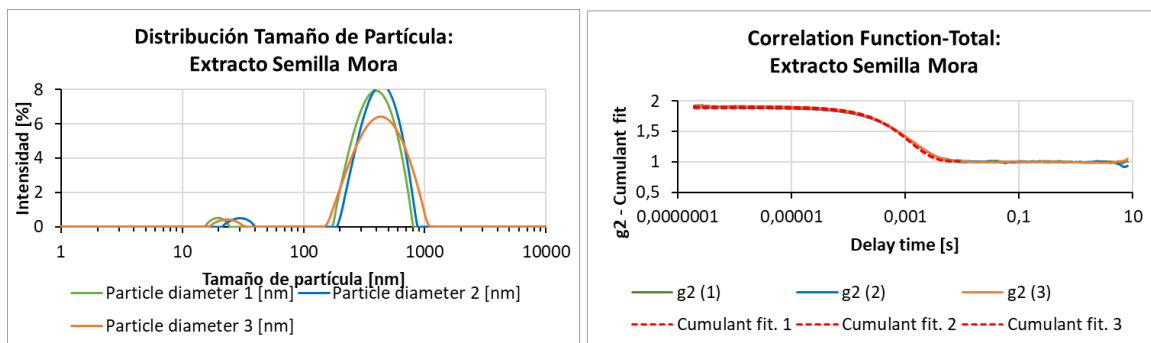
Gráfica de interacción para Abs. Max CuAgNps (400-600 nm)  
Medias ajustadas



*Nota: Los recuadros vacíos en la gráfica de interacción representan las interacciones que formaron estructuras de alias y no pueden ser identificadas en el diseño factorial fraccionado.*

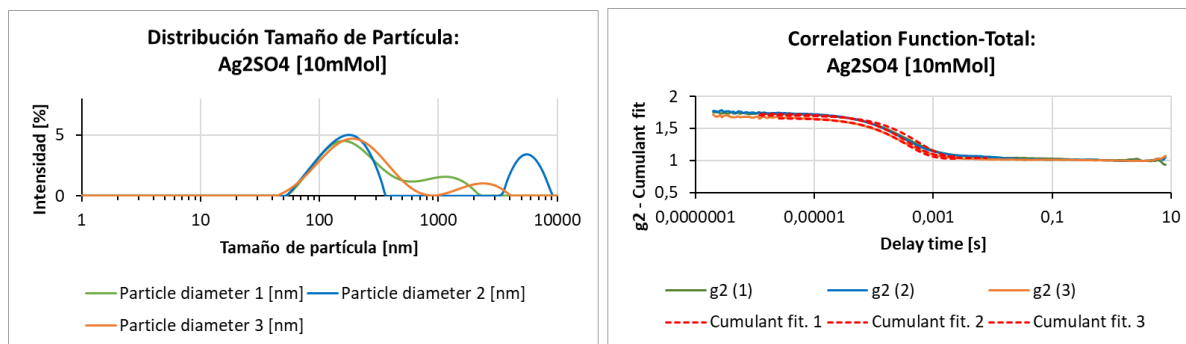
Apéndice R. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los reactivos utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas de Cu, Ag y CuAg.

**Reactivo:** Extracto semilla de mora

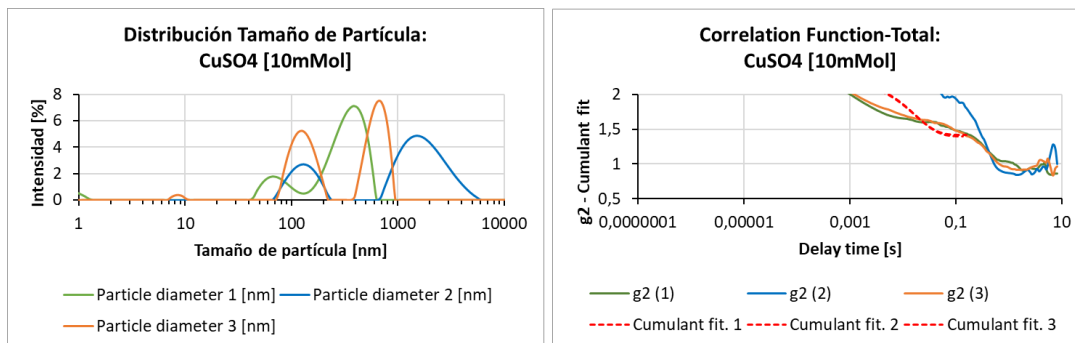


	PROMEDIO	DESV. EST
Hydrodynamic diameter	438,68 nm	27,64 nm
Polydispersity index	0,13	0,03
	Polydisperse-Moderate	
Intercept $g_1^2$	RELIABLE	
Baseline	RELIABLE	
Mean intensity	ENOUGH signal	

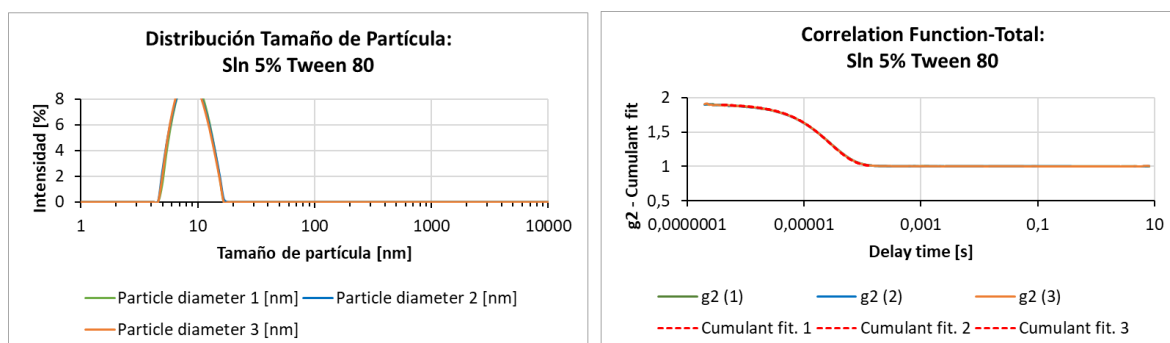
**Reactivo:**  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  [10 mMol]



	PROMEDIO	DESV. EST
Hydrodynamic diameter	195,27 nm	25,14 nm
Polydispersity index	0,21	0,04
	Polydisperse-Moderate	
Intercept $g_1^2$	WEAK Scattering	
Baseline	UNRELIABLE	
Mean intensity	WEAK Scattering	

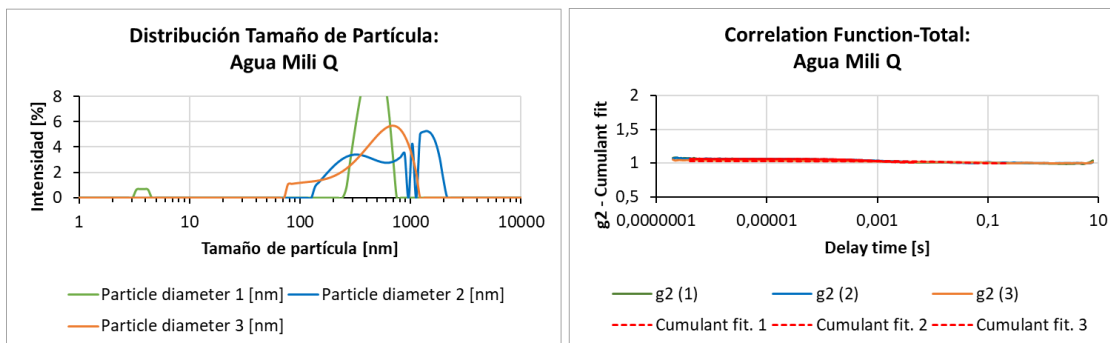
**Reactivo: CuSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O [10 mMol]**


	PROMEDIO	DES. EST
Hydrodynamic diameter	972,23 nm	831,43 nm
Polydispersity index	0,11 %	0,06
	Polydisperse-Moderate	
Intercept g <sup>1</sup> <sup>2</sup>	WEAK Scaterring	
Baseline	UNRELIABLE	
Mean intensity	WEAK Scaterring	

**Reactivo: Tween 80 [5 % v/v]**


	PROMEDIO	DES. EST
Hydrodynamic diameter	8,95 nm	0,07 nm
Polydispersity index	0,07	0,00
	Polydisperse-Moderate	
Intercept g <sup>1</sup> <sup>2</sup>	RELIABLE	
Baseline	RELIABLE	
Mean intensity	ENOUGH signal	

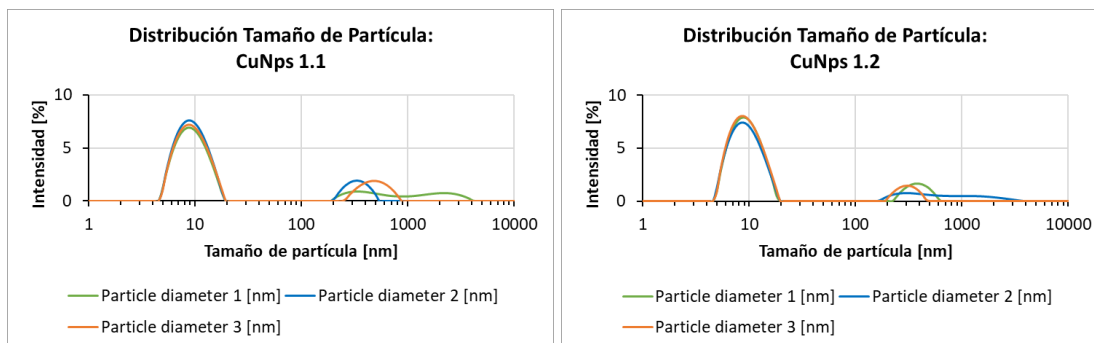
## Reactivo: Agua Mili Q



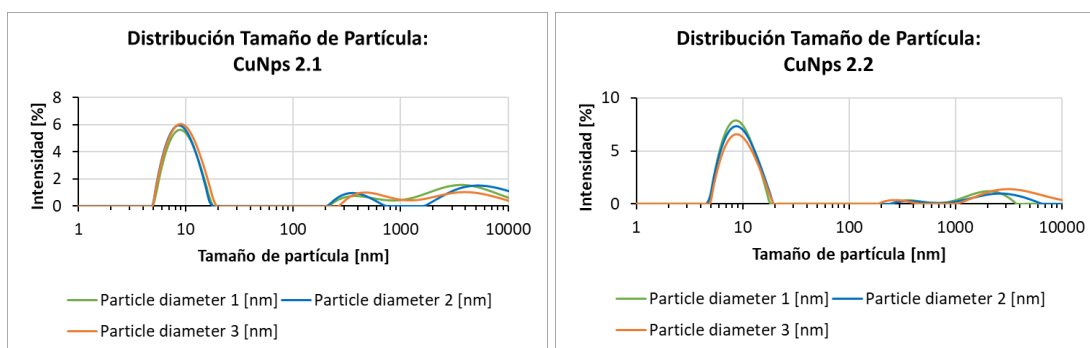
	PROMEDIO	DESV. EST
Hydrodynamic diameter	825,69 nm	585,63 nm
Polydispersity index	0,34	0,52
	Polydisperse-Moderate	
Intercept $g_1^2$	WEAK Scattering	
Baseline	UNRELIABLE	
Mean intensity	WEAK Scattering	

## Apéndice S. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de CuNps.

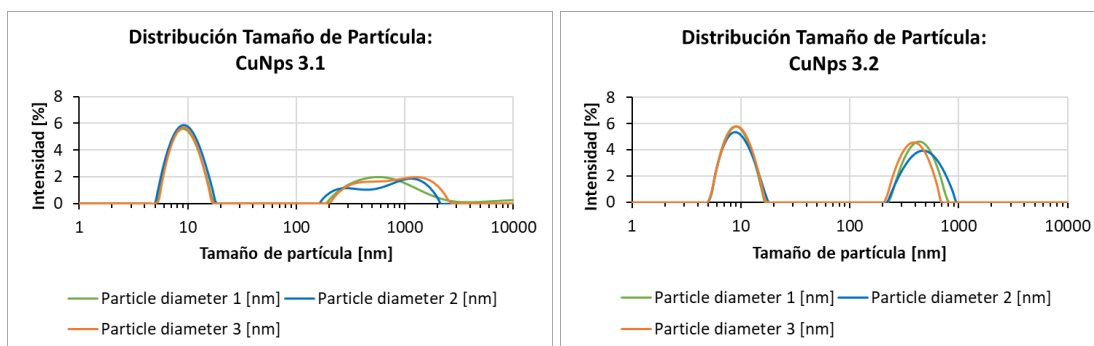
### Prueba 1:



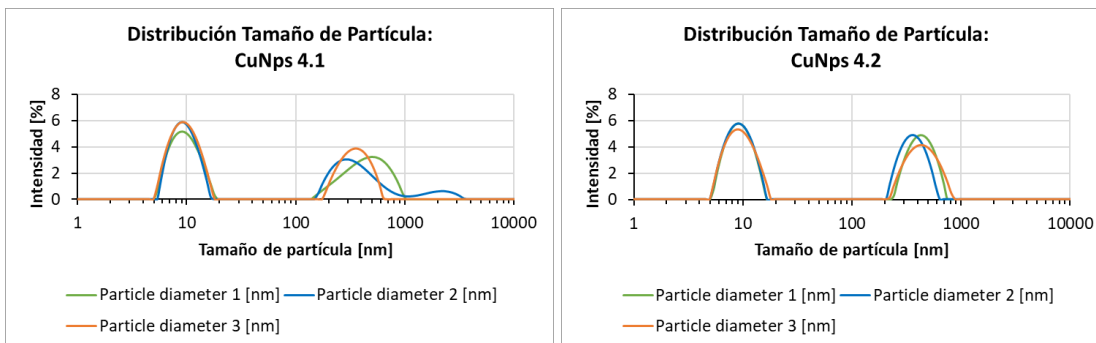
### Prueba 2:



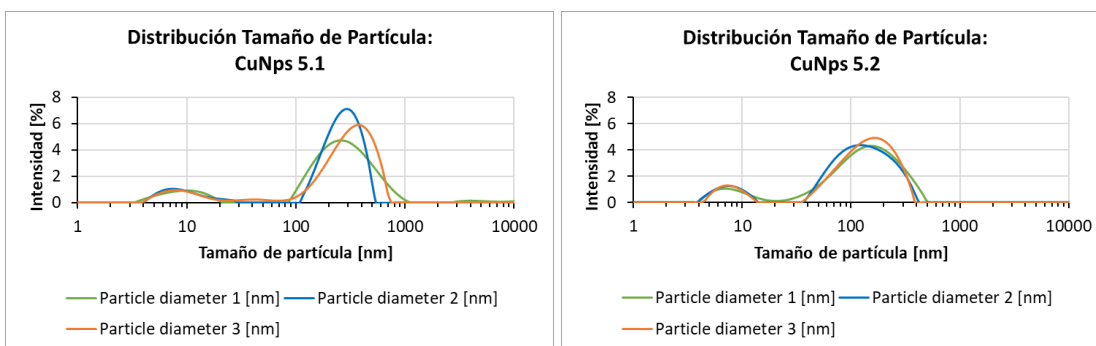
### Prueba 3:



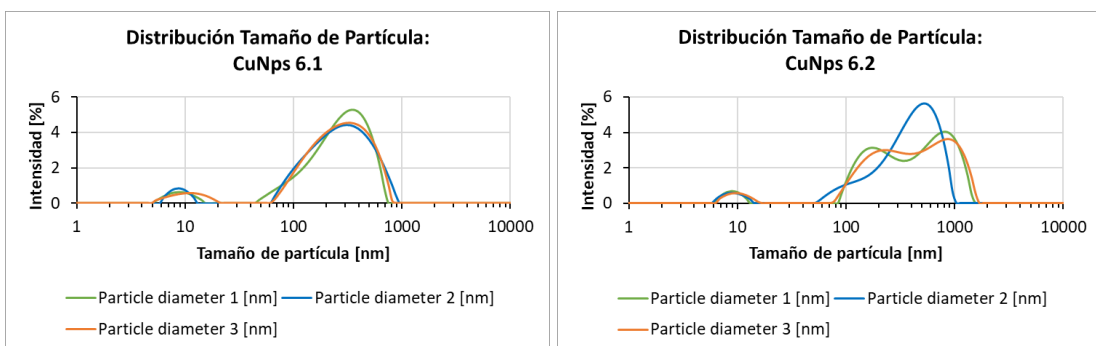
## Prueba 4:



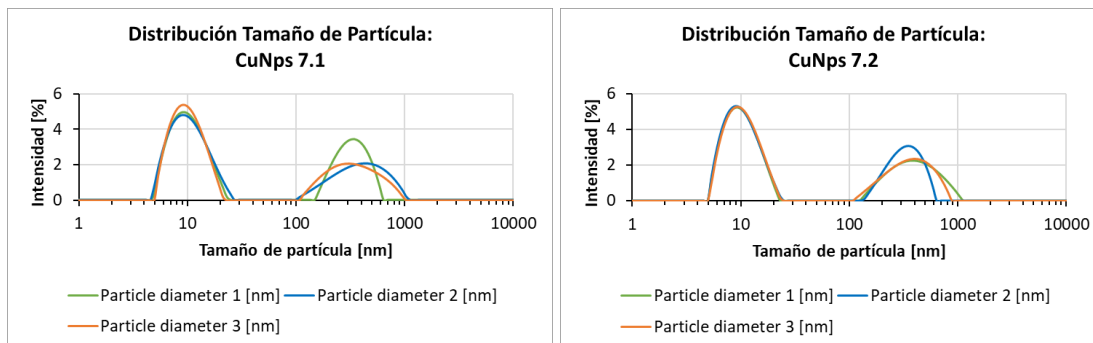
## Prueba 5:



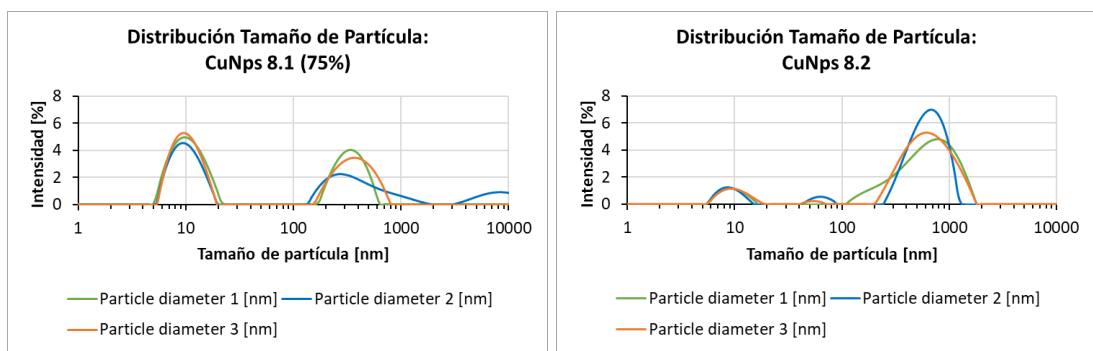
## Prueba 6:



## Prueba 7:

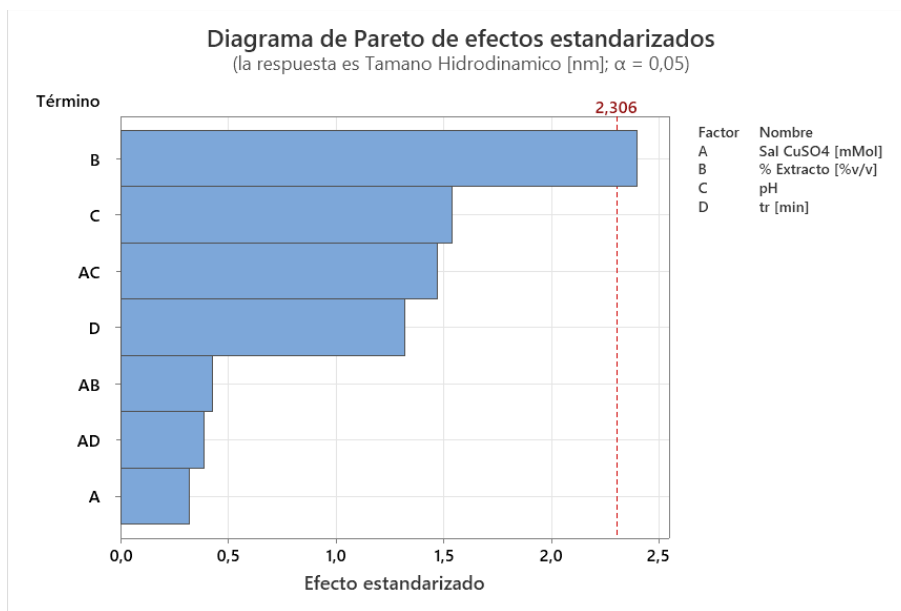
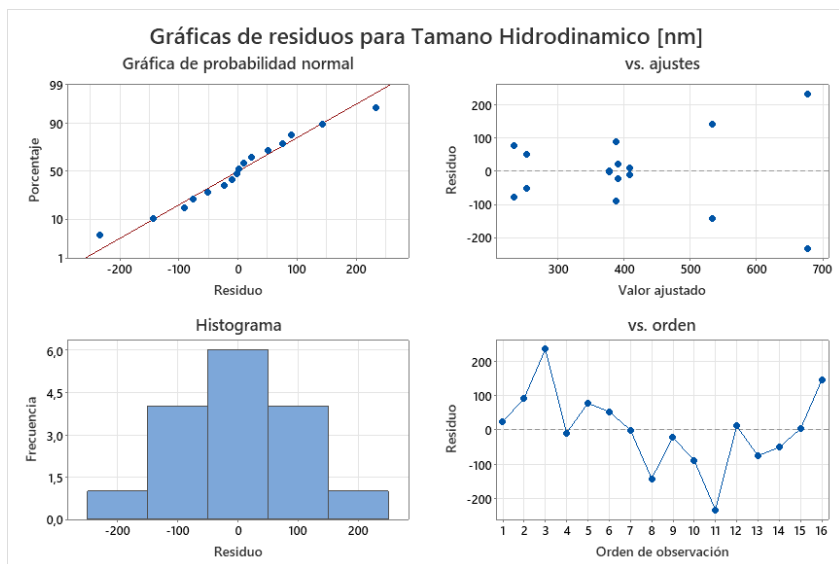


## Prueba 8:



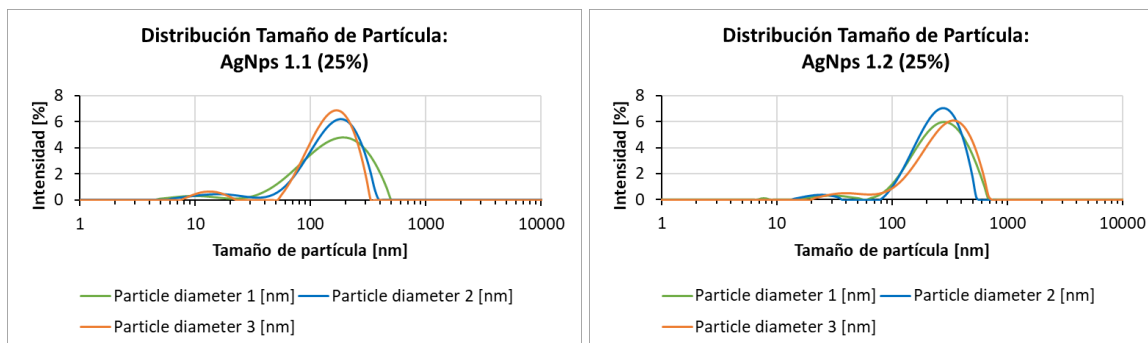
*Nota: Todos los parámetros de los tratamientos cumplieron con los requisitos mínimos establecidos y sus mediciones son aprobadas. Aunque las muestras fueron diluidas para verificar la independencia de la concentración respecto al tamaño de partícula, al disminuir este parámetro no fue posible para el equipo el realizar una medición válida, por lo que se decidió mantener la concentración máxima (100%) de estas soluciones coloidales para realizar esta caracterización. \*El equipo realiza tres (3) de cada una de estas mediciones para (1) una misma muestra.*

Apéndice T. Análisis de Diseño Factorial Fraccionado del Tamaño de partícula hidrodinámico para la Síntesis de CuNps

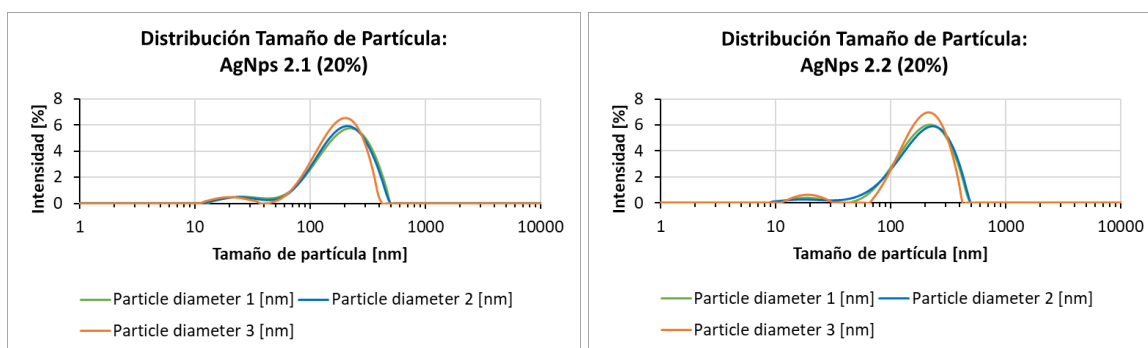


Apéndice U. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de AgNps.

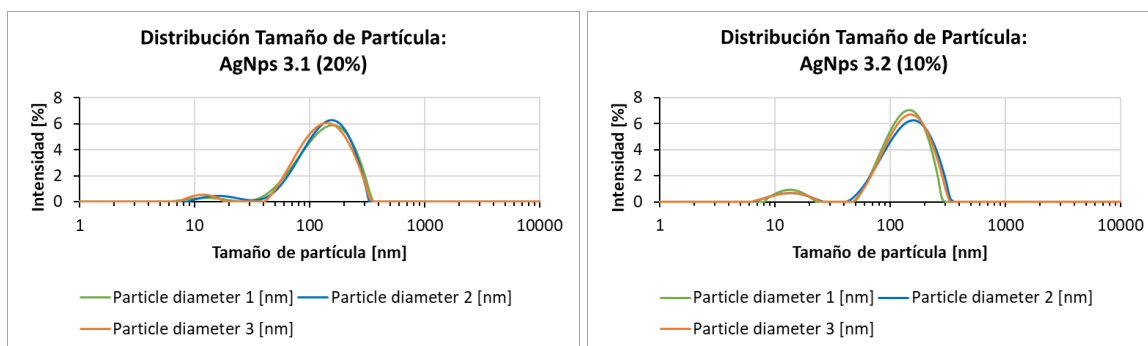
Prueba 1:



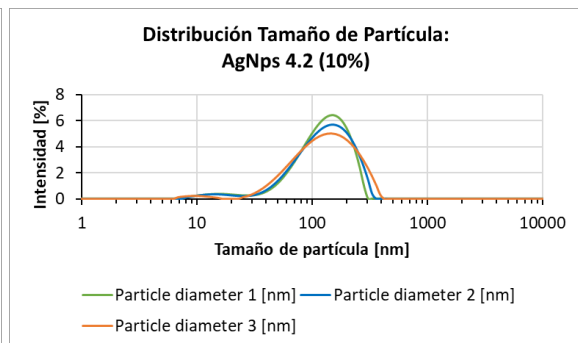
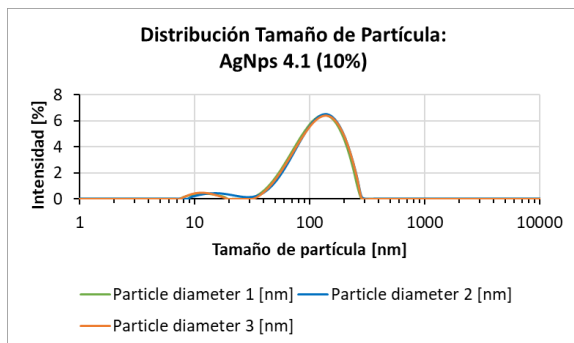
Prueba 2:



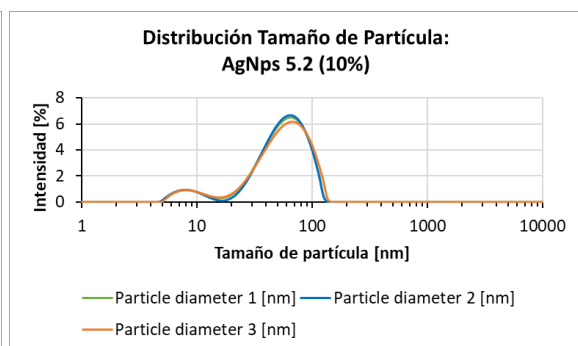
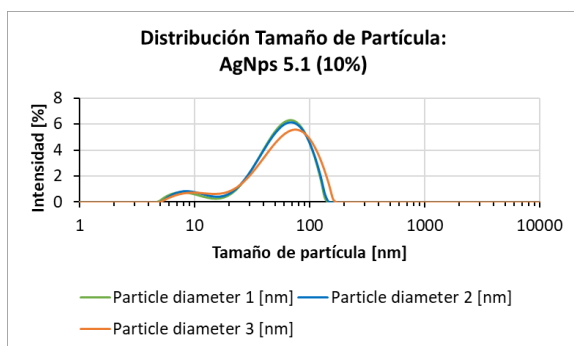
Prueba 3:



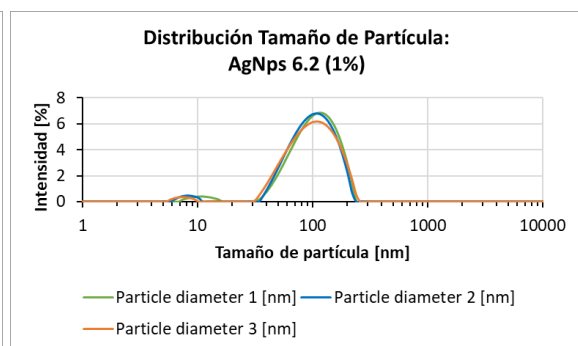
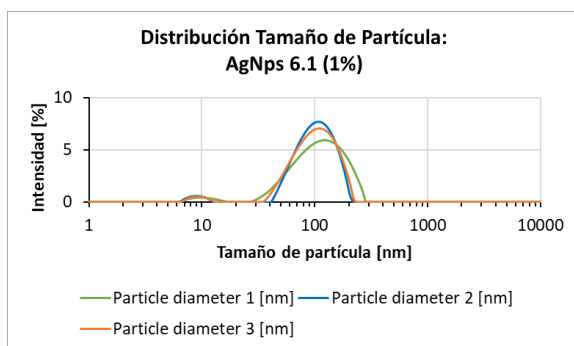
## Prueba 4:



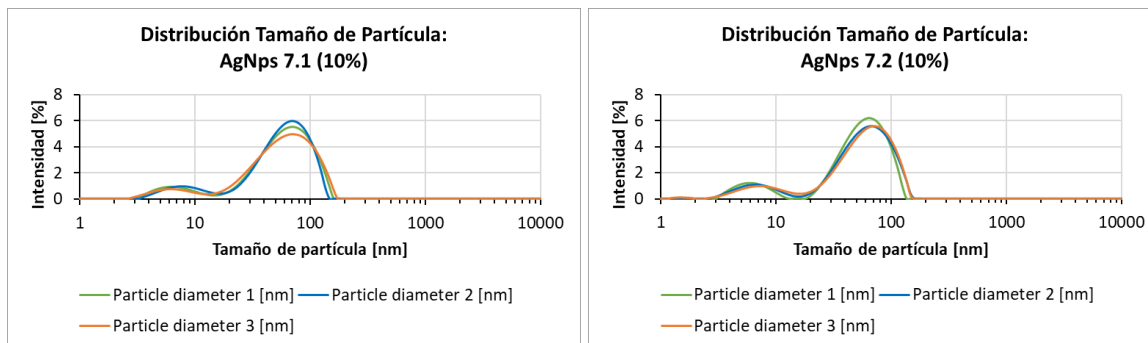
## Prueba 5:



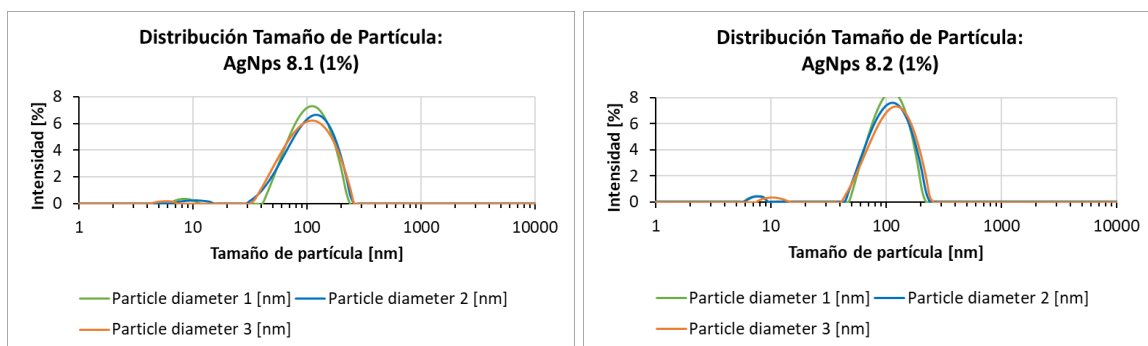
## Prueba 6:



## Prueba 7:

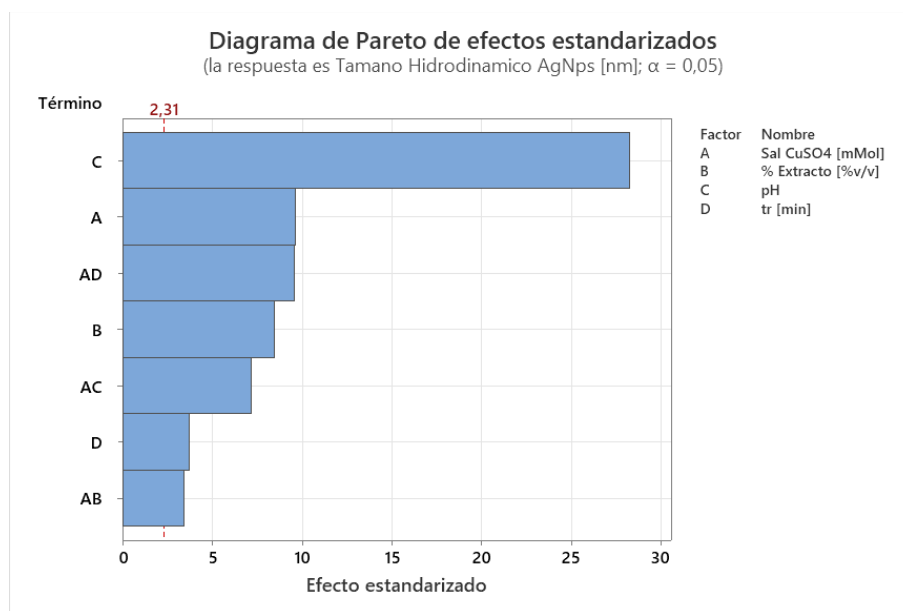
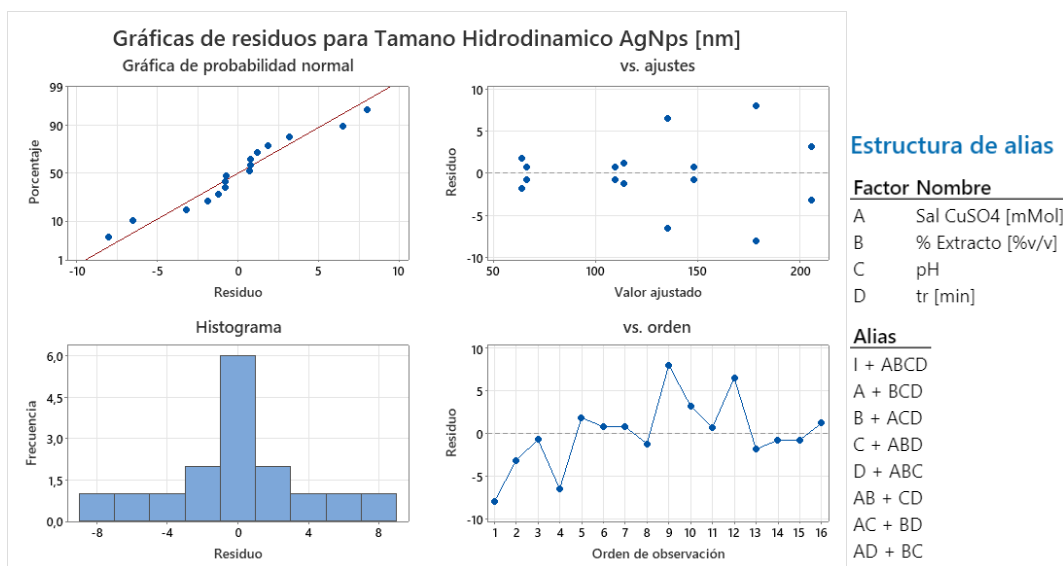


## Prueba 8:

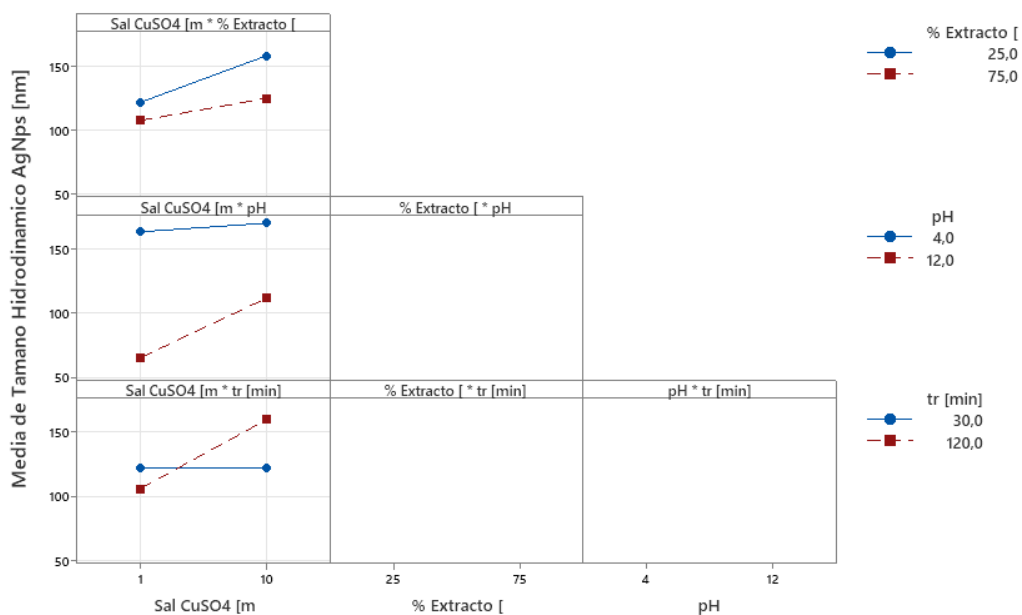


*Nota: Todos los parámetros de los tratamientos cumplieron con los requisitos mínimos establecidos y sus mediciones son aprobadas. La concentración indicada el título de cada imagen representa el valor de este parámetro en el cual se demuestra la independencia de la concentración respecto al tamaño de partícula. El equipo realiza tres (3) de cada una de estas mediciones para (1) una misma muestra.*

## Apéndice V. Análisis del Diseño Factorial Fraccionado del Tamaño de partícula hidrodinámico para la Síntesis de AgNps



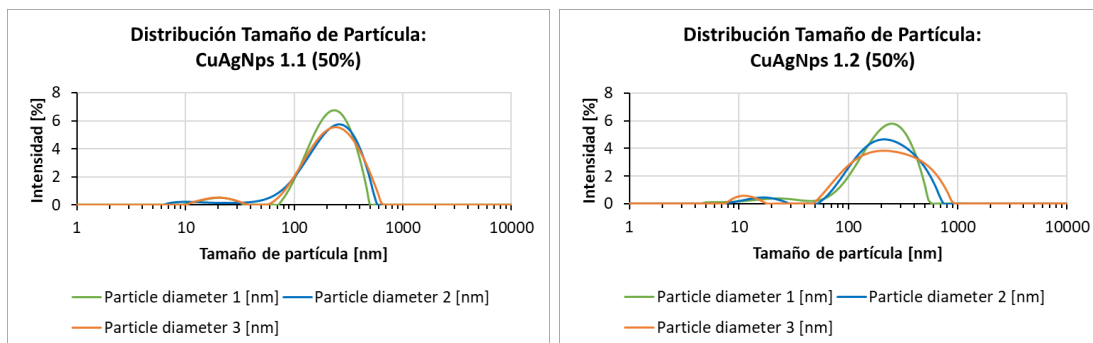
Gráfica de interacción para Tamano Hidrodinamico AgNps [nm]  
Medias ajustadas



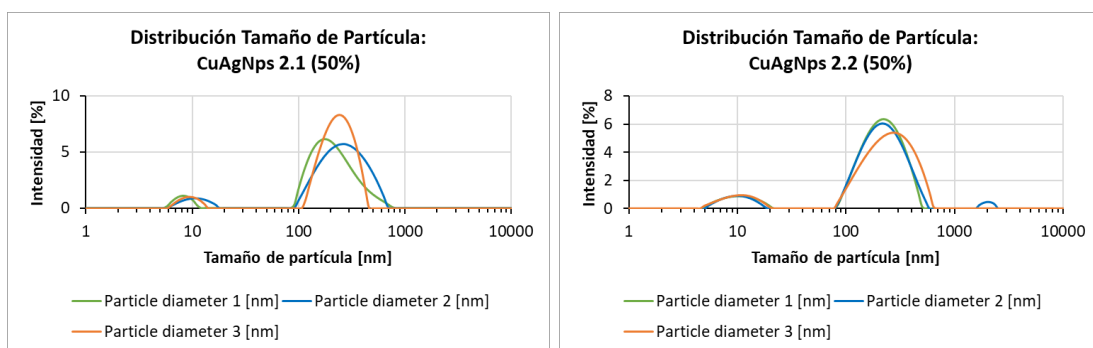
*Nota: Los recuadros vacíos en la gráfica de interacción representan las interacciones que formaron estructuras de alias y no pueden ser identificadas en el diseño factorial fraccionado.*

Apéndice W. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS de los tratamientos para la síntesis de nanopartículas metálicas de CuAgNps.

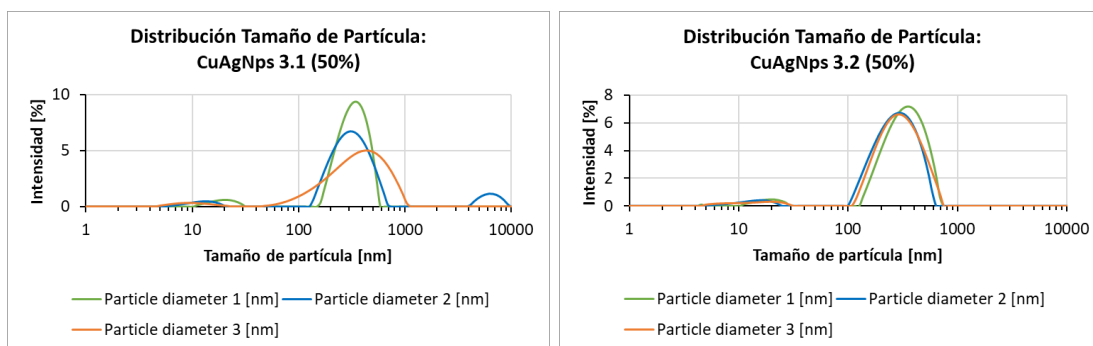
Prueba 1:



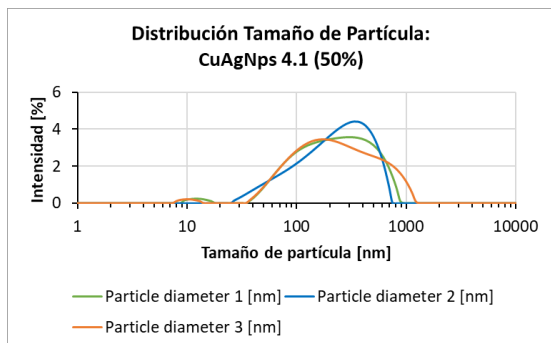
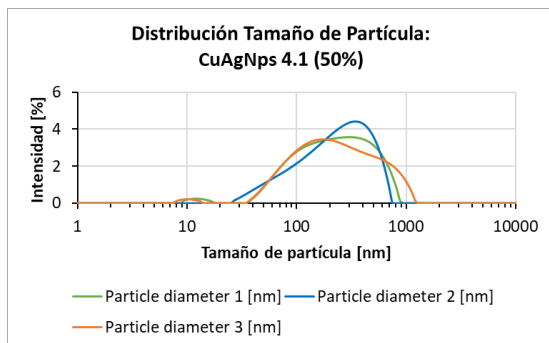
Prueba 2:



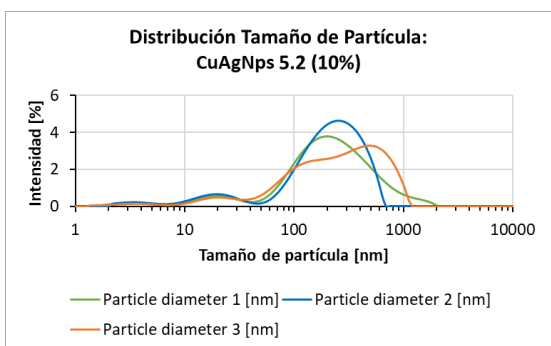
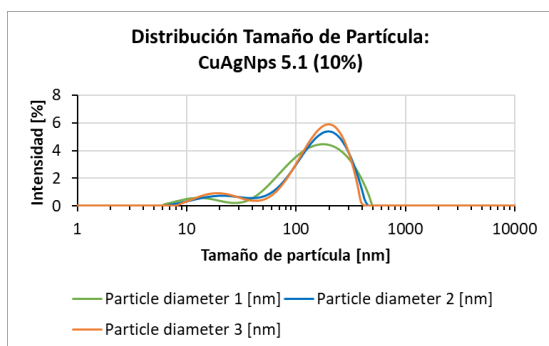
Prueba 3:



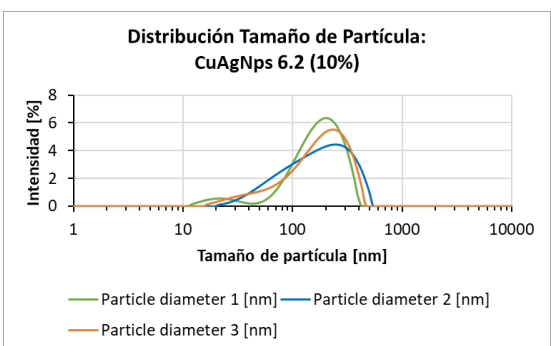
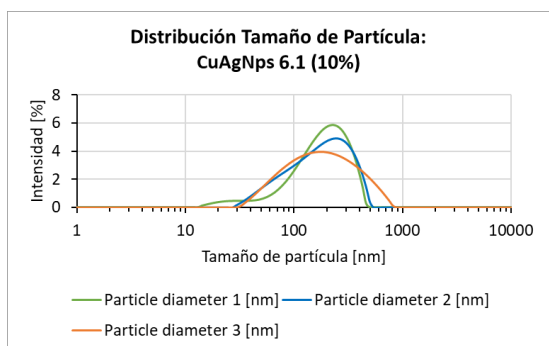
## Prueba 4:



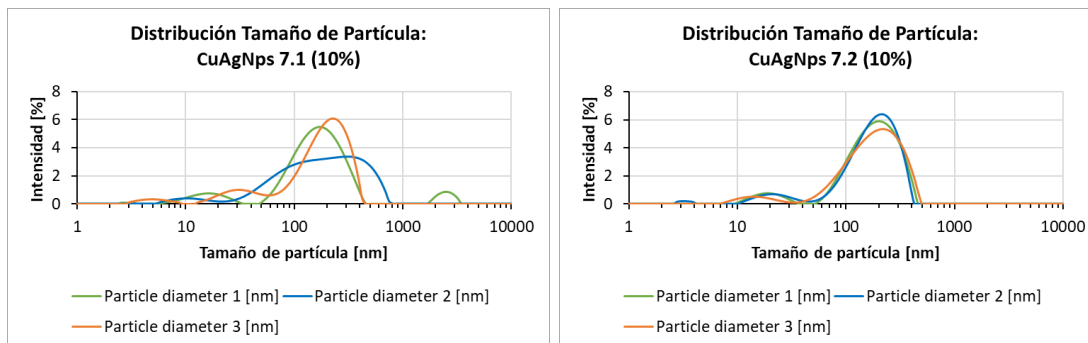
## Prueba 5:



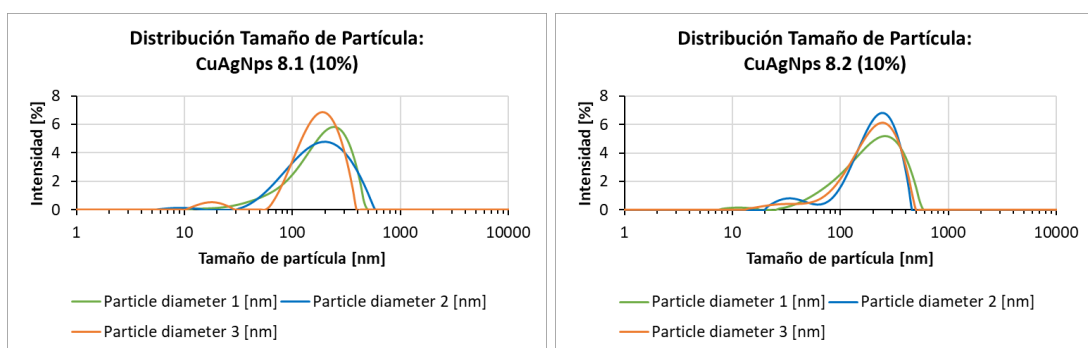
## Prueba 6:



## Prueba 7:

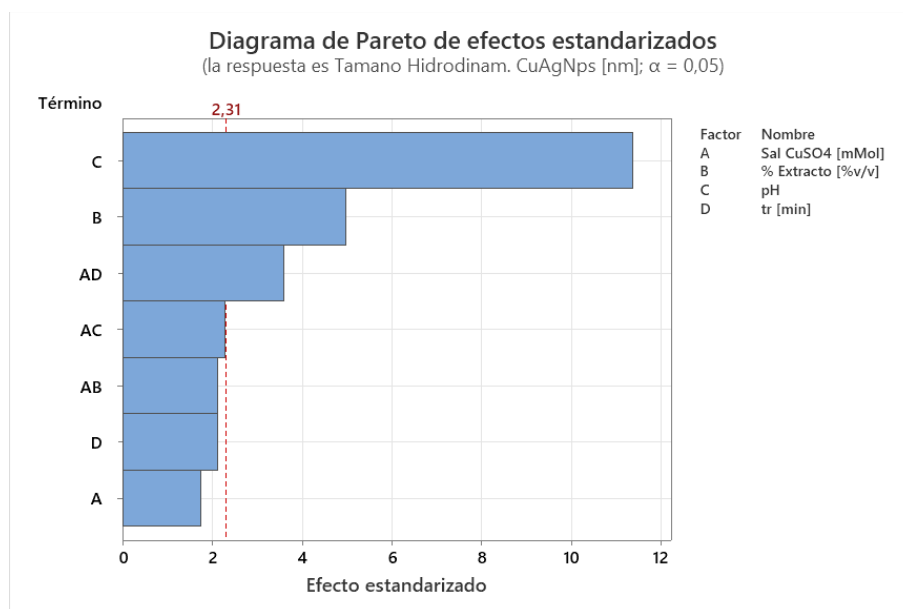
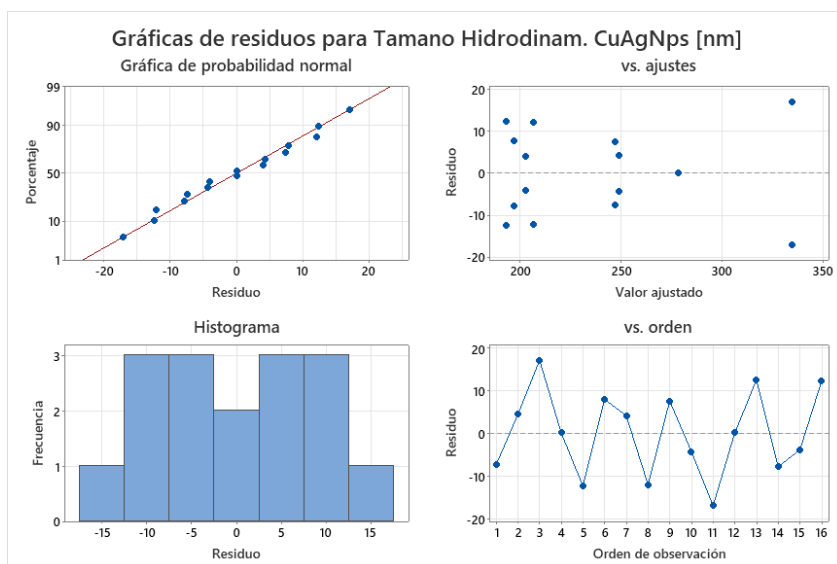


## Prueba 8:

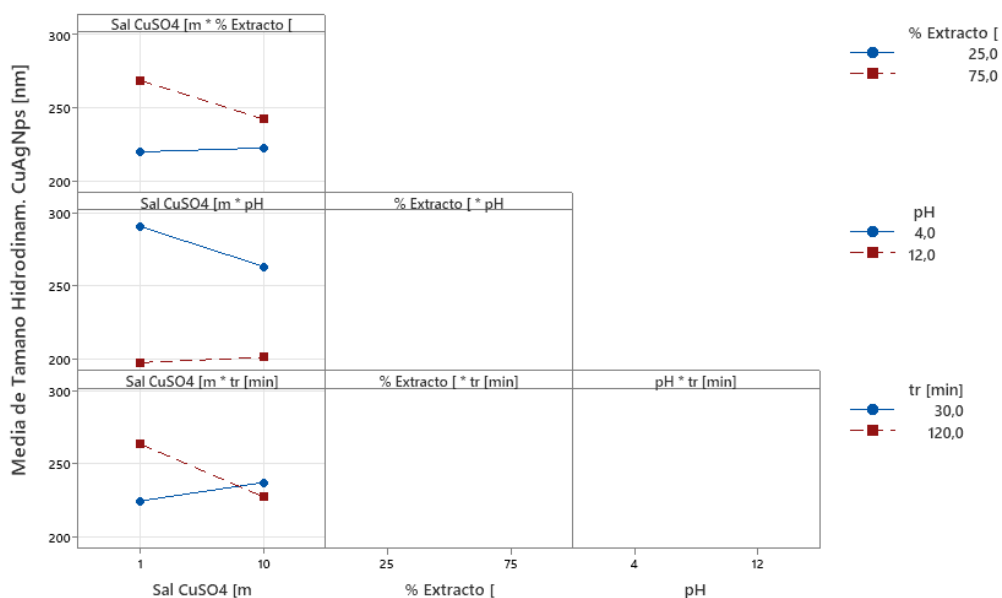


*Nota: Todos los parámetros de los tratamientos cumplieron con los requisitos mínimos establecidos y sus mediciones son aprobadas. La concentración indicada el título de cada imagen representa el valor de este parámetro en el cual se demuestra la independencia de la concentración respecto al tamaño de partícula. El equipo realiza tres (3) de cada una de estas mediciones para (1) una misma muestra.*

## Apéndice X. Análisis del Diseño Factorial Fraccionado del Tamaño de partícula hidrodinámico para la Síntesis de CuAgNps



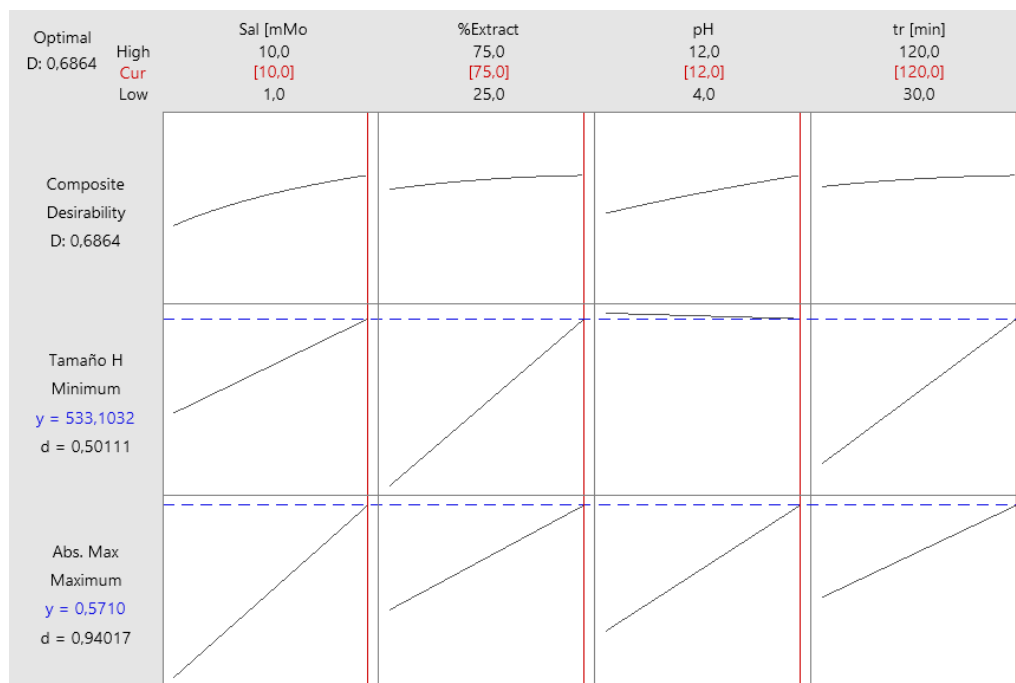
Gráfica de interacción para Tamaño Hidrodinám. CuAgNps [nm]  
Medias ajustadas



*Nota: Los recuadros vacíos en la gráfica de interacción representan las interacciones que formaron estructuras de alias y no pueden ser identificadas en el diseño factorial fraccionado.*

Apéndice Y. Gráfica de optimización de variables y modelos matemáticos para la maximización de la presencia de nanopartículas y minimización de tamaño de partícula de las soluciones coloidales.

### CuNps



Ecuación de regresión de Absorbancia:

$$\begin{aligned} \text{Abs. Max CuNps (500-600 nm)} = & -0,0032 - 0,05147 \text{ Sal [mMol]} + 0,000759 \text{ \%Extracto} + 0,01226 \text{ pH} \\ & - 0,000629 \text{ tr [min]} + 0,000411 \text{ Sal [mMol]*\%Extracto} \\ & + 0,002427 \text{ Sal [mMol]*pH} + 0,000301 \text{ Sal [mMol]*tr [min]} \end{aligned}$$

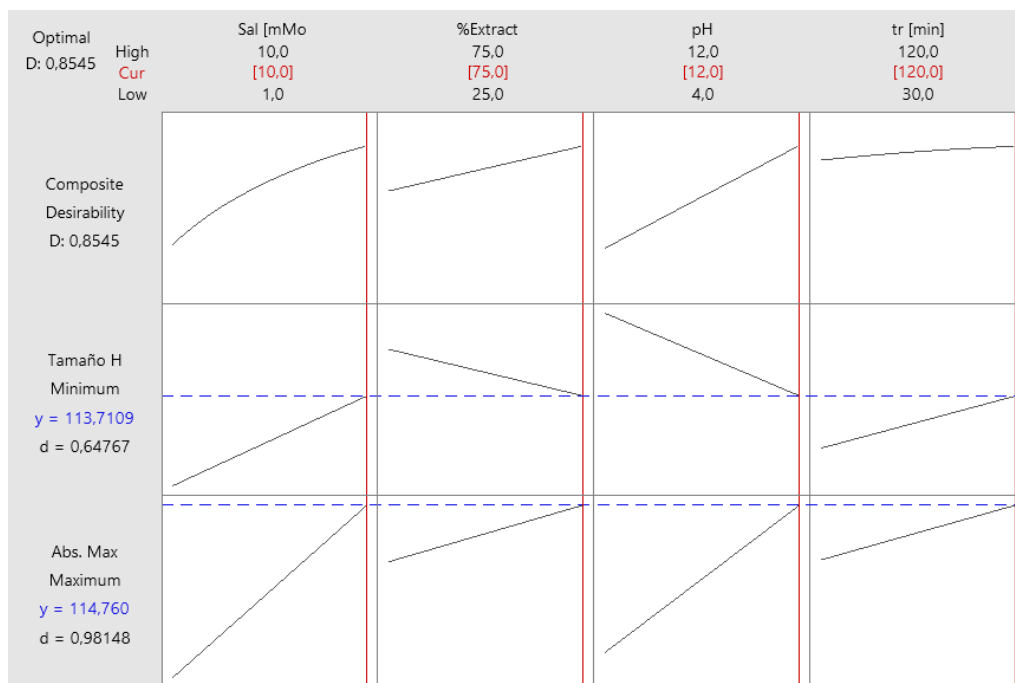
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0376456	97,58%	95,46%	90,31%

Ecuación de regresión de Tamaño de partícula:

$$\begin{aligned} \text{Tamaño Hidrodinámico CuNps [nm]} = & 401 - 25,8 \text{ Sal [mMol]} + 4,44 \text{ \%Extracto} - 31,7 \text{ pH} \\ & + 0,71 \text{ tr [min]} - 0,144 \text{ Sal [mMol]*\%Extracto} \\ & + 3,11 \text{ Sal [mMol]*pH} + 0,073 \text{ Sal [mMol]*tr [min]} \end{aligned}$$

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
151,975	60,94%	26,77%	0,00%

## AgNps



Ecuación de regresión de Absorbancia:

$$\begin{aligned} \text{Abs. Max AgNps (400-450 nm)} = & 1,14 - 9,908 \text{ Sal [mMol]} - 0,0073 \text{ \%Extracto} + 0,874 \text{ pH} \\ & - 0,0332 \text{ tr [min]} + 0,06430 \text{ Sal [mMol]*\%Extracto} \\ & + 0,9466 \text{ Sal [mMol]*pH} + 0,03744 \text{ Sal [mMol]*tr [min]} \end{aligned}$$

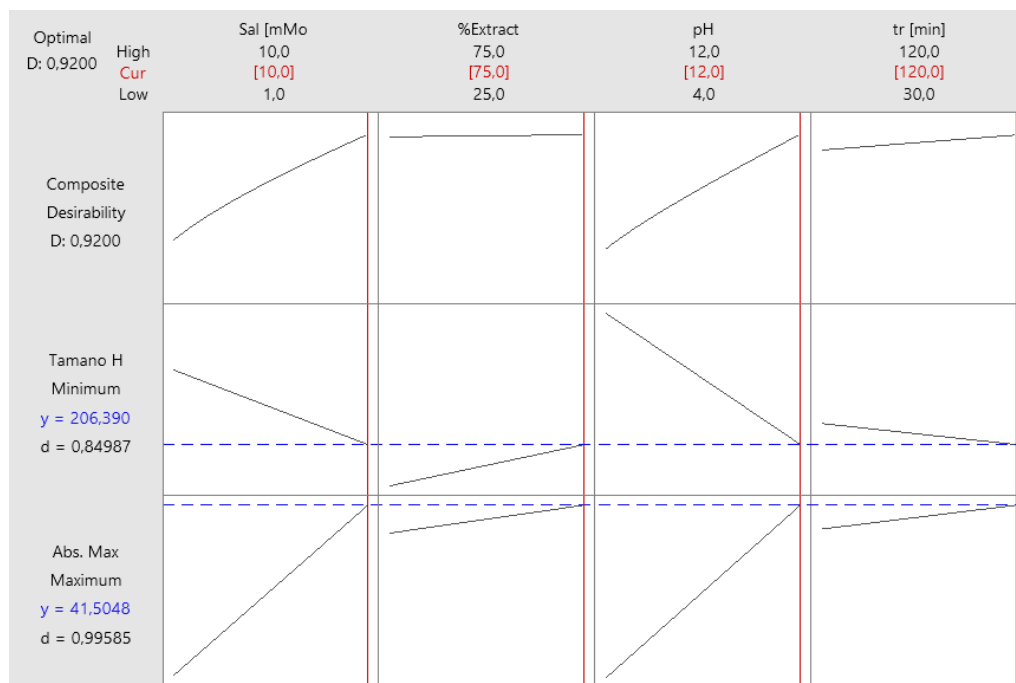
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,81978	99,88%	99,78%	99,53%

Ecuación de regresión de Tamaño de partícula:

$$\begin{aligned} \text{Tamaño Hidrodinámico AgNps [nm]} = & 244,72 - 4,29 \text{ Sal [mMol]} - 0,2394 \text{ \%Extracto} - 12,861 \text{ pH} \\ & - 0,2472 \text{ tr [min]} - 0,0422 \text{ Sal [mMol]*\%Extracto} \\ & + 0,5531 \text{ Sal [mMol]*pH} + 0,06588 \text{ Sal [mMol]*tr [min]} \end{aligned}$$

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
5,55925	99,30%	98,68%	97,19%

## CuAgNps



## Ecuación de regresión de Absorbancia:

$$\begin{aligned} \text{Abs. Max CuAgNps (400-600 nm)} = & 0,51 - 2,755 \text{ Sal [mMol]} - 0,0168 \text{ \%Extracto} + 0,354 \text{ pH} \\ & - 0,0084 \text{ tr [min]} + 0,01322 \text{ Sal [mMol]*\%Extracto} \\ & + 0,4090 \text{ Sal [mMol]*pH} + 0,00630 \text{ Sal [mMol]*tr [min]} \end{aligned}$$

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,32241	99,61%	99,27%	98,45%

## Ecuación de regresión de Tamaño de partícula:

$$\begin{aligned} \text{Tamano Hidrodinam. CuAgNps [nm]} = & 253,6 + 2,98 \text{ Sal [mMol]} + 1,034 \text{ \%Extracto} - 12,06 \text{ pH} \\ & + 0,493 \text{ tr [min]} - 0,0645 \text{ Sal [mMol]*\%Extracto} \\ & + 0,432 \text{ Sal [mMol]*pH} - 0,0604 \text{ Sal [mMol]*tr [min]} \end{aligned}$$

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
13,6238	95,84%	92,21%	83,38%

Apéndice Z. Ecuación para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano.

$$\% \text{ Inhibición} = \left( 1 - \left( \frac{(a - b)}{(c - d)} \right) \right) * 100$$

Donde “*a*” corresponde a la absorbancia del pozo que contiene al microorganismo evaluado con la concentración determinada para el tratamiento en la hora final, “*b*” corresponde a la absorbancia del pozo que contiene al microorganismo evaluado con la concentración determinada para el tratamiento en la hora inicial, “*c*” corresponde a la absorbancia del control de crecimiento microbiano en la hora final y “*d*” corresponde a la absorbancia del control de crecimiento microbiano en la hora inicial.

Por otro lado, se considera al  $\% \text{ Viabilidad} = (100\% - \% \text{ Inhibición})$