

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**TESIS**

**“BIOSINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUEÑUA Y  
SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR – CUSCO”**

**PRESENTADO POR:**

- Br. Gutierrez Sierra Natally
- Br. Mesco Aquisé Nestor Jair

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**ASESORA**

Dra. Ing. Amanda Rosa Maldonado Farfán

**CO ASESORA**

MSc. Sonia Aragón Mamani

Financiado por: Programa “Yachayninchis Wiñarinanpaq”- UNSAAC

**CUSCO – PERU**

**2023**

# INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: BIO-SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUEÑUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PIAR-CUSCO presentado por: NATALY GUTIERREZ SIERRA con DNI Nro.: 72958420 presentado por: NESTOR JAIR MESCO AQUISE con DNI Nro.: 73867261 para optar el título profesional/grado académico de INGENIERO QUÍMICO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 01 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 8 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 29 de Agosto de 2023

[Firma manuscrita]

Firma

Post firma Amanda Rosa MALDONADO FARFAN

Nro. de DNI 23822559

ORCID del Asesor <https://orcid.org/0000-0002-4870-7078>

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: <https://unsaac.Turnitin.com/viewer/submissions/oid:2725912584088833/locale=es-ry>

NOMBRE DEL TRABAJO

**TESIS FINAL 05-05-2023.pdf**

AUTOR

**NESTOR JAIR MESCO AQUISE / NATALL  
Y GUTIERREZ SIERRA**

RECUENTO DE PALABRAS

**25432 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**129399 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**123 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**5.1MB**

FECHA DE ENTREGA

**Aug 28, 2023 5:55 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Aug 28, 2023 5:57 PM GMT-5****● 8% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)

## Dedicatoria

A Dios que día a día me enseña a vivir inmersa a las bienaventuranzas.

A mis amados padres José y Enma, quienes son mi pilar, mi motivación y mi mayor orgullo. Su amor incondicional y su apoyo inquebrantable han sido el motor que me ha impulsado a superar cada obstáculo en mi camino. A mi hermano Bryam por ser mi cómplice, gracias por creer en mi e inspirarme a ser la mejor versión de mi misma.

A Nestor, por este recorrido compartido, desafíos vencidos que están llenos de aprendizaje y crecimiento mutuo; ayudándonos a ampliar nuestros horizontes de vida, por más éxitos.

A la memoria de mis Abuelos, cuyos legados perduran en mi vida.

Natally Gutierrez Sierra

A mis padres Raul y Haydee quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido cumplir un objetivo más que significan alegría y orgullo para mí y también para ellos.

A mi abuelo Tiburcio por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades.

A Natally, siendo la mayor motivación en nuestras vidas encaminadas al éxito, siendo la más grande motivación perfecta para poder lograr alcanzar esta dichosa y muy merecida victoria en la vida, el poder haber culminado nuestra tesis con éxito.

A toda mi familia porque gracias a sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona.

Nestor Jair Mescos Aquis

## **Presentación**

Sr. Decano y apreciados docentes del Departamento Académico de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de Procesos de la Universidad Nacional de San Antonio del Cusco.

De conformidad con las disposiciones del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ingeniería de Procesos vigente, presentamos a vuestra consideración la tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Químico, titulada:

**“BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUEÑUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR – CUSCO”**

La presente tesis está orientada a determinar en qué medida las nanopartículas de plata (Ag NPs) obtenidas mediante biosíntesis con extracto de Queñua, ejercen actividad antibacteriana en el afluyente de la PTAR - Cusco.

Esperamos que la información presentada sea de apoyo a posteriores investigaciones; cuyos resultados estamos seguros, constituirán nuevas alternativas para el tratamiento de aguas residuales.

## **Agradecimientos**

A Dios, por mostrarnos la senda de la vida, guiarnos, alimentarnos de conocimientos, dándonos paciencia y motivación para concluir esta maravillosa etapa profesional.

A nuestras familias, por su amor, apoyo incondicional e inspirarnos y alentarnos para realizar esta tesis.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco – Vicerrectorado de Investigación por financiar la presente tesis, revalorando la investigación y alentándonos a que los instrumentos aprendidos en nuestra etapa de pregrado sean orientados al estudio de la realidad y podamos contribuir al desarrollo de nuestro País.

A nuestra asesora, Dra. Ing. Amanda Rosa Maldonado Farfán por apoyarnos en el desarrollo del trabajo de investigación y permitimos trabajar parte de la investigación en el laboratorio de tecnología de nuestra Escuela Profesional de Ingeniería Química.

A nuestra co asesora, Mgtr. Sonia Aragón Mamani, por ser nuestra guía, compartir sus conocimientos y darnos las facilidades de desarrollar la investigación en el Laboratorio de Físico Química de la Escuela Profesional de Química de nuestra alma mater.

A la Dra. Blga. Hedy Y. Espinoza Carrasco por su amabilidad, paciencia y apoyo para poder desarrollar la parte experimental microbiológica en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología.

A la empresa NEOTEC CIENTIFICA S.A. y a su gerente general Ing. Rolando Caffarena por su gran amabilidad, pre disposición y apoyo para cumplir uno de nuestros objetivos planteados.

A la empresa prestadora de servicios de saneamiento público de accionario municipal SEDA CUSCO S.A. por el convenio de “Cooperación específico para la ejecución de la tesis”.

## Índice General

Dedicatoria .....	ii
Presentación .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Índice General .....	v
Índice de Acrónimos .....	ix
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tablas .....	xii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
<b>CAPÍTULO I: GENERALIDADES .....</b>	<b>1</b>
1.1.    Introducción .....	2
1.2.    Planteamiento del Problema .....	4
1.2.1.    Definición del Problema.....	4
1.2.2.    Formulación del Problema.....	5
1.3.    Justificación .....	5
1.4.    Objetivos de la investigación.....	6
1.4.1.    Objetivo general .....	6
1.4.2.    Objetivos específicos.....	6

CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	7
2.1. Antecedentes .....	8
2.2. Bases teóricas.....	13
2.2.1. Nanociencia y Nanotecnología.....	13
2.2.2. Nanomateriales .....	13
2.2.3. Nanopartículas .....	14
2.2.4. Nanopartículas de plata .....	16
2.2.5. Síntesis de nanopartículas.....	16
2.2.6. Síntesis Biológica .....	18
2.2.7. Resonancia de plasmones de superficie .....	22
2.2.8. Métodos de caracterización de nanopartículas metálicas .....	23
2.2.9. Factores que afectan la síntesis de AgNPs .....	30
2.2.10. Queñua.....	32
2.2.11. Extracto vegetal .....	32
2.2.12. Tamizaje fitoquímico.....	33
2.2.13. Compuestos fenólicos.....	33
2.2.14. Bacterias .....	35
2.2.15. Métodos de análisis para la determinación de bacterias indicadoras en el agua .....	36

2.2.16. Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales.....	38
2.2.17. Modo de acción de las nanopartículas de plata contra las bacterias.....	39
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1. Lugar de la Investigación.....	43
3.2. Muestra .....	43
3.3. Materiales.....	43
3.4. Métodos .....	45
3.4.1. Recolección de muestra .....	47
3.4.2. Preparación de los extractos de Queñua. ....	48
3.4.3. Tamizaje fitoquímico.....	49
3.4.4. Determinación de los compuestos fenólicos totales del extracto .....	50
3.4.5. Preparación del agente precursor.....	51
3.4.6. Biosíntesis de las nanopartículas de plata .....	51
3.4.7. Diseño experimental.....	56
3.4.8. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	59
3.4.9. Aplicación antibacteriana en el afluente de la PTAR.....	59
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	66
4.1. Tamizaje fitoquímico.....	67
4.2. Determinación de compuestos fenólicos totales del extracto de Queñua .....	70

4.3. Biosíntesis de las nanopartículas de plata.....	72
4.4. Caracterización de las nanopartículas de plata .....	107
4.5. Aplicación antibacteriana.....	114
CONCLUSIONES.....	116
RECOMENDACIONES .....	118
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	119
APÉNDICES.....	136
Apéndice N°1, Recolección de muestra de Queñua.....	136
Apéndice N°2, Procedimiento de preparación de extractos.....	137
Apéndice N°3, Imágenes de la determinación de compuestos fenólicos totales .....	138
Apéndice N°4, Imágenes de las preparaciones de muestra de nanopartículas de plata con UV-Visible, DLS y SEM .....	139
Apéndice N°5, Reporte de Dispersión de luz Dinámica (DLS).....	141
Apéndice N°6, Preparación de caldos para los análisis de coliformes totales y termo tolerantes.....	150
ANEXOS .....	151
Anexo A, Certificado de determinación taxonómica de Queñua .....	151
Anexo B, Certificado de determinación de compuestos fenólicos totales.....	152
Anexo C, Reporte de la microscopia electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopia de Dispersión de energía (EDS) para la AgNPs con extracto acuoso .....	153

Anexo D, Convenio de cooperación específico para ejecución de tesis con la empresa prestadora de servicios de saneamiento pública de accionario municipal SEDA CUSCO S.A. ....	159
Anexo E, Índice NMP y límites de confianza del 95 % para varias combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan cinco tubos por dilución. ....	163
Anexo F, Límites Máximos Permisibles para los efluentes de PTAR.....	164
Anexo G, Certificado de análisis bacteriológico .....	165

### Índice de Acrónimos

NP: Nanopartícula

NPs: Nanopartículas

AgNPs: Nanopartículas de plata

SEM: Scanning Electron Microscope (Microscopio Electrónico de Barrido)

DLS: Dynamic Light Scattering (Dispersión de Luz Dinámica)

EDX: Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía

PdI: Índice de polidispersidad

SPR: Superficie de plasmón superficial

AG: Ácido gálico

Eq AG: Equivalentes de ácido gálico

## Índice de Figuras

Figura 2.1 Esquema representativo de nanomateriales manufacturados .....	14
Figura 2.2 Pasos para la síntesis verde de nanopartículas de plata.....	21
Figura 2.3 Resonancia de plasmón superficial de una nanopartícula.....	22
Figura 2.4 Métodos de caracterización de nano partículas dividido en dos grupos físicos y químicos .....	23
Figura 2.5 Radio hidrodinámico de las nanopartículas de plata.....	26
Figura 2.6 Formas de nanopartículas de plata sintetizadas .....	28
Figura 2.7 Representación de las cargas en la superficie de una nanopartícula de plata ....	29
Figura 2.8 Principales parámetros físicos y químicos que afectan a la síntesis de nanopartículas de plata .....	31
Figura 2.9 Mecanismo de acción antibacteriana de las nanopartículas de plata .....	40
Figura 3.1 Etapas de la investigación .....	46
Figura 3.2 Recolección de muestra del afluente de la PTAR y proceso de filtración .....	60
Figura 3.3 Aplicación de AgNPs en las muestras de agua filtrada.....	61
Figura 3.4 Procedimiento para la determinación de coliformes totales para la muestra filtrada.....	62
Figura 3.5 Procedimiento para la determinación de coliformes totales para la muestra filtrada con dosificación de AgNPs .....	63
Figura 3.6 Procedimiento para la determinación de coliformes termotolerantes .....	64
Figura 4.1 Reacciones del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de Queñua .....	67

Figura 4.2 Reacciones del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroetanólicos a 50% y 70%.....	67
Figura 4.3 Mezcla de reacción.....	75
Figura 4.4 Cambio de coloración de las soluciones de reacción.....	76
Figura 4.5 Los 18 ensayos después de las 24 horas de agitación.....	79
Figura 4.6 Lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto acuoso en diferentes fechas.....	81
Figura 4.7 Lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto hidroetanólico de 50% en diferentes fechas.....	93
Figura 4.8 Lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto hidroetanólico de 70% en diferentes fechas.....	94
Figura 4.9 Sedimentos de las AgNPs con extractos hidroetanólicos al 70%.....	100
Figura 4.10 Diagrama de Pareto efecto estandarizado para las AgNPs.....	103
Figura 4.12 Superficie de respuesta estimada.....	106
Figura 4.13 Microfotografías de las nanopartículas.....	108
Figura 4.14 Composición elemental de la muestra.....	110

## Índice de Tablas

Tabla 2.1 Tipos de nanopartículas.....	15
Tabla 2.2 Compuestos fenólicos según su estructura Química .....	34
Tabla 2.3 LMP de Efluente para vertido de aguas residuales .....	38
Tabla 3.1 Ubicación geográfica del punto de muestra de Queñua .....	47
Tabla 3.2 Tamizaje fitoquímico .....	49
Tabla 3.3 Operalización de variables de la biosíntesis de nanopartículas de plata .....	53
Tabla 3.4 Variables independientes y niveles .....	54
Tabla 3.5 Plan experimental.....	55
Tabla 3.6 Variables independientes y niveles finales.....	57
Tabla 3.7 Plan experimental final.....	58
Tabla 3.8 Plan experimental de la actividad antibacteriana para 500 Ml de agua filtrada de la PTAR.....	65
Tabla 4.1 Resultados cualitativos del tamizaje fitoquímico .....	68
Tabla 4.2 Determinación de compuestos fenólicos .....	70
Tabla 4.3 Resultados de la biosíntesis de nanopartículas de plata .....	73
Tabla 4.4 pH inicial de los 3 tipos de extractos.....	74
Tabla 4.5 pH de los 3 extractos mezclados con AgNO <sub>3</sub> .....	74
Tabla 4.6 Lectura del espectrofotómetro UV-visible /AgNPs con extracto acuoso.....	80
Tabla 4.7 Tamaño hidrodinámico promedio(Z) de las AgNPs con extracto acuoso.....	85

Tabla 4.8 Distribución de tamaños de AgNPs por intensidad del extracto acuso .....	87
Tabla 4.9 Lectura del espectrofotómetro UV-visible /AgNPs con extracto hidroetanólico a 50%.....	90
Tabla 4.10 Lectura del espectrofotómetro UV-visible /AgNPs con extracto hidroetanólico a 70%.....	90
Tabla 4.11 Tamaño hidrodinámico promedio(Z) de las AgNPs con extracto hidroetanólico 50%.....	96
Tabla 4.12 Tamaño hidrodinámico promedio(Z) de las AgNPs con extracto hidroetanólico70%.....	97
Tabla 4.13 Distribución de tamaños de AgNPs por intensidad del extracto hidroetanólico50%.....	98
Tabla 4.14 Distribución de tamaños de AgNPs por intensidad del extracto hidroetanólico70%.....	99
Tabla 4.15 Resultados finales de la síntesis de AgNP.....	101
Tabla 4.16 Efectos estimados .....	102
Tabla 4.17 Análisis de varianza para AgNPs .....	104
Tabla 4.18 Porcentaje de la composición elemental de las AgNP por Espectroscopia de rayos X (EDS) .....	111
Tabla 4.19 Ensayos de la aplicación antibacteriana para 500 mL de agua filtrada de la PTAR.....	114

## Resumen

El propósito de esta investigación fue analizar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs), en la reducción de bacterias del afluyente de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) ubicada en el distrito de San Jerónimo, departamento de Cusco.

Se prepararon extractos de Queñua en %p/p al 10% ,por maceración usando como solvente agua destilada y mezclas hidroetanólicas de etanol 96° en concentraciones de 50% y 70% en %v/v. Se determinaron los compuestos fenólicos totales en los extractos por el método de Folin Ciocalteu, revelando una mayor presencia en los extractos hidroetanólicos. Las AgNPs se obtuvieron mediante biosíntesis verde, proceso que consistió en someter una solución de AgNO<sub>3</sub> 0.1M con los diferentes extractos en una relación de 1:3, a una velocidad de agitación de 350 rpm durante 24 horas. Se estudió la influencia de la temperatura, pH de biosíntesis y cantidad de etanol en el extracto de Queñua en el tamaño de las AgNPs. La caracterización de AgNPs se realizó por espectrometría UV-visible, las cuales presentaron espectros de absorción en un rango de 400 nm – 420 nm. Además, se estudió su estabilidad durante 11 semanas; al cabo de este tiempo se midieron los tamaños hidrodinámicos de las AgNPs a través de la técnica de dispersión de luz dinámica. Los resultados indican que con extracto acuoso a una temperatura de 20 °C y pH de 10 son las mejores condiciones de replicación, obteniendo un tamaño hidrodinámico de 58.68 nm.

Finalmente se determinó el efecto antibacteriano con diferentes dosis de AgNPs en 500 mL de agua residual, que contenían coliformes totales y coliformes termotolerantes igual  $33 \times 10^6$  NMP/100 mL. Los resultados demostraron que todas las dosis de AgNPs eliminaron el 100% de las bacterias, con lo cual queda evidenciado el efecto antibacteriano de las AgNPs.

**Palabras clave:** *extracto de Queñua, biosíntesis, nanopartículas de plata, coliformes totales.*

### Abstract

The purpose of this research was to analyze the effect of silver nanoparticles (AgNPs) on the reduction of bacteria in the influent of a wastewater treatment plant (WWTP) located in the district of San Jerónimo, Cusco department.

Extracts of Queñua were prepared at 10% w/w by maceration using distilled water and hydroethanolic mixtures of 96% ethanol at concentrations of 50% and 70% v/v. Total phenolic compounds were determined in the extracts using the Folin-Ciocalteu method, revealing a higher presence in the hydroethanolic extracts. AgNPs were obtained through green biosynthesis, which involved subjecting a 0.1 M AgNO<sub>3</sub> solution to the different extracts in a 1:3 ratio, with agitation at 350 rpm for 24 hours. The influence of temperature, biosynthesis pH, and ethanol quantity in the Queñua extract on the size of the AgNPs was studied. Characterization of AgNPs was carried out by UV-visible spectrometry, showing absorption spectra in the range of 400 nm – 420 nm. Additionally, their stability was studied over 11 weeks, and the hydrodynamic sizes of the AgNPs were measured using dynamic light scattering. The results indicate that the best replication conditions were obtained with the aqueous extract at a temperature of 20 °C and pH of 10, resulting in a hydrodynamic size of 58.68 nm.

Finally, the antibacterial effect was determined using different doses of AgNPs in 500 mL of wastewater containing total coliforms and thermotolerant coliforms at 33 x 10<sup>6</sup> MPN/100 mL. The results demonstrated that all doses of AgNPs eliminated 100% of the bacteria, thus evidencing the antibacterial effect of the AgNPs.

**Keywords:** *Queñua extract, biosynthesis, silver nanoparticles, total coliforms.*

# **CAPÍTULO I: GENERALIDADES**

## 1.1. Introducción

Según Serena (2010), la nanotecnología se puede definir como la investigación científica y el desarrollo tecnológico que permiten entender, a nivel atómico y molecular, todos los fenómenos que ocurren en la nanoescala. El objetivo de esta disciplina es utilizar dicho conocimiento para crear estructuras, materiales, dispositivos y sistemas de complejidad creciente, los cuales presentan nuevas propiedades y realizan funciones innovadoras debido al reducido tamaño de sus componentes.

Las nanopartículas de plata (AgNPs), han despertado un gran interés debido a su excepcional protección contra una amplia gama de microorganismos, así mismo poseen propiedades únicas lo que resalta sus aplicaciones en varios campos, como la biomedicina, la administración de fármacos, el tratamiento del agua, la agricultura entre otros. Las AgNPs sintetizadas mediante técnicas fisicoquímicas como la reducción química, la radiación gamma, métodos electroquímicos, la ablación con láser, uso de autoclaves, la reducción por microondas y la fotoquímica son métodos efectivos, pero tienen limitaciones como el uso de químicos peligrosos, altos costos de operación y requerimientos de energía. (Sista et al., 2016)

Teniendo en cuenta las desventajas de los métodos fisicoquímicos para la obtención de nanopartículas; las alternativas con menor impacto ambiental emplean menores costos de producción, y uno de estos métodos es la síntesis biológica o biosíntesis de nanopartículas en medio acuoso (no tóxico).

La contaminación microbiológica en el agua es un problema ambiental de gran importancia debido a su impacto en la salud pública y en el medio ambiente. Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) son una solución para reducir la contaminación en los

afluentes, sin embargo, los microorganismos patógenos pueden sobrevivir y transmitirse en las aguas tratadas, lo que puede representar un riesgo para la salud humana y el medio ambiente.

Por lo tanto, el objetivo general de esta investigación fue determinar en qué medida las AgNPs obtenidas mediante biosíntesis con extracto de Queñua ejercen actividad antibacteriana en el afluente de la PTAR-Cusco.

En este contexto, la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se presenta como una alternativa prometedora para la eliminación de microorganismos en aguas residuales debido a su actividad antibacteriana. Además, la biosíntesis de AgNPs utilizando extractos vegetales representa una opción sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

La metodología incluyó la biosíntesis de AgNPs mediante la reducción química utilizando diversos tipos de extracto de Queñua, modificando el pH y temperatura de biosíntesis. La caracterización de las AgNPs obtenidas fue mediante técnicas de espectroscopia UV-visible, microscopía electrónica de barrido, dispersión de luz dinámica, difracción de rayos X, potencial Z, y la evaluación de su actividad antibacteriana mediante la existencia de coliformes totales y termotolerantes (*E. coli*) en el afluente de la PTAR de Cusco.

Los resultados obtenidos demostraron que las AgNPs biosintetizadas utilizando extracto de Queñua tienen una alta actividad antibacteriana y son eficaces en la eliminación de microorganismos patógenos en el afluente de la PTAR de Cusco.

## **1.2. Planteamiento del Problema**

### ***1.2.1. Definición del Problema***

La contaminación del agua es uno de los problemas ambientales más importantes que enfrenta la humanidad. En la actualidad, el tratamiento de aguas residuales es una necesidad imperante en todo el mundo, especialmente en áreas urbanas y periurbanas en países en desarrollo. En este contexto, la utilización de nanopartículas de plata, se presenta como una alternativa prometedora para la eliminación de bacterias y otros microorganismos en el agua residual.

En la ciudad del Cusco, el tratamiento de las aguas residuales se lleva a cabo mediante la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) – San Jerónimo, la cual utiliza procesos físicos, químicos y biológicos para eliminar contaminantes del agua residual. A pesar de los esfuerzos realizados para mejorar el tratamiento de aguas residuales en la PTAR, todavía existen desafíos en la eliminación de microorganismos patógenos, lo que representa un riesgo para la salud pública y el medio ambiente.

En Cusco, la contaminación ambiental ha aumentado significativamente por diferentes actividades industriales, agrícolas, urbanas y domésticas, aumentando así la concentración de bacterias en diferentes ecosistemas, como se puede evidenciar en la cuenca del río Huatanay y en sus diferentes vertientes, donde los estudios realizados muestran altos niveles de contaminación por patógenos bacteriológicos. La aplicación de nuevos procesos con nanotecnología es una solución potencial para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales para mejorar la calidad del efluente y para el reusó del agua en un futuro. Con el desarrollo de la nanotecnología, se podrían potenciar técnicas usadas actualmente en el tratamiento de aguas como la floculación, coagulación y desinfección.

En este contexto, la biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de Queñua como agente reductor y estabilizador, se presenta como una alternativa eficaz y sostenible para mejorar el tratamiento de aguas residuales en la PTAR.

### ***1.2.2. Formulación del Problema***

#### **Problema general**

- ¿En qué medida las nanopartículas de plata obtenidas mediante biosíntesis con extracto de Queñua ejercen actividad antibacteriana en el afluente de la PTAR – Cusco?

#### **Problemas específicos**

- ¿Cuál es el contenido de fenoles totales en los extractos acuosos e hidroetanólicos de Queñua?
- ¿Cómo influye la temperatura, pH de biosíntesis y el tipo de extracto en el tamaño de las nanopartículas de plata?
- ¿Cuáles son las características de las nanopartículas de plata, mediante espectrofotometría UV-visible, DLS, SEM, Potencial Z y EDX?
- ¿Cuál es la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de plata en el afluente de la PTAR - Cusco?

### **1.3. Justificación**

La justificación de esta investigación se basa en la necesidad de encontrar soluciones sostenibles y eficaces para la eliminación de microorganismos patógenos en aguas residuales.

El uso de nanopartículas de plata biosintetizadas con extracto de Queñua podría representar

una alternativa viable y respetuosa con el ambiente para reducir la contaminación microbiológica en los afluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Además, esta investigación busca contribuir al conocimiento de los procesos de biosíntesis de nanopartículas, así como al desarrollo de tecnologías innovadoras y sostenibles para la eliminación de contaminantes en el agua.

#### **1.4. Objetivos de la investigación**

##### ***1.4.1. Objetivo general***

- Evaluar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante biosíntesis utilizando extracto de Queñua, en el afluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) - Cusco

##### ***1.4.2. Objetivos específicos***

- Determinar los fenoles totales en los extractos acuosos e hidroetanólicos de Queñua mediante el método de Folin Ciocalteu.
- Evaluar la influencia de la temperatura, pH de biosíntesis y el tipo de extracto en el tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas.
- Caracterizar las nanopartículas de plata mediante espectrofotometría UV-visible, DLS, SEM, Potencial Z y EDX.
- Determinar la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de plata en el afluente de la PTAR – Cusco.

# **CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## 2.1. Antecedentes

Aragón (2020), sintetizó nanopartículas de plata usando como precursor metálico el  $\text{AgNO}_3$  y como agente reductor Té verde y desechos de Té de rubio de la localidad de Huayopata, La Convención, Cusco. Realizo la caracterización de las nanopartículas de plata por UV-visible, microscopio electrónico de barrido, análisis por dispersión de energía de rayos X, y microscopía electrónica de transmisión; observó que las nanopartículas eran de forma hexagonal con bordes truncados. Para la segunda etapa de su investigación utilizó la matriz de arcilla Chak'o-Ag calcinándola a  $400^\circ\text{C}$ . En la tercera etapa sintetizó Ag/arcilla y Ag/arcilla-Té verde, evaluando parámetros de concentración del precursor y extracto acuoso, pH, relación  $\text{Ag}^+$  /arcilla, donde obtuvo que el composite Ag/arcilla a pH ácido tuvo menor tamaño; mientras que el composite Ag/arcilla-Té verde básico y Ag/arcilla-Té verde-ácido presentaron diversas formas y tamaños, siendo más estable la Ag/arcilla-Té verde a pH básico. Finalmente evaluó la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre E. Coli (ATCC 51813) y la actividad catalítica de las AgNPs en la degradación del colorante azoico azul de Metileno en medio acuoso. El resultado de esta investigación sugiere que la aplicación de AgNPs en solución coloidal como agente antibacteriano contra E. Coli y degradación de azul de metileno en medio acuoso y al estar en una matriz de arcilla permite su mayor estabilidad y su liberación prolongada, presentando inhibición bacteriana y degradación de azul de metileno.

Cumbal et al., (2017). En su artículo científico "Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract", realizaron la síntesis de las AgNPs utilizando extractos de mora andina el cual cumplió la función de agente reductor y estabilizante. El

agente precursor fue  $\text{AgNO}_3$  al 99%, con el que se preparó 10 mL de una solución al 0.001 M con agua desionizada, el agente reductor la mora andina se pesó 5 g y se calentó en 50 mL de agua desionizada durante 60 min a una temperatura de  $62\text{ }^\circ\text{C} - 65\text{ }^\circ\text{C}$ , el color característico rojo de la mora se filtró con papel Whatman. Para la síntesis se mezcló 1 mL de agente reductor con solución de  $\text{AgNO}_3$  al 0.001 M y se mantuvo a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . La síntesis verde de AgNPs se confirmó por la aparición de una solución de color naranja amarillento con el transcurso del tiempo. Las AgNPs sintetizadas se caracterizaron por UV-visible, microscopía electrónica de transmisión, dispersión dinámica de luz, difracción de rayos X y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier. La formación de AgNPs se analizó mediante espectroscopia UV-vis a  $\lambda = 435\text{ nm}$ . Ellos sugieren que los grupos O-H y  $\text{C} \equiv \text{O}$  se absorbieron en la superficie de las AgNPs y participaron en el procesos de reducción.

Ticllacuri et al., (2019). En la tesis denominada “Caracterización de nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis biogénica usando extracto de *Coffea arabica* procedente de Satipo - Junín para uso antimicrobiano”. Obtuvieron nanopartículas de plata mediante un método sostenible con el medio ambiente donde usaron como agente precursor  $\text{AgNO}_3$  a cuatro concentraciones distintas. El agente reductor y estabilizador fue el extracto de pulpa de *Coffea arabica* a concentraciones de  $2 \times 10^4$  ppm,  $1 \times 10^4$  ppm y  $0.5 \times 10^4$  ppm, la síntesis se realizó a temperatura ambiente y a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . También realizaron la determinación de compuestos fenólicos del extracto de pulpa de *Coffea arabica*, dando como resultado  $127.5022 \frac{\text{mg estándar de ácido gálico (EAG)}}{100\text{ g de materia seca}}$  de compuestos fenólicos totales. Las nanopartículas de plata sintetizadas fueron caracterizados por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) presentando tamaños en el rango de 11.6 nm a 52.18 nm, y por espectrofotometría UV-

visible mostró presencia de plata en los rangos de longitud de onda de 390 a 430 nm de dos experimentos y de 370 nm a 380 nm de los demás. Las aplicaciones antimicrobianas de las nanopartículas de plata se realizaron en el agua de consumo de la población de San Juan de Corinto, por la técnica del número más probable para coliformes totales, obteniendo el valor de coliformes totales inicial de 240 NMP/100mL y después de la aplicación de las nanopartículas de plata, se vio una reducción de coliformes totales a un valor  $< 1,8$  NMP/100 mL, mostrando una actividad antimicrobiana.

Talavera et al., (2018), quienes realizaron el artículo de investigación titulado “Aplicación del nanocomposito arcilla – carboximetilquitosano – nanopartículas de plata en filtros para el tratamiento de aguas de consumo de zonas rurales de Camaná, Arequipa”. Realizaron un filtro con un nanocomposito de arcilla-carboximetilquitosano-nanopartículas de plata, el cual usaron para eliminar bacterias y aniones en aguas de consumo humano. Las nanopartículas de plata se obtuvo por reducción del  $\text{AgNO}_3$  0.001 M, con carboximetilquitosano al 0,01 % y borohidruro de sodio 0.002 M como iniciador de la reducción. Realizaron filtros con arcilla y aserrín de madera como formador de poros, en la proporción de 2:1. Los filtros que obtuvieron se impregnaron con la dispersión coloidal de carboximetilquitosano-nanopartículas de plata, por inmersión durante 12 horas. En sus resultados concluyeron que se remueven: conductividad 84,03 %, sulfatos 85,48 %; cloruros 93,93 %, las bacterias coliformes fecales y coliformes totales se removieron en un 100 %. Por lo que ellos confirman que el uso de nanopartículas de plata tienen un porcentaje de remoción significativo en la eliminación de aniones, en cuanto a bacterias coliformes totales y coliformes fecales se removieron en su totalidad.

Zuorro et al., (2019), presentó en su estudio, un enfoque de la producción de nanopartículas de plata a partir de extractos de residuos de arándano (BW) y residuos de grosella roja (RCW) utilizando etanol acuoso (50% v/v) a 40 °C. Se controló la formación de las nanopartículas mediante la medición de la intensidad de la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) de plata a través de espectrofotometría. Examinaron el efecto de la temperatura (20 °C - 60 °C) y pH (8 - 12) en la cinética de la reacción y en las propiedades de las AgNP. Los resultados de la caracterización por XRD y DLS mostraron que las AgNP eran altamente cristalinas, con una estructura cúbica centrada en las caras y un diámetro hidrodinámico de 25 nm a 65 nm. El potencial Zeta varió de -35.6 a -20.5 mV. Las nanopartículas producidas a partir de BW eran más pequeñas y estables que las de RCW. El análisis cinético mostró que el pH óptimo para la producción de AgNP fue alrededor de 11. En general, lograron sintetizar AgNP utilizando extractos de residuos de frutos rojos e investigaron las variables de temperatura, pH y tipo de extracto.

Behravan et al., (2019), realizaron una investigación sobre la síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de hojas y raíces de *Berberis vulgaris* y su actividad antibacteriana. Después de la recolección, identificación y extracción de *Berberis vulgaris*, llevaron a cabo la producción de nanopartículas de plata. El estudio investigó los efectos de los parámetros como la concentración de AgNO<sub>3</sub> (0,5, 1, 3, 10 mM), extracto acuoso (3, 5, 10, 15, 30 mL) y tiempo de contacto (1, 2, 6, 12, 24 h) en la síntesis de nanopartículas, mencionan que al aumentar la concentración de AgNO<sub>3</sub> aumenta la absorbancia, por lo tanto, se puede decir que al aumentar la concentración de AgNO<sub>3</sub>, los Ag<sup>+</sup> se convierte en Ag<sup>0</sup>. Por lo tanto, aumenta la concentración de nanopartículas de plata. También observaron que al aumentar la concentración de AgNO<sub>3</sub>, el color marrón de

la solución se volvió espeso, lo que representa un aumento de la concentración de nanopartículas de plata en la solución. Además, estudiaron el efecto antibacteriano de estas nanopartículas sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante pruebas de difusión en disco y prueba de concentración mínima inhibitoria. Las pruebas antibacterianas mostraron que estas nanopartículas tienen una mayor actividad antibacteriana que otros extractos. Los resultados demostraron que la biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de *Berberis vulgaris* es un método limpio, económico y seguro en el que no se utilizó ninguna sustancia tóxica y, por lo tanto, no tiene efectos secundarios. Además, estas nanopartículas tienen una alta actividad antibacteriana.

Moyo (2015), indica que el tamaño y la morfología de las nanopartículas se ven afectados directamente por el pH de la solución, reporta que aun aumentó del pH de la mezcla de reacción se observó un incremento en la absorbancia, lo cual podría deberse al aumento en la producción de nanopartículas de plata coloidal y la tasa de reducción de la sal precursora. También subraya que la observación visual muestra que la cantidad de nanopartículas dependía del valor del pH ya que la coloración de la mezcla de reacción se aceleró cuando se aumentó el pH. Finalmente indica que, a un pH ácido, se observaron nanopartículas de plata de gran tamaño, mientras que a pH más alto se formaron nanopartículas de pequeño tamaño muy dispersas.

Covinich et al., (2020), en el capítulo 16 del libro sobre resultados económicos y de sustentabilidad en sistemas agrícolas, presentan los hallazgos de ensayos preliminares sobre la síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando extractos de yerba mate (*Ilex*

*paraguariensis*). Observaron que los extractos obtenidos de los palos de la yerba mate, que presentan una menor concentración de principios activos reductores, generaron valores de absorbancia más bajos en comparación con los extractos de hojas. Además, reportaron que la longitud de onda de absorción máxima y su desplazamiento en función del tiempo de reacción pueden atribuirse a la resonancia plasmónica de las nanopartículas de plata.

## **2.2. Bases teóricas**

### ***2.2.1. Nanociencia y Nanotecnología***

La nanociencia ve la escala nanométrica estudiando las propiedades y los fenómenos que ocurren en ellos, (1 nanómetro =  $1 \times 10^{-9} m$  la mil millonésima parte de un metro).

La nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica, este término abarca un amplio rango de herramientas, técnicas y potenciales aplicaciones, algunos científicos encuentran más apropiado llamarlas nanotecnologías y entre las disciplinas se encuentra la química, la física, la biología, la medicina y la ingeniería, entre otras. (Uribe y Rodríguez, 2007)

### ***2.2.2. Nanomateriales***

Son materiales que contienen partículas con una o más dimensiones en la nano escala, es decir: desde aproximadamente 1 nm a 100 nm.

Según el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2015), un nanomaterial está dividido en dos:

- Nano objeto. – pueden ser las partículas o las fibras, se dice que es un nano objeto

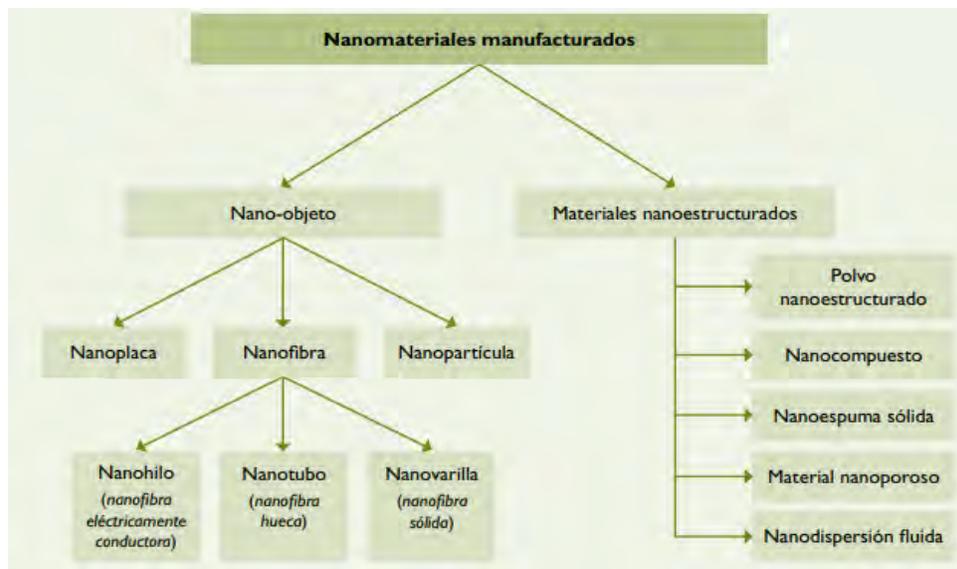
cuando se encuentra en una dimensión o una parte en la nano escala.

- Materiales nanoestructurados. – se dice a aquellas que su estructura interna o superficial están en el tamaño nanométrico.

En la Figura 2.1 se presenta un esquema representativo de los nanomateriales manufacturados.

**Figura 2.1**

*Esquema representativo de nanomateriales manufacturados*



*Nota:* Adaptado de *Seguridad y Salud en el Trabajo con nanos materiales* por Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2015).

### 2.2.3. Nanopartículas

La nanopartícula, es una partícula con tamaño, morfología y distribución que surgen como el resultado del tipo de obtención empleado y por encontrarse en la escala manométrica. (Rodríguez, 2012)

La Agencia del Medio ambiente de los EE.UU. ha dividido en cuatro tipos de

nanopartículas según su componente principal, lo cual se observa en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1**

*Tipos de nanopartículas*

TIPOS DE NANO	DESCRIPCIÓN
PARTÍCULAS	
<b>Basados en Carbono</b>	Estos nanomateriales están compuestos mayoritariamente por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos, los que poseen forma elipsoidal o esférica se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos reciben el nombre de nanotubos.
<b>Basados en metales</b>	Incluyen los puntos cuánticos, nanopartículas de oro y plata y óxidos metálicos como el dióxido de titanio.
<b>Dendrimeros</b>	Son polímeros de tamaño manométrico construidos a partir de unidades ramificadas, superficie con numerosos extremos de cadena y cavidades interiores en las que se pueden introducir otras moléculas como fármacos.
<b>Compuestos</b>	Combinan las nanopartículas con otras nanopartículas o con materiales de mayor tamaño para mejorar sus propiedades.

*Nota:* Adaptado de *Introducción a los Nanomateriales* por Rodríguez Díaz del Castillo 2012 y *Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis Verde* por Marcela Garcés Gómez, 2018, <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/191/209>.

Las nanopartículas metálicas poseen propiedades que se determinan por su composición, tamaño y forma por ende se deben sintetizarlas con un método que pueda controlar esos parámetros, siendo estos en la actualidad más usados y con un gran potencial en los campos

de la industria, biotecnológica, industria farmacéutica y de salud, industria alimenticia y química, etc. (Ticllacuri y Travezaño, 2019)

#### ***2.2.4. Nanopartículas de plata***

Son los nanomateriales más utilizados en la actualidad; por el uso que se le puede dar como agentes antimicrobianos, obedeciendo a sus propiedades antibacterianas, anti fúngicas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas y antiangiogénicas. (Esquivel y Mas, 2021)

#### **Aplicaciones más citadas de las nanopartículas de plata:**

- Industria biomédica, medica – farmacéutica
- Industria textil
- Industria alimentaria y agrícola
- Electrónica
- Purificación de agua y tratamientos ambientales

Los investigadores están buscando nuevos agentes antibacterianos y las AgNPs son candidatos prometedores por sus diferentes aplicaciones. (Nazeruddin et al., 2014)

#### ***2.2.5. Síntesis de nanopartículas***

Los métodos se pueden clasificar en tres categorías: síntesis física, síntesis química y síntesis biológica (o verde), estas conducen a distintos tamaños, morfología y estabilidad.

Muchos de los efectos adversos de la síntesis de nanopartículas han sido asociados con la toxicidad de los métodos físicos y químicos, debido a la presencia de sustancias tóxicas absorbidas en la superficie de las AgNPs por ende una alternativa eco amigable, son los métodos biológicos que se han convertido en una importante rama de la nanotecnología, para la síntesis de nanopartículas utilizando microorganismos, enzimas, hongos y extractos

de plantas. (Garzón, 2018)

Los métodos de producción de nanopartículas se clasifican como:

- **TOP-DOWN (de arriba hacia abajo)**

Durán et al., (2021), menciona que estos métodos reducen el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía y generan desperdicios, también incide que estos métodos es donde se usan reactivos químicos que podrían significar toxicidad para el medio, el más destacado es el método de molienda. Gómez (2013) menciona que los métodos más utilizados son:

- ✓ Evaporación térmica
- ✓ Depósito químico en fase vapor
- ✓ Preparación de clúster gaseosos
- ✓ Implantación de iones
- ✓ Molienda

- **BOTTOM-UP (de abajo hacia arriba)**

Son aquellos que, a partir de átomos individuales, se van formando ensamblajes.

El mecanismo de obtención y formación se da casi en forma general en dos etapas: primero la etapa de nucleación (los átomos requieren una energía alta para activarse y comenzar a unirse), la segunda etapa es el crecimiento, (poca energía de activación) y es donde se forman las nanopartículas (Zanella, 2012). Sus métodos más utilizados son:

- ✓ El método coloidal
- ✓ Reducción fotoquímica y radioquímica

- ✓ Irradiación con microondas
- ✓ Utilización de dendrímeros
- ✓ Síntesis solvotermal
- ✓ Método sol-gel
- ✓ Síntesis biológica

#### **2.2.6. Síntesis Biológica**

La síntesis biológica, síntesis verde o síntesis biogénica, es una técnica alternativa de bioproducción de material nanoparticulado metálico (Au, Ag, Fe y óxidos metálicos), y se basa en emplear como agente reductor y / o estabilizante extracto de plantas, hongos y bacterias, estas poseen características antioxidantes, que buscan ser amigable con el medioambiente porque es más ecológico, económico y por su simplicidad se puede obtener varias formas y tamaños de un nanomaterial, dejando atrás los problemas típicos de los métodos de síntesis químicos y físicos que utiliza materiales tóxicos como son los solventes y surfactantes, estos pueden afectar el medio ambiente, son más costosos, emplean mayor energía y no poseen escalabilidad de producción del material. (Garzón, 2018)

La síntesis biológica se divide en:

- Síntesis biológica con bacterias
- Síntesis biológica a partir de hongos
- Síntesis biológica con extractos de plantas

En los últimos años la tendencia en las investigaciones de obtención de AgNPs, es la utilización de extractos de plantas y hongos debido a su mayor rendimiento y su fácil manejo. (Esquivel y Mas, 2021).

- **Síntesis biológica o biosíntesis con extractos de plantas.**

La síntesis utilizando extractos de plantas genera nanopartículas de forma, estructura y morfología bien definidas. En la Figura 2.2 se muestra el proceso de formación de las AgNPs.

El requisito principal en la síntesis verde de AgNPs, es una solución de iones metálicos de plata y un agente biológico reductor.

El uso de extractos de plantas para sintetizar nanopartículas es el método más rápido, sencillo, económico y brinda una mayor opción de manipulación de variables que la síntesis con microorganismos, también presenta ventajas como en controlar el tamaño de las nanopartículas variando la concentración de extracto vegetal, empleando sin necesidad de usar agentes surfactantes, estabilizantes o polímeros. (Esquivel y Mas, 2021)

La síntesis de AgNP mediada por extractos de plantas generalmente se inicia mezclando el extracto con una solución de  $\text{AgNO}_3$ . La reacción se confirma visualmente al observar el cambio de color en los recipientes, esto marca la formación de AgNPs. Cuando se menciona extracto de plantas es para referirse a que la preparación del extracto pudo ser con una parte específica de la planta como hojas, tallos, flores, cortezas, frutos, pulpas y cáscaras, algunas plantas son conocidas por sus propiedades antioxidantes se encuentran presentes metabolitos que tienen propiedades reductoras como los compuestos fenólicos, entre otros. (Garzón, 2018)

Según la planta o el material vegetal del que se haya extraído, el extracto vegetal comprende una variedad de productos químicos bioactivos. En general, tal como menciona Behravan et al., (2019), los extractos de plantas contienen flavonoides, terpenoides y fenoles; pero las proteínas, los glucósidos y los polisacáridos también están involucrados en la formación de nanopartículas. Los componentes funcionales de estos compuestos

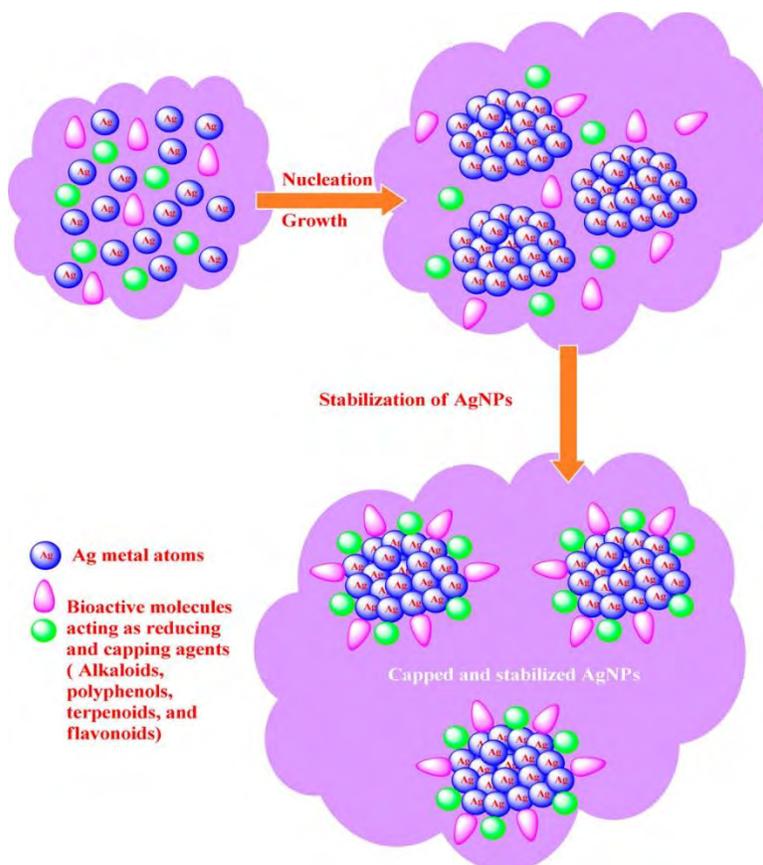
bioactivos operan como agentes reductores y estabilizadores para la síntesis de nanopartículas.

La reducción inicial de iones metálicos induce a la formación de centros de nucleación. Estos centros secuestran iones metálicos adicionales y también incorporan lugares vecinos de nucleación que conducen a la formación de nanopartículas. (Esquivel y Mas, 2021). Inicialmente, la nucleación de iones metálicos reducidos parte del estado de oxidación monovalente o divalente. Inmediatamente después de esta etapa, hay un crecimiento regular de partículas adyacentes para formar nanopartículas más grandes a través de interacciones no covalentes que son termodinámicamente estables, mientras que el exceso de iones metálicos disminuye. (Shah et al., 2015)

La progresiva agregación da lugar a múltiples formas y morfologías de nanopartículas tales como esferas, polígonos, alambres, etc. En la última etapa de síntesis, los extractos de plantas se utilizan para estabilizar y finalmente obtener una morfología energéticamente estable. (Sharma et al., 2022)

**Figura 2.2**

*Pasos para la síntesis verde de nanopartículas de plata*



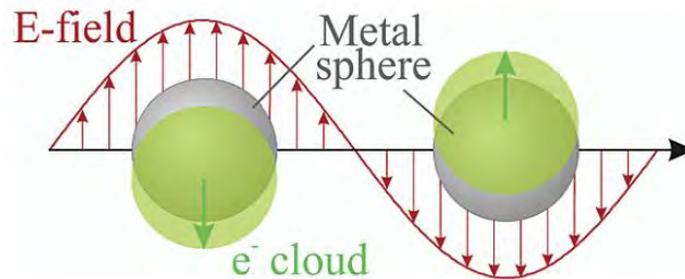
*Nota:* La formación de NPs empieza con la nucleación de los átomos de plata (clúster), seguido con una fase de agregación progresiva de clúster para dar lugar a la formación de AgNPs estables energéticamente. El color azul indica a los átomos de plata y el color violeta y verde son los bioactivos (polifenoles, terpenoides, flavonoides y alcaloides) de las moléculas que actúan como agentes reductores y de protección de átomos de plata. Adaptado de *Green Route Synthesis and Characterization Techniques of Silver Nanoparticles and Their Biological Adeptness* por Sharma et al., 2022, ACS Omega.

### 2.2.7. *Resonancia de plasmones de superficie*

La resonancia de plasmones de superficie (SPR), son las oscilaciones colectivas de los electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Para que este fenómeno ocurra, la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente (A. Cruz et al., 2011). En la Figura 2.3 se observa como el campo eléctrico oscilante de la luz incidente induce un dipolo eléctrico en la partícula desplazando a una parte de los electrones móviles deslocalizados en una dirección lejos del resto de la partícula metálica, generando así una carga neta negativa en un lado de la partícula. Como el resto de los núcleos y sus electrones internos no se han desplazado, constituyen una carga opuesta positiva.

#### **Figura 2.3**

*Resonancia de plasmón superficial de una nanopartícula*



*Nota:* Adaptado de *Nanopartículas Metálicas y Plasmones de Superficie: Una relación profunda* por Cruz et al., 2011, Avances en Ciencias e Ingeniería.

Prashant (2008), mencionan que la frecuencia de oscilación de la banda superficial de plasmón de resonancia es determinada por 4 factores: forma de la nanopartícula, diámetro del núcleo metálico, composición y medio circundante. Cuando el radio de la nanopartícula es incrementado, entonces el dipolo de resonancia del plasmón gradualmente

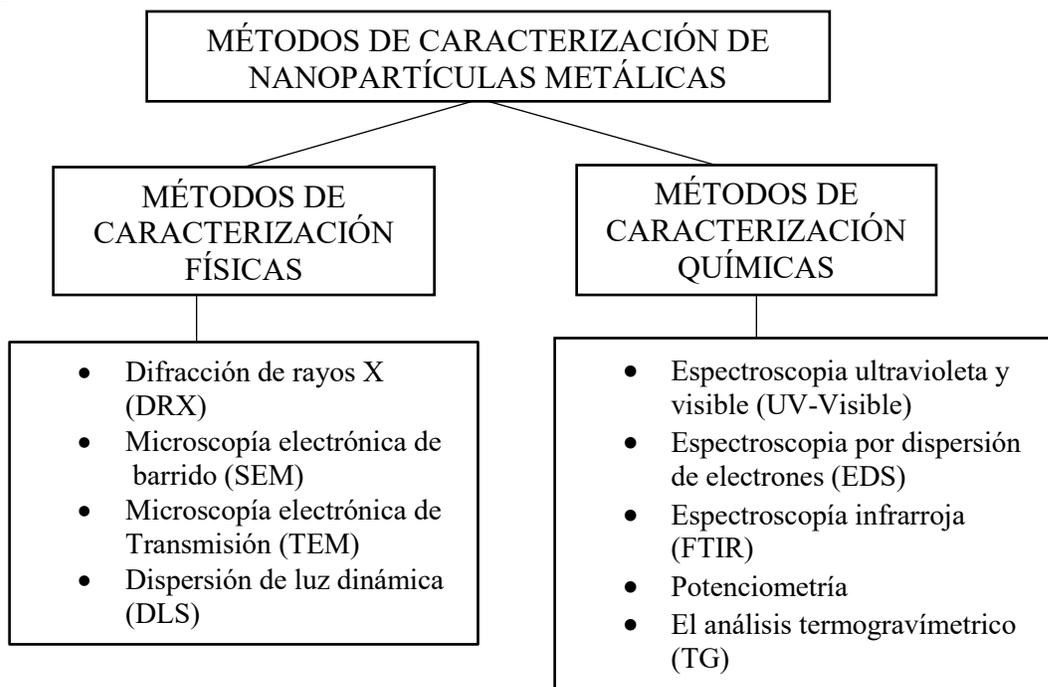
se desplaza hacia el espectro rojo. Cuanto más próximas se encuentran las partículas se forman los ensambles (clúster) de NPs. En este caso, se observa un desplazamiento hacia el espectro rojo debido al acoplamiento entre la oscilación del plasmón y el campo de interacción de la partícula vecina.

### 2.2.8. Métodos de caracterización de nanopartículas metálicas

En la Figura 2.4 se observa los diferentes métodos de caracterización de las nanopartículas metálicas.

**Figura 2.4**

*Métodos de caracterización de nano partículas dividido en dos grupos físicos y químicos*



*Nota:* Adaptado de Caracterización de nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis biogénica usando extracto de Coffea arábica procedente de Satipo - Junín para uso antimicrobiano por Tiellacuri et al., (2019).

- **Espectroscopia ultravioleta visible (UV-visible)**

Técnica de caracterización indirecta de nanopartículas solo permite identificar la presencia del nanomaterial en una solución mediante la formación de picos o bandas a una determinada longitud de onda y una respectiva absorbancia. Es conocido que las AgNPs presentan un color pardo a marrón oscuro en solución acuoso debido a la excitación de las vibraciones plasmonicas sobre la superficie de estas, estas vibraciones propias de las nanopartículas son observadas usando el método de resonancia de plasmón de superficie realizando mediciones UV-visible. El espectro UV-visible también sirve para tener referencia del tamaño y cantidad de nanomaterial que hay, se dice que a mayor absorbancia mayor tamaño del nanomaterial o la relación del ancho en el espectro sea mayor, mayor número de material manométrico existe en la solución. (Millán, 2016)

Según Morales et al., (2009), a una longitud de onda de 400 a 450 nm indica la presencia de plasmones de nanopartículas metálicas el cual depende del tamaño, la forma y la morfología.

- **Dispersión de luz dinámica**

Dynamic Light Scattering (DLS), es una técnica no invasiva y establecida para medir tamaño submicrónico y la distribución de tamaño de moléculas y partículas. El DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas, tomando en cuenta la de dispersión de Rayleigh, la cual nos dice que la  $I \propto d^6$ , donde  $I$  = intensidad de la luz dispersada,  $d$  = diámetro de la partícula. El término  $d^6$  nos dice que una partícula de 50 nm dispersará  $10^6$  o un millón de veces más luz que una partícula de 5 nm. Por lo tanto, existe el peligro de que la luz de las partículas más grandes resalte más que la luz dispersada por las más pequeñas. Este factor  $d^6$  también significa que es difícil medir con DLS, por

ejemplo, una mezcla de partículas de 1000 nm y 10 nm porque la contribución a la luz total dispersada por las partículas pequeñas será extremadamente pequeña. (Malvern Panalytical, 2017).

Los términos específicos en el contexto de la dispersión de luz dinámicas son:

✓ **Diámetro hidrodinámico**

El tamaño de una partícula se calcula a partir del coeficiente de difusión traslacional utilizando la ecuación de Stokes-Einstein;

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}; \quad (2.1)$$

dónde:

$d(H)$  = diámetro hidrodinámico

$D$  = coeficiente de difusión traslacional

$k$  = constante de Boltzmann

$T$  = temperatura absoluta

$\eta$  = viscosidad

Teniendo en cuenta que el diámetro que se mide en DLS es un valor que se refiere a cómo una partícula se difunde dentro de un fluido, por lo que se denomina diámetro hidrodinámico, el cual es representado en la Figura 2.5.

## Figura 2.5

### *Radio hidrodinámico de las nanopartículas de plata*



*Nota:* Adaptado de la *Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición* por Botasini y Santiago, 2021, INNITEC.

En la Figura 2.5 se muestra el radio hidrodinámico de la nanopartícula, el cual es influenciado por la doble capa eléctrica la rodea la cual puede estar conformado por materia orgánica. El coeficiente de difusión traslacional de la partícula dependerá no solo del tamaño del núcleo de la partícula, sino también de cualquier estructura superficial que afectará la velocidad de difusión, así como la concentración y el tipo de iones en el medio. (Malvern Panalytical, 2017)

### ✓ **Tamaño promedio Z**

Según la ISO 22412 (2017), el promedio Z constituye el mejor valor que se puede informar en un entorno de control de calidad, quienes la definen como el “diámetro de partícula armónico ponderado por intensidad.

### ✓ **Índice de polidispersidad (PdI)**

Es una medida adimensional que se utiliza para evaluar la distribución de tamaño de partículas en una muestra. Esta medida se escala de tal manera que los valores típicos rara vez son menores a 0.05, excepto en el caso de muestras altamente monodispersas. Si los valores son mayores a 0.7, se considera que la muestra tiene una distribución de tamaño muy amplia y es probable que no sea adecuada para la técnica de dispersión de luz dinámica. (DLS). (Malvern Panalytical, 2017)

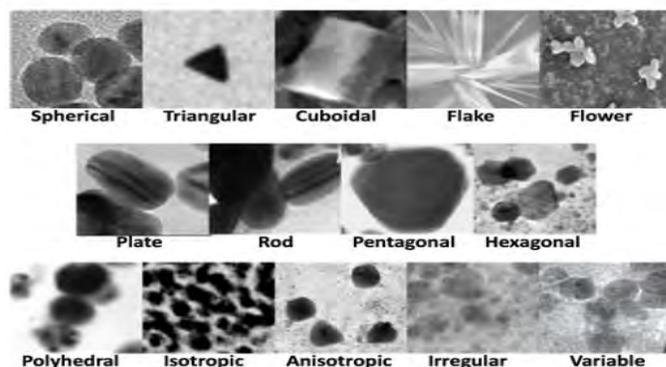
### • **Microscopía electrónica de barrido**

Es uno de los métodos más efectivos para la caracterización de nanomateriales y la investigación de estructuras superficiales, porque muestra una imagen de alta resolución que posibilita obtener imágenes tridimensionales muy importantes para determinar la morfología y fácil interpretación de un material en una escala muy pequeña. Lo que significa que características cercanas de esta pueden ser examinadas, utilizando electrones. La preparación de muestras tiene algunos factores de riesgo que pueden distorsionar fácilmente la estructura de las partículas. (Ticllacuri y Travezaño, 2019).

En la Figura 2.6 se aprecia las formas de AgNPs que pueden obtener y se logran ver mediante un análisis SEM.

## Figura 2.6

### *Formas de nanopartículas de plata sintetizadas*



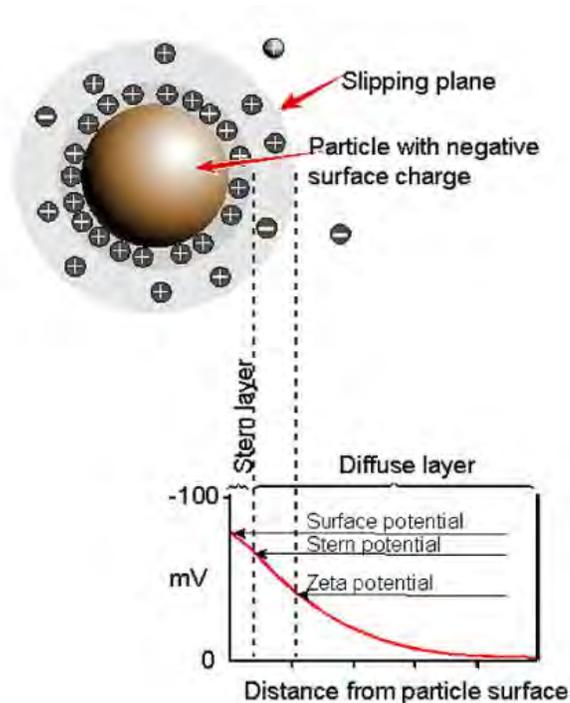
*Nota:* El análisis morfológico SEM en la mayoría de los estudios revela AgNPs son de forma esférica, mientras que pocos autores informaron irregulares, triangulares, hexagonales, isótropo, poliédrico, escama, flor, pentagonal, anisotrópico y estructuras en forma de varilla. Adaptado de *Síntesis verde de nanopartículas de plata: una revisión*, por Srika et al., 2016, Scientific Reseach An Academic Publisher.

### ✓ **Potencial Z**

El potencial de Z es una propiedad física exhibida por cualquier partícula en suspensión, macromolécula o superficie del material. Se puede utilizar como ayuda para predecir la estabilidad a largo plazo. En la Figura 2.7 se observa la representación de las cargas en la superficie de una AgNp.

**Figura 2.7**

*Representación de las cargas en la superficie de una nanopartícula de plata*



*Nota:* Adaptado por Malvern Panalytical, 2017, ([www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com)).

En la Figura 2.7 se muestra la capa líquida que rodea la partícula, la cual se divide en dos partes: una región interna (capa principal) donde los iones están fuertemente unidos y una región externa (difusa) donde están menos firmemente asociadas. Dentro de la capa difusa hay un límite dentro del cual los iones y las partículas forman una carga estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro del límite lo mueven. Esos iones más allá del límite permanecen con la dispersión a granel. El potencial en este límite (superficie de cizallamiento hidrodinámico) es el potencial Z, el cual representa la carga eléctrica efectiva que está presente en la superficie de una partícula y se puede utilizar para caracterizar la estabilidad de las dispersiones coloidales. La línea

divisoria general entre suspensiones estables e inestables generalmente se toma a +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales de Zeta más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV normalmente se consideran estables. (Malvern Panalytical, 2017)

- **Espectroscopia por dispersión de electrones**

La espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS, también abreviada EDX o XEDS) es una técnica analítica que permite la caracterización química/análisis elemental de materiales.

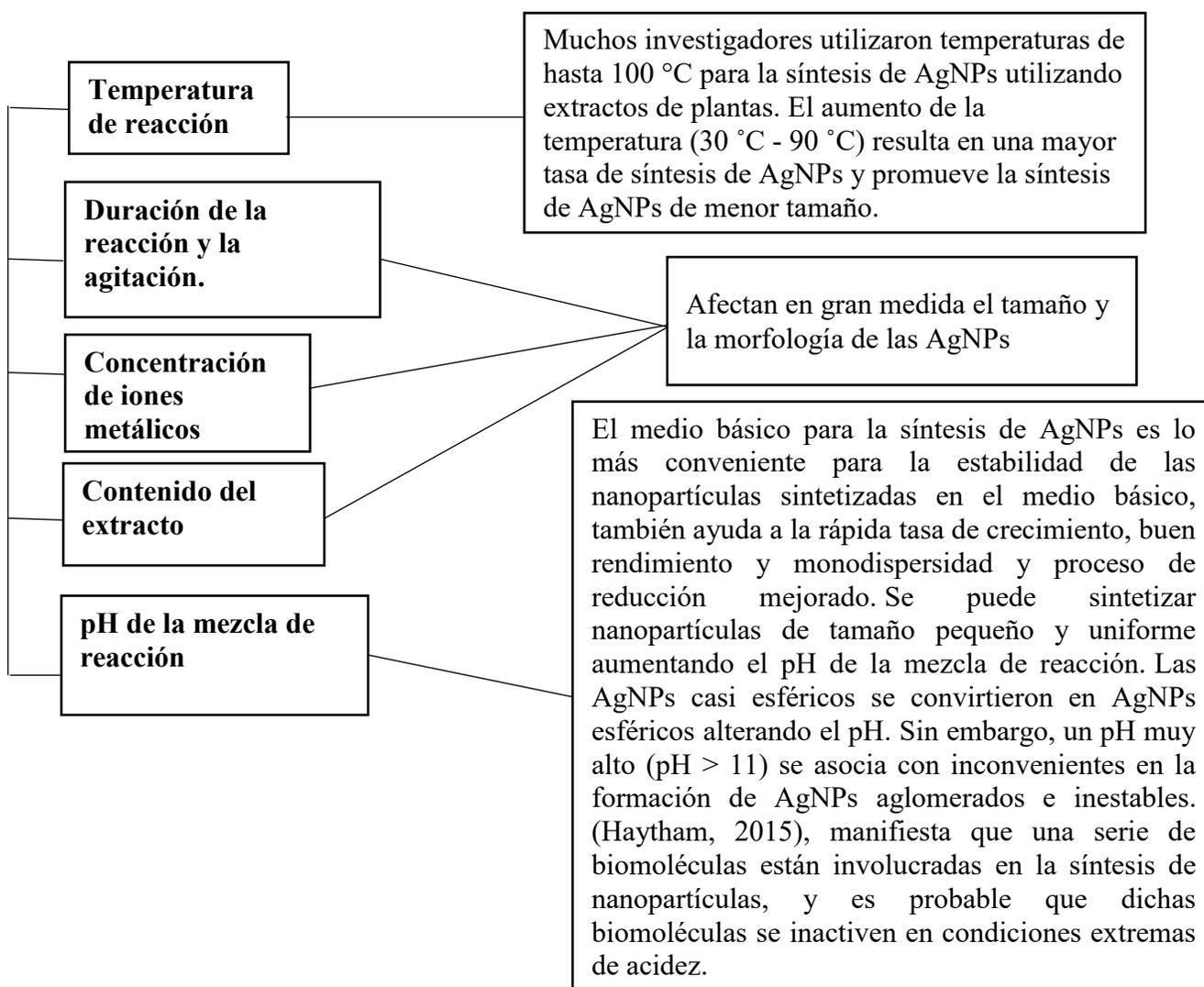
Un haz de electrones proporciona suficiente energía para expulsar electrones del núcleo y la capa, así provocar la emisión de rayos X. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2023) A medida que la sonda de electrones escanea la muestra, se emiten y miden rayos X característicos del elemento; cada espectro EDS registrado se asigna a una posición específica en la muestra. La calidad de los resultados depende de la intensidad de la señal (buena relación de señal - ruido) y la limpieza del espectro. La limpieza afectará la cantidad de picos vistos; esto es consecuencia de los materiales que componen la columna de electrones. (Ticllacuri y Travezaño, 2019)

### ***2.2.9. Factores que afectan la síntesis de AgNPs***

En la Figura 2.8, se muestran los principales factores que afectan la formación de AgNPs.

**Figura 2.8**

*Principales parámetros físicos y químicos que afectan a la síntesis de nanopartículas de plata*



*Nota:* Adaptado de *Síntesis verde de nanopartículas de plata* por Srika et al., Scientific Reseach An Academic Publisher y de *Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de plata en matriz de arcilla Chak'o y su actividad antimicrobiana en E. coli ATCC51813* por Aragón, 2020, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

### **2.2.10. Queñua**

Es un tipo de planta de género alto andino que se caracteriza por tener pequeños árboles y arbustos, generalmente son llamados Queñual, Queñua, Quinual o Quewiña. Con respecto a la distribución altitudinal, la mayor diversidad de especies se encuentra entre los 3000 msnm y 4000 msnm. Servat (2002), menciona que las especies registradas a menor altitud son la *Polylepis racemosa Ruiz y Pav.* a 1800 msnm, en la Cordillera de Accanacu en el departamento de Cusco y la *Polylepis subsericans* registrada a mayor altitud sobre los 5100 msnm la Cordillera Vilcanota en Perú. (Cárdenas, 2013)

Mendoza y Cano (2011), manifiesta que la especie *Polylepis racemosa Ruiz y Pav* se encuentra a una altitud de 2900 msnm - 4000 msnm en los departamentos de Cusco, Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Huánuco, Junín, Lima, La Libertad y Pasco.

### **2.2.11. Extracto vegetal**

Un extracto vegetal es una mezcla compleja de principios activos. La extracción por solventes es una de las técnicas para la obtención de principios activos, se toma en consideración las características de material vegetal, la naturaleza del solvente, temperatura, la agitación, la relación sólido - líquido, el tiempo de extracción y el control de la difusión celular. (Pulluquitin Tituaña, 2013)

Hay varios métodos extractivos, la maceración es un procedimiento sólido – líquido en el que se coloca el material vegetal que contiene compuestos solubles, desecado o fresco, molido o en pequeños trozos en un recipiente con tapa. (Celis et al., 2008)

### ***2.2.12. Tamizaje fitoquímico***

El tamizaje fitoquímico se basa fundamentalmente en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales, a través de reacciones y análisis químicos. Este tamizaje se realiza a los extractos etanólicos, acuoso o a una mezcla proporcionada de los dos solventes, con el fin de identificar y comparar los metabolitos secundarios extraídos con cada tipo de solventes de diferentes polaridades. (Mendoza et al., 2022)

### ***2.2.13. Compuestos fenólicos***

Son compuestos orgánicos, poseen estructuras moleculares que contienen por lo menos un grupo fenol, un anillo aromático los cuales están unidos mínimamente a un grupo funcional hidroxilo en su mayoría son glucósidos, mezclado con una cantidad de azúcares. Hacen parte de uno de los grupos más abundantes dentro de los metabolitos secundarios. Comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina.

Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos (solubles en agua) y otros son polímeros muy grandes (insolubles en agua). (Gimerno, 2004)

Jordá (2015), menciona que estos compuestos pueden establecer interacciones con grupos peptídicos (taninos). Los fenoles del grupo catecol pueden quelar metales. Son muy susceptibles a la oxidación y algunos de estos son las antocianinas, flavonas y flavonoles. Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de reducirse debido a la presencia de grupos fenólicos en su estructura molecular. Estos grupos fenólicos pueden actuar como aceptores de electrones y, por lo tanto, pueden participar en reacciones de oxidación - reducción. La

capacidad de reducción de los compuestos fenólicos depende de varios factores, como el tipo de grupo fenólico presente, la presencia de grupos funcionales adicionales en la molécula y el pH del medio en el que se encuentra el compuesto.

Los compuestos fenólicos se clasifican según su estructura química en dos categorías: (Tabla 2.2)

**Tabla 2.2**

*Compuestos fenólicos según su estructura Química*

No Flavonoides	Flavonoides
Entre ellos hay dos subgrupos:	Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Subgrupos:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenoles no carboxílicos: C<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>.</li> <li>• Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> y derivados del ácido cinámico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antocianos.</li> <li>• Flaconas, flavononas, flavanoles y flavanonoles</li> <li>• Flavanoles, taninos condensados y lignanos.</li> </ul>

*Nota:* Adaptada de *Compuestos fenólicos* por Gimerno, 2004.

### **Método de cuantificación de fenoles totales**

Marina et al., 2008, menciona que el contenido de fenoles totales solubles se determina por el siguiente método de Folin y Ciocalteu, el cual se basa en:

- La capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo que posee el mismo nombre del método contiene molibdato y tungsteno sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico, esta reacción se da a condiciones alcalinas (pH ≈10).
- La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso a 765 nm, de tungsteno

y molibdeno siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

#### **2.2.14. Bacterias**

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares rodeados por una membrana y una pared celular, pueden tener distintas formas y algunas especies pueden vivir en condiciones realmente extremas de temperatura y presión. Existen bacterias perjudiciales, llamadas patógenas entéricas, las cuales causan enfermedades, estas pueden ser esféricas, alargadas o espirales. Las bacterias entéricas de mayor preocupación en aguas residuales son las *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio*, *Cholerae* y la enteropatógena *Escherichia coli.*, estas bacterias causan enfermedades gastrointestinales. (Amy et al., 2017)

Estos organismos ya se consideran seres vivos, se reproducen por fisión o bipartición, son de mayor tamaño que los virus y normalmente son menores que las eucariotas, alcanzando tamaños de diámetro cercanos a los  $0.2 \mu\text{m}$ . (Ojeda, 2015)

Según Campos (2003), las bacterias coliformes totales son indicadores de la eficacia de un proceso de desinfección, porque se encuentran en densidades aproximadamente proporcionales al grado de contaminación fecal. Dado que estas bacterias son generalmente más resistentes que las bacterias que causan la enfermedad, su ausencia en el agua es un indicio de que el agua es bacteriológicamente segura para el consumo humano

#### **Coliformes totales**

El grupo coliforme es definido como todas las bacterias Gram negativas, forma bacilar, aerobios o anaerobios facultativos, no formadores de esporas, capaces de desarrollarse en

presencia de sales biliares o agentes que fermentan la lactosa con producción de ácido, gas y aldehído a temperatura de 35 °C a 37 °C, produciendo ácido y gas (CO<sub>2</sub>) en 24 o 48 horas de incubación. (National Human Genome Research Institute, 2023)

La prueba más relevante utilizada para la identificación del grupo de coliformes, es la hidrólisis de la lactosa. El rompimiento de este disacárido es catalizado por la enzima B-D-galactosidasa. Ambos monosacáridos (la galactosa después es transformada en glucosa por reacciones bioquímicas) posteriormente son metabolizados a través del ciclo glucolítico y ciclo del citrato. Los productos metabólicos de estos ciclos son ácidos y CO<sub>2</sub>. (Castaño y Bernal, 2015)

#### **Coliformes Termotolerantes:**

Es un subgrupo de las bacterias del grupo de coliformes totales, las cuales poseen las mismas propiedades, excepto que toleran y crecen a una mayor temperatura, fermentan la lactosa a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  en 24 horas; y producen indol a partir del triptófano.

Las bacterias coliformes termotolerantes o fecales, se componen predominantemente de *E. coli.*; por lo tanto, este grupo se considera como un indicador de contaminación fecal aceptable, es el microorganismo de elección para los programas de monitoreo para la verificación, incluidos los de vigilancia de la calidad del agua de consumo. (Organización Mundial de la Salud, 2006)

El grupo de coliformes totales incluye varios géneros, los cuales pueden ser de origen fecal. En condiciones adecuadas, pueden multiplicarse en presencia de material orgánico.

#### ***2.2.15. Métodos de análisis para la determinación de bacterias indicadoras en el agua***

Se realizó mediante el método de los tubos múltiples. El cual es aplicable a todo tipo de

muestras de agua, siempre que las bacterias estén distribuidas homogéneamente en las muestras preparadas para la prueba:

- **Método de los tubos múltiples (TM).** - Consiste en añadir diferentes cantidades de agua a tubos que contienen un medio de cultivo adecuado. Las bacterias presentes en el agua se reproducen y, a partir del número de tubos inoculados y del número de tubos con reacción positiva, puede determinarse estadísticamente el número más probable (NMP) de bacterias presentes en la muestra original de agua.

Teóricamente, la técnica es lo suficientemente sensible como para medir niveles bajos de bacterias en muestras de agua, el mayor volumen usado es generalmente 10 mL de muestra.

Ampliamente empleado para la identificación de coliformes totales y fecales, su fundamento es la fermentación de la lactosa por parte de las bacterias coliformes incubadas a 35 °C durante 24 h a 48 h, obteniendo como resultado una producción de ácido y gas el cual se manifiesta en campanas de fermentación cuando se tiene la presencia de estos microorganismos, se utiliza un medio de cultivo que contenga sales biliares (National Human Genome Research Institute, 2023).

Esta determinación consta de 2 fases:

- **Fase presuntiva** el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio que hace posible la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y tengan la capacidad de utilizar a la lactosa como fuente de carbono.
- **Fase confirmativa.** se emplea como medio de cultivo el caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de

aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante. La determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de  $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 24 h a 48 h. (Castaño y Bernal, 2015)

**2.2.16. Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales**

Según el Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM, los límites máximos permisibles para los efluentes de PTAR, determinan los niveles de contaminación en el agua para que no representen riesgo para el medio ambiente. En la Tabla 2.3 se muestra los LMP.

**Tabla 2.3**

*LMP de Efluente para vertido de aguas residuales*

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>LMP efluente de vertido a cuerpos de aguas</b>
Coliformes	NMP/100	10000
Termotolerantes	mL	
pH	Unidad	6.5-8.5
Temperatura	$^{\circ}\text{C}$	<35

*Nota:* Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM

### 2.2.17. *Modo de acción de las nanopartículas de plata contra las bacterias*

El modo de acción de nanopartículas de plata no son muy entendidas en su efecto antibacteriano; sin embargo, hay muchas teorías y tesis sobre el modo de acción en las bacterias y están en marcha para dilucidar mejor estos aspectos y uno de ellos es que las nanopartículas de plata se adhieren a las bacterias y luego penetran en el interior liberando constantemente  $Ag^0$ , lo que puede considerarse un medio para matar bacterias. Esto causa cambios estructurales llamados "picaduras" en la membrana de la célula bacteriana, que resulta en variada permeabilidad celular y muerte celular. (Aragón, 2020)

Las AgNPs poseen potente acción antibacteriana contra las bacterias Gram positivas, *Lactobacilos fermentum*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus Cereus* *Brevibacterium Casei*, *S. Aureus*, *B. Licheniromis* y bacterias Gram negativas, *E. coli*, *Entrobacteria* y *Ureibacillus Thermo sphaerius*. (Srika et al., 2016)

Srika et al., (2016), menciona que la acción antimicrobiana de las AgNPs se puede clasificar en dos tipos :

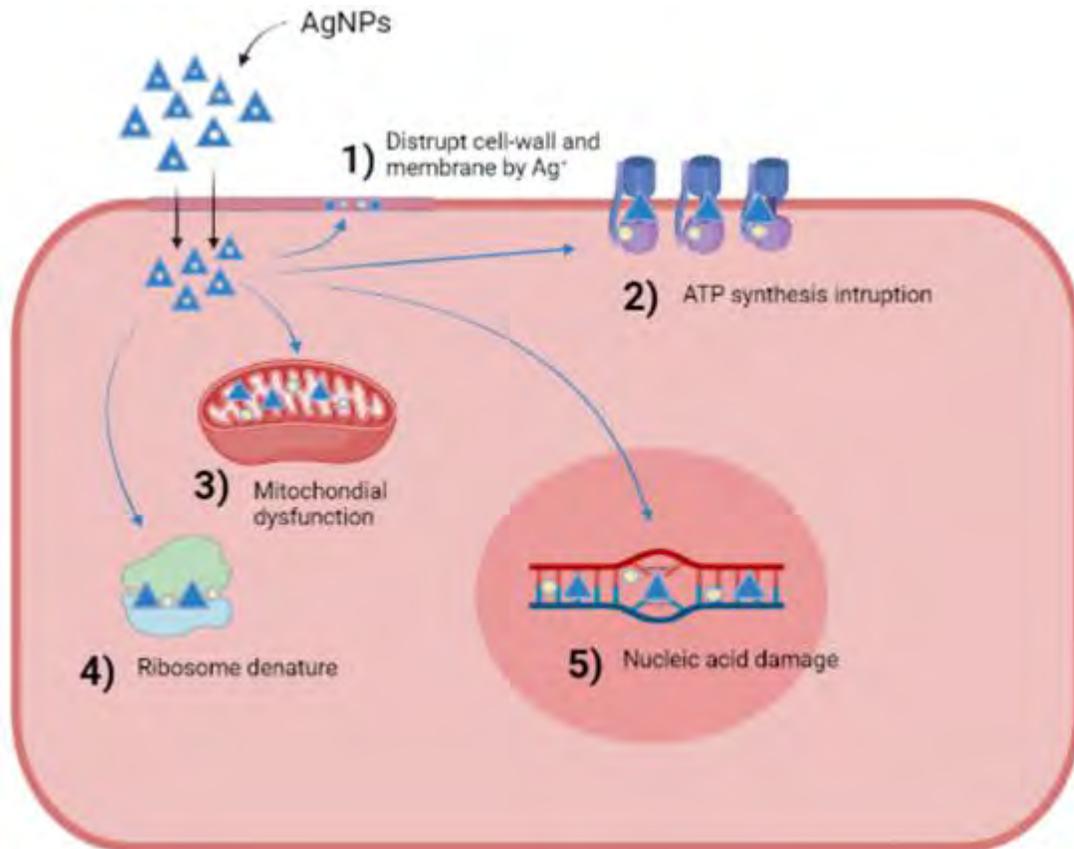
- La acción inhibitoria. - Las células bacterianas no mueren, pero se evita su división
- La acción bactericida. -Las células bacterianas morirán debido a la acción de AgNPs.

Khwaja (2018), menciona que las AgNPs con mayor área de superficie proporcionan un mejor contacto con los microorganismos. Por lo tanto, estas nanopartículas son capaces de penetrar la membrana celular o adherirse a la superficie bacteriana. Además, resalta que son altamente tóxicos para las cepas bacterianas y su eficacia antibacteriana aumenta al reducir el tamaño de las nanopartículas.

Los enfoques que ilustran el mecanismo de acción antibacteriana de las AgNP se resumen en la Figura 2.9.

**Figura 2.9**

*Mecanismo de acción antibacteriana de las nanopartículas de plata*



*Nota:* (1) Las AgNPs liberan iones de plata que pueden romper la pared celular y la membrana de las bacterias, esto debilita la estructura de las bacterias y las hace más vulnerables; (2) podrían inhibir la síntesis de ATP (Adenosín Trifosfato), que es la principal fuente de energía de las bacterias, sin suficiente ATP, las bacterias no pueden funcionar adecuadamente y eventualmente mueren; (3) causan la disfunción en las mitocondrias, que son las fábricas de energía de las células bacterianas, esto interrumpe el proceso de producción de energía y afecta negativamente la supervivencia de las bacterias; (4) las AgNPs pueden degradar los ribosomas, que son estructuras celulares esenciales para la síntesis de proteínas en las bacterias, al interferir con los ribosomas, las AgNPs interrumpen

la capacidad de las bacterias para producir proteínas vitales y sobrevivir; (5) además, las AgNPs pueden dañar el material genético de las bacterias, como el ADN, al incorporar iones de plata en su estructura, esto puede provocar daños irreparables en el ADN y llevar a la muerte celular. Adaptado de *Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review* por Bamal et al., 2021, *Nanomaterials*, vol. N°11.

# **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Lugar de la Investigación

La presente investigación se desarrolló en tres laboratorios de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco las cuales son los siguientes:

- Laboratorio de Fisicoquímica de la Escuela Profesional de Química.
- Laboratorio de Tecnologías de la Escuela Profesional de Ingeniería Química.
- Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología.

### 3.2. Muestra

La muestra estuvo constituida por las ramas y hojas de *Polylepis racemosa Ruiz y Pav.* (Queñua) procedente de la región del Cusco de plantaciones de la Provincia de Urubamba, distrito de Calca.

Para determinar la capacidad antibacteriana se utilizó como muestra agua del afluente de la PTAR-San Jerónimo ubicado en el departamento de Cusco.

### 3.3. Materiales

#### ➤ Materiales de vidrio y otros

- Bolsa de papel
- Tijeras
- Micropipeta
- Buretas
- Fiolas
- Matraces Erlenmeyer
- Botellas de color ámbar de 500 mL
- Pizeta

- Tubos de ensayo
- Vasos Beaker
- Mortero con pilón
- Agitadores magnéticos
- Gradilla
- Papel filtro
- Embudo
- Guantes de nitrilo
- Tubo de Durham
- Pico de Bunsen
- Asa de platina

➤ **Reactivos**

- Agua destilada
- Nitrato de Plata 99.99% Merck N° CAS: 7761-88-8
- Hidróxido de Sodio 99% Merck N° CAS 1310-73-2
- Ácido gálico monohidratado Sigma Aldrich N° CAS 149-91-7
- Folin Ciocalteu 2N Sigma Aldrich - Grado analítico
- Carbonato sódico Merck N° CAS: 497-19-8
- Reactivo de Dragendorff
- Hierro(III) cloruro (FeCl<sub>3</sub>) Merck N° CAS: 7705-08-0
- Caldo BRILA (Lactosa Verde Brillante Bilis) Merck
- Agua de peptona Merck
- Caldo EC (Escherichia coli) Merck
- Alcohol 96° N° CAS: 64-17-5

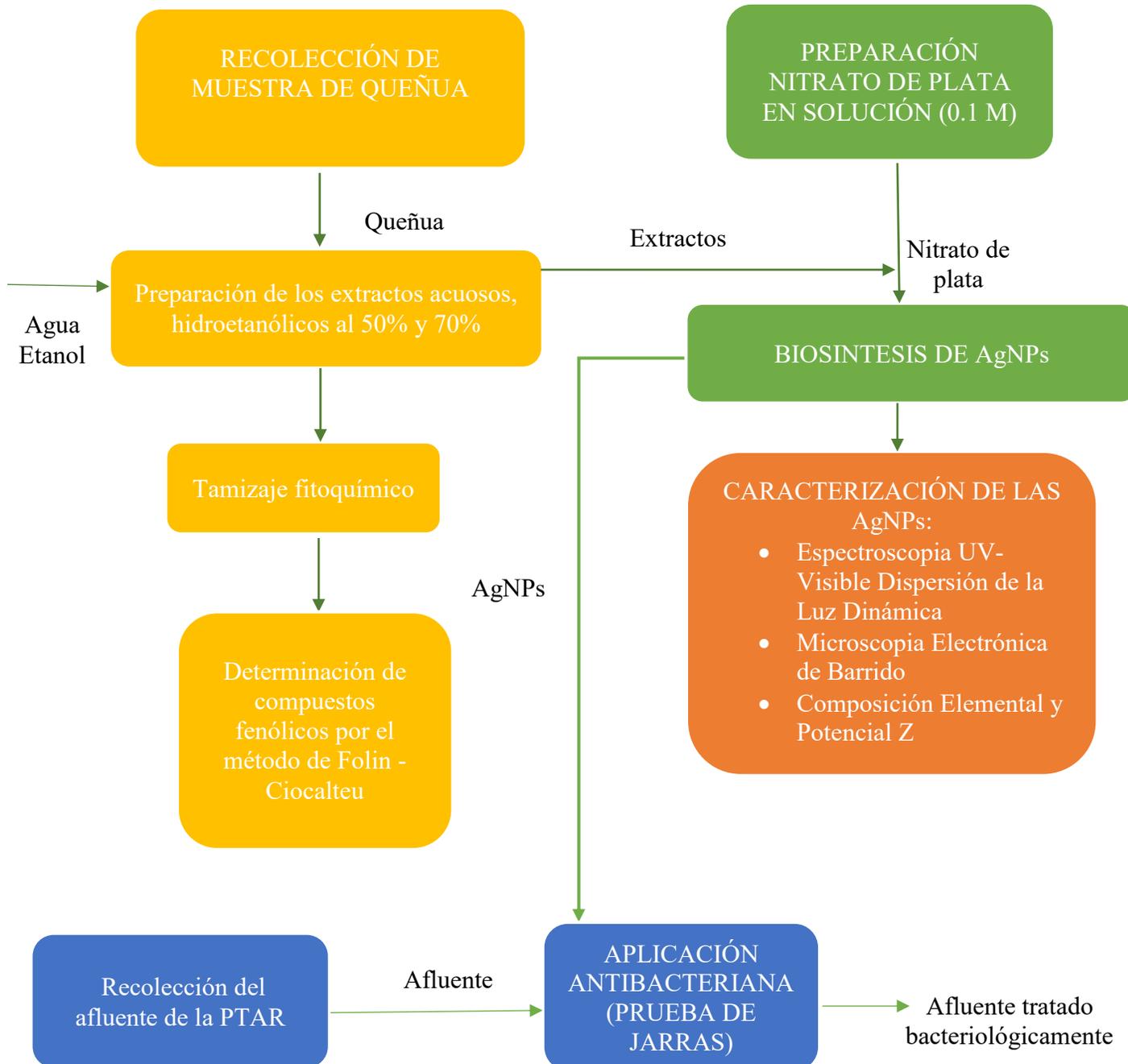
➤ Equipos e Instrumentos

- Agitador magnético con termómetro incorporado Heidolph MR Hei-Standard
- Balanza Analítica Eurotech FSF-A3304B
- pH metro HANNA HI 2215-02
- Espectrómetro UV-vis equipo THERMO EVOLUTION 3000
- Espectroscopia de rayos X
- Dispersión de luz dinámica equipo Zetasizer Nano ZS
- Microscopia electrónica de barrido equipo TESCAN MIRA 3
- Espectrómetro UV-vis equipo Génesis 20 Thermo Electrón
- Baño termostático equipo H.W. KESSEL
- Prueba de jarras
- Autoclave equipo Laboklav ECO 80

### **3.4. Métodos**

La presente investigación es de tipo aplicada, con un enfoque cuantitativo y un alcance explicativo.

En la Figura 3.1 se resume las etapas que comprendió la investigación que corresponde a los métodos desarrollados.

**Figura 3.1***Etapas de la investigación*

### 3.4.1. Recolección de muestra

El muestreo de Queñua se realizó en el distrito de Calca, donde se localizaron árboles de Queñua, la Tabla 3.1 especifica la ubicación geográfica del muestreo.

**Tabla 3.1**

*Ubicación geográfica del punto de muestra de Queñua*

<b>Región</b>	<b>Provincia</b>	<b>Distrito</b>	<b>Latitud y Longitud</b>
Cusco	Urubamba	Calca	13° 19' 0" Sur 71° 57' 14" Oeste

Se usó la técnica de muestreo aleatorio simple. Este tipo de muestreo es empleado en aquellos casos en que se dispone de poca información previa acerca de las características de la población a muestrear (Mostacedo y Fredericksen, 2000). El muestreo se realizó de la siguiente manera:

- Se identificó el área total del terreno, con presencia de árboles de *Polylepis racemosa Ruiz y Pav.* (Queñua).
- El área elegida se dividió en 4 lotes
- Se definió el punto de muestreo en cada lote del terreno.
- Se recolectaron aproximadamente 1 kg de muestra entre ramas y hojas de cada lote, las cuales se dispusieron en bolsas de papel para su traslado al laboratorio Herbario Vargas Cruz para su identificación taxonómica

### ***3.4.2. Preparación de los extractos de Queñua.***

Se usó tres tipos de extractos: acuosos e hidroetanólicos (50 %v/v y 70 %v/v), para evaluar el potencial de sus capacidades de solubilizar una amplia gama de compuestos bioactivos presentes en los diferentes tipos de extractos de la Queñua en la reducción de iones de plata y la obtención de AgNP.

Para la preparación de extractos hidroetanólicos y acuosos se tomó como referencia lo propuesto por Caceda (2012), las preparaciones se realizaron de la siguiente manera:

- Los solventes hidroetanólicos se prepararon a partir de etanol a 96° mezclados con agua destilada en % v/v al 50% y 70% respectivamente.
- Las hojas y tallos recolectados fueron lavados con agua de la red pública para después ser enjugadas con agua destilada y de esta manera retirar las impurezas.
- Seguidamente se dejaron secar a temperatura ambiente en un área fresca, seca y sin alcance de la luz para que no pueda haber alteración de los metabolitos secundarios presentes en las muestras.
- Las hojas y tallos limpios se cortaron en trozos pequeños con la ayuda de una tijera.
- Para 100 g de queñua, se utilizó 1000 ml de solvente, para obtener 10 %p/p de concentración de extracto.
- Una vez pesada la Queñua fue mezclada con solvente hidroetanólicos al 70%, 50% y acuoso correspondiente, seguidamente se envaso en botellas de color ámbar. En caso del solvente acuoso se calentó en un baño termostático a la temperatura de ebullición del agua en la ciudad del Cusco durante 40 minutos.
- Los extractos hidroetanólicos al 50% y 70% se dejaron en maceración durante 5 días.

- Se procedieron a filtrar en papel filtro para separar el sobrenadante y restos sólidos.
- Finalmente, los extractos fueron preservados en botellas ámbar, en un ambiente estéril y a 4 °C para evitar la posible oxidación de los compuestos orgánicos del extracto, como los fenoles, que son los compuestos de interés.

### 3.4.3. Tamizaje fitoquímico

En la Tabla 3.2 se describe el procedimiento del tamizaje fitoquímico.

**Tabla 3.2**

#### *Tamizaje fitoquímico*

<b>Metabolito</b>	<b>Reacción</b>	<b>Metodología</b>
<b>ALCALOIDES</b>	Dragendorff	Se añadió 3 gotas de Dragendorff a los extractos, si da una coloración naranja hay presencia de alcaloides.
<b>FLAVONOIDES</b>	NaOH	Se añadió 5 gotas de NaOH al 20% a los extractos, si hay precipitado blanco o de color crema hay presencia de flavonoides.
<b>TANINOS</b>	FeCl <sub>3</sub>	A 1 mL de extracto, se le añade 2 gotas de FeCl <sub>3</sub> , una coloración negra azulada o una coloración verde que es derivado de la catequina.
<b>SAPONINAS</b>	Espuma	A los extractos se le sometió a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de las saponinas es indicada por la formación de una espuma.

*Nota:* Adaptada de *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E. Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco)* por Ramos et al., 2016.

#### ***3.4.4. Determinación de los compuestos fenólicos totales del extracto***

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por el ensayo Folin Ciocalteu en el laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría de la UNSAAC.

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo reportado por Gutiérrez et al., (2008). El paso a seguir para preparar la curva de calibración fue:

- Se preparó la curva patrón con ácido gálico a partir de una solución madre de 100 ppm en un espectrómetro de ultravioleta-visible.
- Se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20% y una disolución 1N del reactivo de Folin Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial 2 N en agua destilada.
- A partir de la disolución 1N, se prepararon concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L y 5 mg/L para la construcción de la curva de calibración.
- Luego se adicionó a cada dilución, 250  $\mu$ L de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, seguidamente se adicionó 1.25 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada dilución, para llevarlo a un volumen final de 2 mL con agua destilada.
- Finalmente, se tomó lectura de la absorbancia a 765 nm en un espectrómetro ultravioleta-visible.

El modelo que representa la curva patrón fue el siguiente:

$$y = 0.0315(x)+0.0692; R=0.99; (3.1)$$

Donde:

y= concentración en mg ácido gálico (mg AG) /L

x = absorbancia a 765 nm

Los pasos a seguir para determinar el contenido de fenoles totales fueron los siguientes:

- Se pesó 2 mg de cada muestra de extracto en un matraz y se agregó 50 mL de agua destilada.
- Se tomó 0.5 mL de cada disolución, las cuales se mezclaron con 0.75 mL de reactivo de Folin Ciocalteu, para finalmente adicionar, 75 mL de carbonato de sodio al 20 %.
- La aparición del color azul oscuro, indicó la presencia de compuestos fenólicos en las muestras.
- Se dejaron reposar 90 min a temperatura ambiente.
- Las caracterizaciones de los compuestos fenólicos se realizaron a una absorbancia de 765 nm.

Para poder expresar los resultados en mg AG/g de Queñua, se usó la siguiente relación (García et al., 2015):

$$C = c_1 * \frac{V}{M}; (3.2)$$

Donde:

C: mg AG/g de Queñua

$c_1$ : mg AG/L de Extracto

V: volumen de la muestra

M: masa de la muestra

#### ***3.4.5. Preparación del agente precursor***

El agente precursor fue  $\text{AgNO}_3$  0.1M (Sharanappa et al., 2020), para ello se pesó 4.247 g de  $\text{AgNO}_3$  al 99.99% de pureza y fue disuelto en 250 mL de agua destilada.

#### ***3.4.6. Biosíntesis de las nanopartículas de plata***

La biosíntesis de nanopartículas de plata se realizó en el laboratorio de Fisicoquímica de la

Escuela Profesional de Química de la UNSAAC.

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas con los extractos preparados en una proporción de mezcla de 1:3. Se siguieron los siguientes pasos:

- En cada ensayo se midió 10 mL de extracto de Queñua utilizando una pipeta volumétrica y se transfirieron a un matraz de 250 mL. Luego, se añadieron 30 mL de  $\text{AgNO}_3$  0.1 M.
- A la solución formada se realizó la corrección de pH usando una solución de  $\text{NaOH}$  0.1 M.
- Cada matraz se sometió a agitación en una plancha magnética a 350 rpm durante 24 horas.
- Para el ensayo a  $60^\circ\text{C}$  se usó una plancha calefactora.
- Las soluciones una vez preparadas se guardaron en botellas ámbar cubiertas con papel aluminio.
- El mismo procedimiento se realizó para todos los ensayos.

### **Variables y parámetros**

- ✓ Variable dependiente:
  - Tamaño de las nanopartículas de plata
  - Eliminación de bacterias
- ✓ Variable independiente:
  - Cantidad de etanol en el extracto (%)
  - pH de la solución ( $\text{AgNO}_3$  + Extracto)
  - Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )
- ✓ Parámetros
  - Tiempo de agitación (h)

- Velocidad de agitación (rpm)

En la Tabla 3.3 se muestra la operacionalización de las variables:

**Tabla 3.3**

*Operalización de variables de la biosíntesis de nanopartículas de plata*

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Escala</b>	<b>Nivel</b>	<b>Unidad</b>
Cantidad de etanol en el extracto	Cuantitativa Discreta	Cantidad de solvente para poder extraer metabolitos secundarios entre ellos compuestos fenólicos, para la biosíntesis de nanopartículas de plata. Se mide con la ayuda del alcoholímetro.	Numérica	0% 50% 70%	%v/v
Temperatura	Cuantitativa Continua	Temperatura de reacción de la biosíntesis.	Numérica	20 60	°C
pH	Cuantitativa Continua	Potencial de Hidrógeno de la solución del extracto precursor	Numérica	7,10 y 12	
Tamaño de las nanopartículas de plata	Cuantitativa Continua	Dimensiones de las nanopartículas de plata, caracterizadas mediante	Numérica	1 – 100	nm

Eliminación de bacterias	Cuantitativa Continua	Dispersión de luz dinámica (DLS). Las bacterias indicadores de un tratamiento biológico eficiente son los coliformes totales y termotolerantes	Numérica	<1.8	Número más probable (NMP)
--------------------------	--------------------------	---	----------	------	---------------------------

Para determinar los niveles de las variables se realizaron pruebas preliminares considerando los valores que se indican en la Tabla 3.4

**Tabla 3.4**

*Variables independientes y niveles*

Variables independientes	Niveles		
	1	2	3
Cantidad de etanol en el extracto de (A)	0% <sup>(*)</sup>	50%	70%
pH de la solución (B)	7	10	12
Temperatura (C)	20 °C		60 °C

*Nota:* (\*) 0% de etanol en el extracto y a etanol a 50% y 70% como solventes para la preparación de los extractos.

En el caso de la variable temperatura, se seleccionaron dos niveles de investigación debido a consideraciones prácticas y objetivos de la investigación. Se optó por incluir un nivel bajo de 20 °C y un nivel alto de 60 °C, los cuales se consideran representativos y permiten evaluar de manera efectiva los efectos de la temperatura en la biosíntesis de nanopartículas

de plata. Esta elección se fundamenta en el impacto esperado de la temperatura en el proceso de síntesis y en la viabilidad experimental, ya que la realización de experimentos con más niveles de temperatura puede ser más compleja y costosa.

Para el desarrollo de los experimentos se planteó un diseño factorial de 3 factores y multinivel (3 niveles para A y B, 2 niveles para C); por tanto, se desarrollaron 18 experimentos, cuyo plan experimental se muestra en la Tabla 3.5

**Tabla 3.5**

*Plan experimental*

	A	B	C	Tamaño de AgNP
N°				
Experimento	C.E (%)	pH	T (°C)	Nm
1	70	12	20	
2	50	7	20	
3	70	10	60	
4	70	12	60	
5	50	12	20	
6	70	10	20	
7	50	7	60	
8	0	7	60	
9	0	12	20	
10	50	10	60	
11	0	7	20	
12	50	12	60	
13	70	7	60	
14	70	7	20	
15	0	10	60	
16	0	10	20	
17	50	10	20	
18	0	12	60	

### **Tamaño de las nanopartículas**

Los tamaños de las nanopartículas fueron caracterizados y medidos mediante las técnicas de espectrofotometría UV-visible y dispersión dinámica de luz.

#### ***Caracterización UV-visible***

Para la caracterización por espectrofotometría UV-visible se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de nanopartículas de plata aforado en 3 mL del solvente en una celda de vidrio, el cual fue sometido al espectrofotómetro obteniéndose diagramas de absorbancia (A) versus longitud de onda ( $\lambda$ ) y con picos característico, los cuales fueron analizados con ayuda del Software Origin 2022b. La biorreducción de plata en la solución de reacción se monitoreo tomando muestras periódicas de la mezcla de reacción en 4 tiempos durante el lapso de 1 mes con el fin de observar la estabilidad de las NPs.

#### ***Caracterización de tamaño hidrodinámico por DLS***

Para la medición de la distribución de tamaños hidrodinámicos de las nanopartículas de plata mediante la técnica de DLS, se tomó alícuotas de 3  $\mu\text{L}$  de la solución acuosa de nanopartículas de plata en una celda de cuarzo, el análisis fisicoquímico por DLS se realizó en las instalaciones de la empresa NEOTEC CIENTIFICA S.A. en la ciudad de Lima.

Con el fin de monitorear la estabilidad de los coloides de plata sintetizados, se midió la distribución de tamaño y la polidispersidad después de 11 semanas.

#### ***3.4.7. Diseño experimental***

El diseño experimental factorial multinivel, permitió la combinación de todas las variables independientes con todos los niveles, así como la evaluación de cómo estas condiciones afectan la biosíntesis de las nanopartículas de plata. Al contar con diferentes niveles para cada variable independiente, se pudo analizar su influencia individual y las interacciones entre ellas.

Considerando que en las experimentaciones con extractos hidroetanólicos al 70%, se evidenció que los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que se obtuvieron los mayores tamaños de AgNPs, lo cual conllevó a resultados inconsistentes o no replicables; por lo tanto, no se consideró el nivel superior para la variable cantidad de etanol en el extracto.

El diseño experimental final que comprende variables y niveles se muestra en la Tabla 3.6

**Tabla 3.6**

*Variables independientes y niveles finales*

Variables independientes	Niveles		
	1	2	3
Cantidad de etanol en el solvente (A)	0% <sup>(*)</sup>		50%
pH de la solución (B)	7	10	12
Temperatura (C)	20 °C		60 °C

*Nota:* (\*) 0% de etanol en el solvente para la preparación de los extractos.

Por tanto, el plan experimental final se resume en la Tabla 3.7

**Tabla 3.7***Plan experimental final*

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Tamaño de AgNP</b>
<b>N°</b>				
<b>Experimento</b>	<b>C.E (%)</b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Nm</b>
1	50	7	20	
2	50	12	20	
3	50	7	60	
4	0	7	60	
5	0	12	20	
6	50	10	60	
7	0	7	20	
8	50	12	60	
9	0	10	60	
10	0	10	20	
11	50	10	20	
12	0	12	60	

*Nota:* C.E, es la cantidad de etanol en el solvente

Se procedió al análisis de resultados para determinar los valores de las variables (cantidad de etanol en el extracto, pH de la solución y temperatura) a los cuales se lograron menores tamaño de nanopartícula.

El análisis estadístico usando el Software Statgraphics centurión 18-X64 (licencia adquirida de Software Shop en el 2022) consistió en:

- Determinar el efecto de las variables independientes sobre las variables dependientes.
- La significancia de las variables mediante la prueba ANOVA
- El modelo matemático que representa a las variables en estudio

Las hipótesis planteadas con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 para el experimento son:

Si:

$H_0$  = hipótesis nula (los factores experimentales en estudio no tienen influencia en la respuesta)

$P > 0.05$  se acepta.  $P < 0.05$  se rechaza

$H_a$  = hipótesis alterna (los factores experimentales en estudio tienen influencia en la respuesta)

$P < 0.05$  se acepta.  $P > 0.05$  se rechaza

De estas dos hipótesis se desea que la probabilidad explicada por el modelo sea mayor a la probabilidad no explicada; de este modo aceptar la hipótesis alternativa ( $H_a$ ), así como tener un valor  $p \leq \alpha$  para cada término del modelo.

#### ***3.4.8. Caracterización de las nanopartículas de plata***

La caracterización de las nanopartículas de menor tamaño y con mejores condiciones de operación, se encargó a la empresa HYPERION QUIMICA Y SERVICIOS E.I.R.L. en la ciudad de Huancayo; mediante las técnicas de Microscopía electrónica de barrido (SEM) para conocer la morfología de las nanopartículas y distribución de tamaños; espectroscopia por dispersión de electrones (EDS) que permitió determinar la composición elemental de la muestra y Potencial Z que determinó la carga superficial de las nanopartículas.

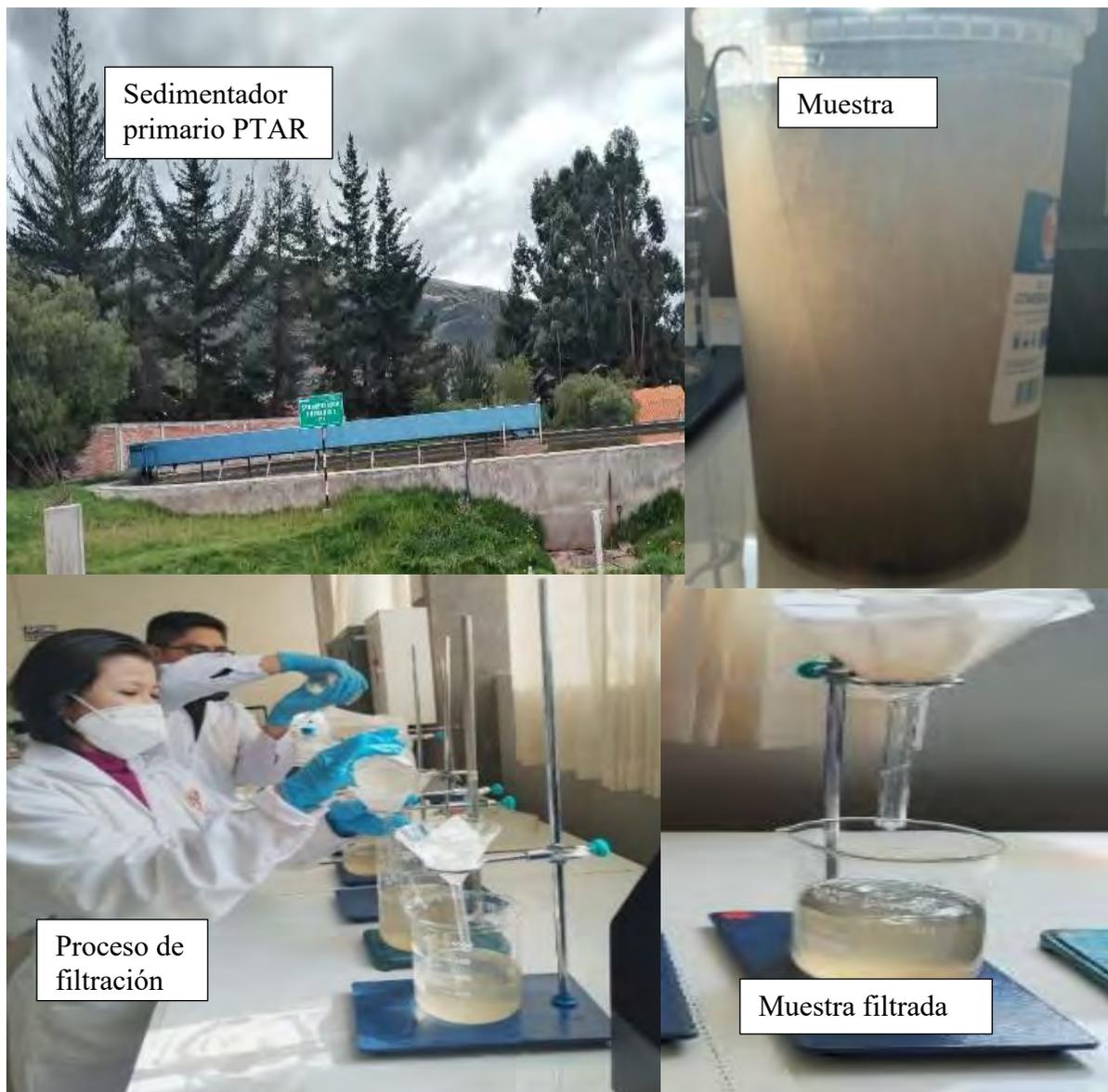
El análisis SEM se realizó a las 14 semanas de haber realizado la síntesis con el fin de analizar la estabilidad y la presencia morfológica estable de AgNPs.

#### ***3.4.9. Aplicación antibacteriana en el afluente de la PTAR***

Se tomó una muestra compuesta de 10 L del agua residual del sedimentador primario de la PTAR – Cusco, posteriormente se realizó la separación de los sólidos mediante filtración en papel filtro, como se puede observar en la Figura 3.2.

**Figura 3.2**

*Recolección de muestra del afluente de la PTAR y proceso de filtración*



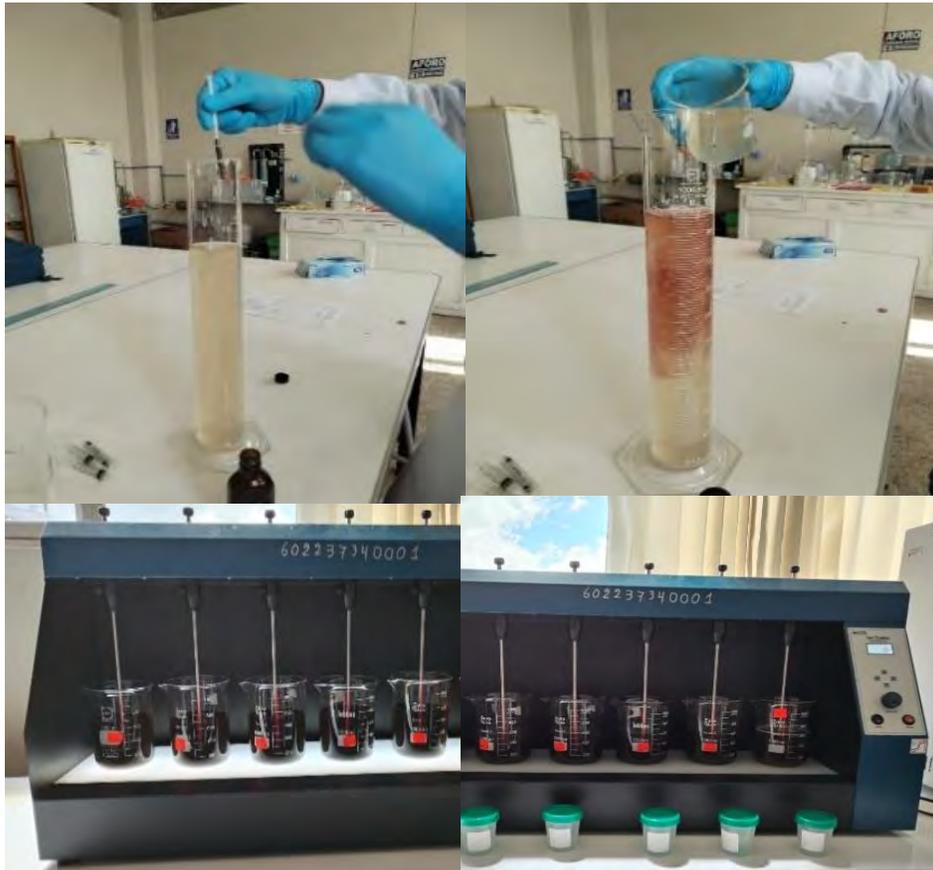
Para determinar la actividad antibacteriana se sometieron 500 mL de agua de muestra filtrada

con diferentes dosificaciones (50 mL, 70 mL, 90 mL, 110 mL, 130 mL) de AgNPs a una velocidad de agitación constante de 250 rpm durante 30 minutos y 20 minutos de reposo en un equipo de pruebas de jarras. En la Figura 3.3 se muestra la aplicación de las AgNPs en

las muestras de agua.

### Figura 3.3

*Aplicación de AgNPs en las muestras de agua filtrada*

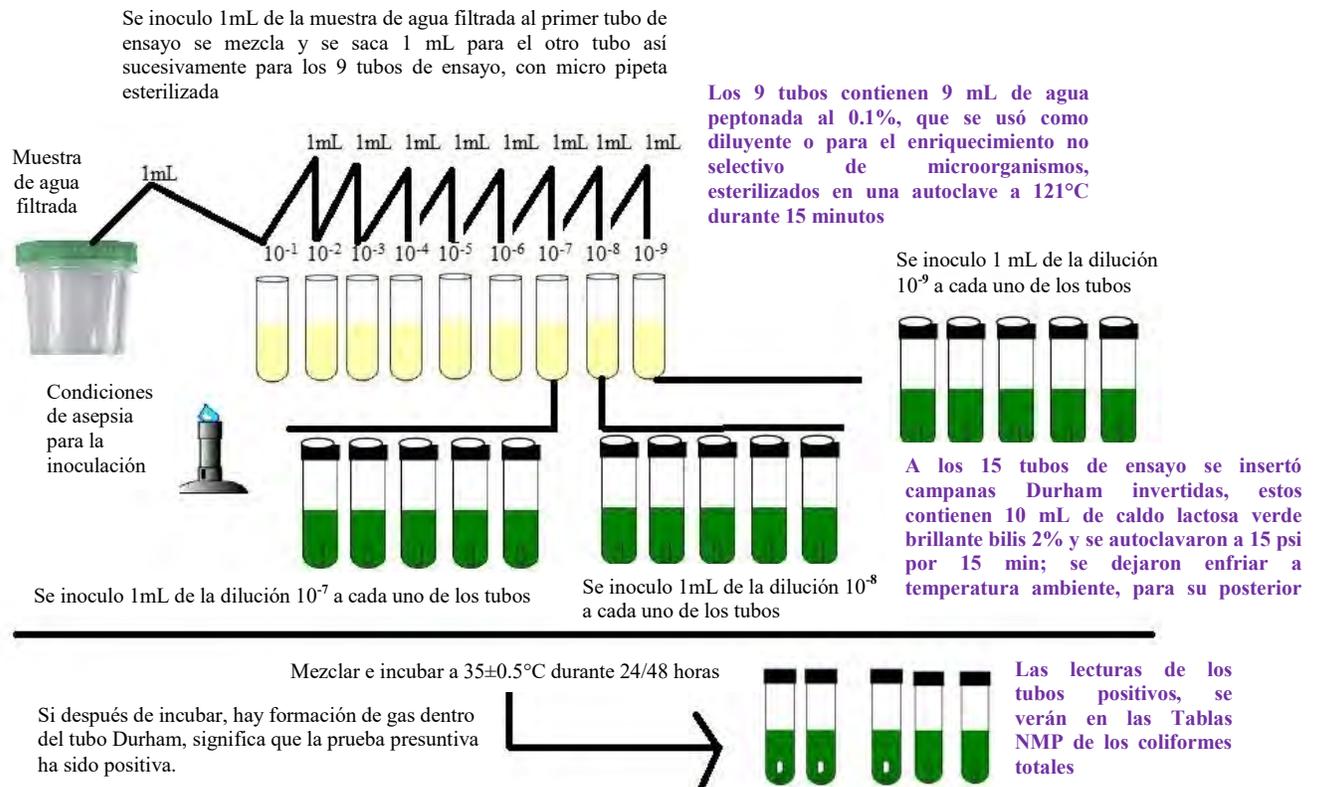


Se realizó el análisis de los ensayos, con la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable o NMP) para determinar los coliformes totales y termotolerantes de la muestra filtrada inicial y las que tienen dosificación. Se realizaron los ensayos microbiológicos en laboratorio de aguas de la Facultad de Biología de la UNSAAC.

En la Figura 3.4, 3.5 y 3.6 se observan los procedimientos para la determinación de coliformes totales de la muestra de agua filtrada, muestra de agua filtrada con dosificación de AgNPs y determinación de los coliformes termotolerantes respectivamente.

Figura 3.4

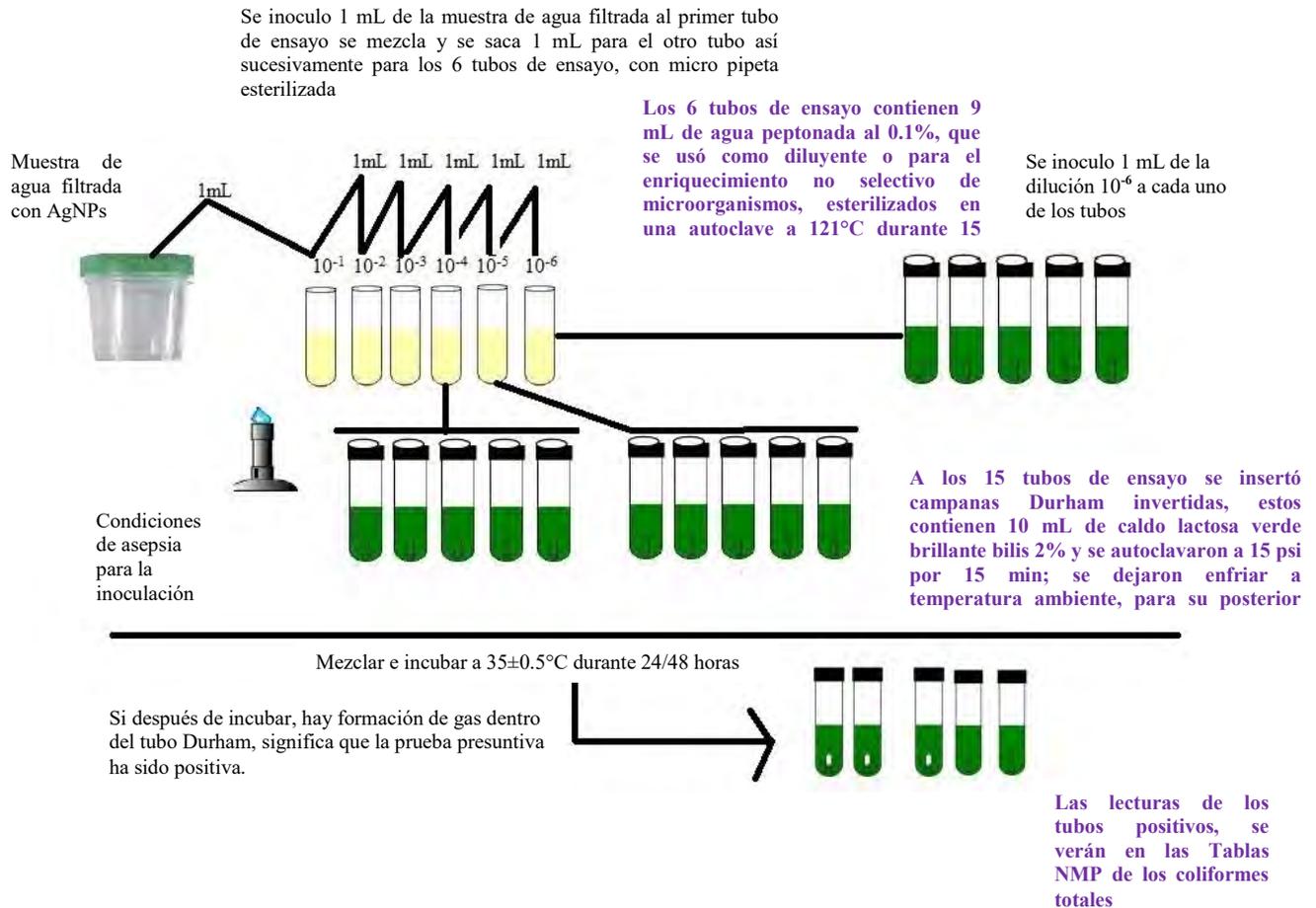
*Procedimiento para la determinación de coliformes totales para la muestra filtrada*



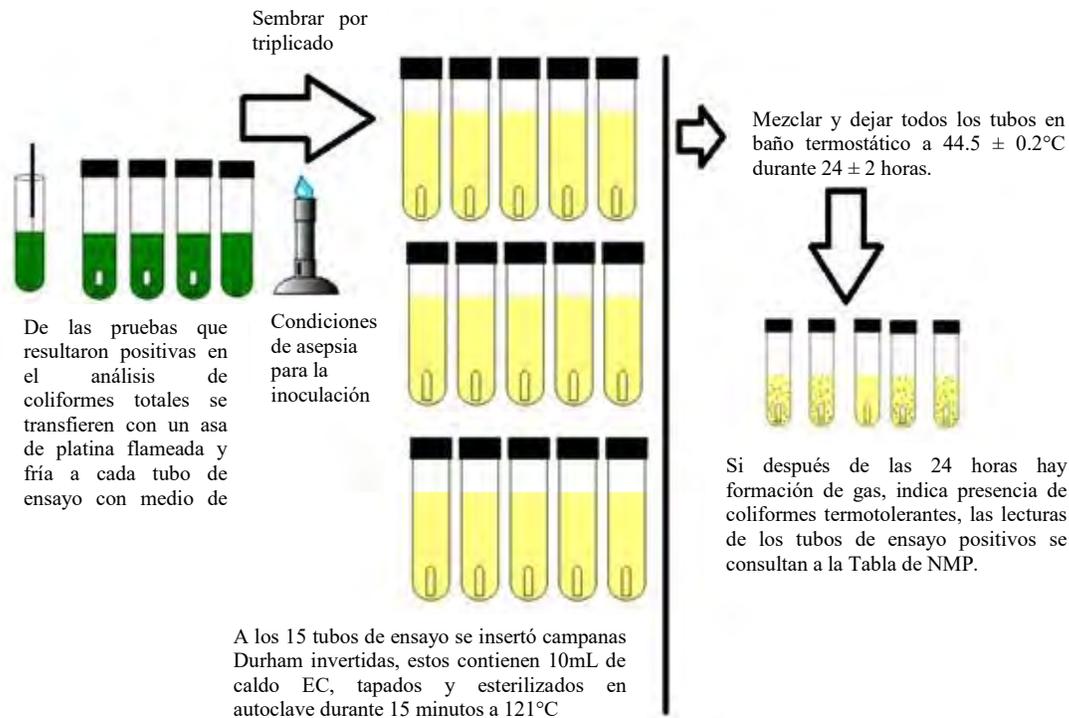
*Nota:* El ensayo de muestra de agua filtrada sin aplicación de AgNPs tiene alta carga bacteriológica y fue necesario realizar más diluciones para obtener una mejor concentración para el análisis

**Figura 3.5**

*Procedimiento para la determinación de coliformes totales para la muestra filtrada con dosificación de AgNPs*



*Nota:* Se utilizó como medio de cultivo Verde Brillante – Bilis - Lactosa diluido en agua destilada, en una relación de 40 g en 1 L de agua destilada, también agua peptonada en una relación de 15 g diluido en 1 L de agua destilada: después se calentó hasta llegar a la ebullición durante 1 minuto. Adaptado de *Métodos Normalizados para el Análisis de aguas Potables y Residuales* por APHA-AWWA-WPCF, Díaz de Santos, SA.

**Figura 3.6***Procedimiento para la determinación de coliformes termotolerantes*

*Nota:* Para obtener el medio de cultivo EC (*Escherichia coli.*) se pesó 37 g y se diluyó en 1 L de agua destilada, se dejó reposar 5 minutos para luego calentarlo con agitación frecuente y llevar a ebullición para su total disolución (Adaptado de *Métodos Normalizados para el Análisis de aguas Potables y Residuales* por APHA-AWWA-WPCF, Díaz de Santos, SA.)

Los resultados de los coliformes totales y termotolerantes fueron comparados antes y después de la aplicación de nanopartículas de plata biosintetizadas con extracto de Queñua para determinar el porcentaje de eliminación bacteriana.

Para poder determinar el porcentaje de eliminación de bacterias se usó la ecuación 3.3.

$$\% \text{ de eliminación de bacterias} = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100; (3.3)$$

Donde:

$m_i$  = coliformes totales en la muestra de agua filtrada

$m_f$  = coliformes totales en la muestra de agua filtrada con dosificación de AgNPs

En la Tabla 3.8 se detalla los ensayos de la aplicación antibacteriana

**Tabla 3.8**

*Plan experimental de la actividad antibacteriana para 500 ml de agua filtrada de la PTAR*

<b>Ensayo</b>	<b>Dosificación de AgNPs (mL)</b>	<b>NMP coliformes totales /100 mL</b>	<b>NMP coliformes termotolerantes /100 mL</b>	<b>% de eliminación de bacterias</b>
1	-			
2	50			
3	70			
4	90			
5	110			
6	130			

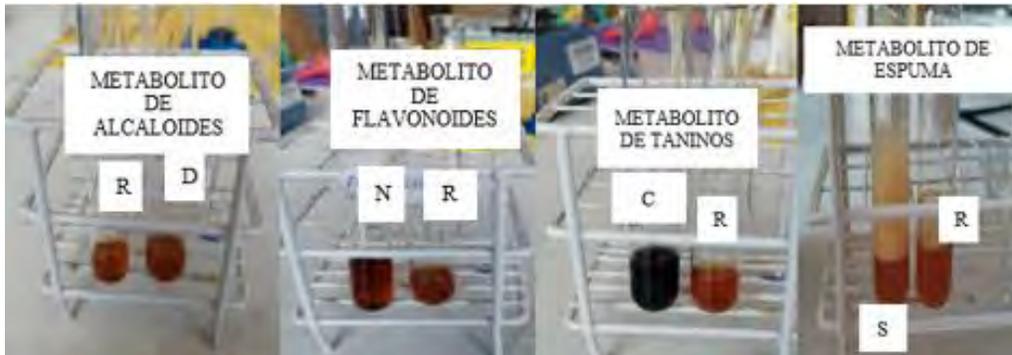
# **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestran en las Figuras 4.1, 4.2 y Tabla 4.1

**Figura 4.1**

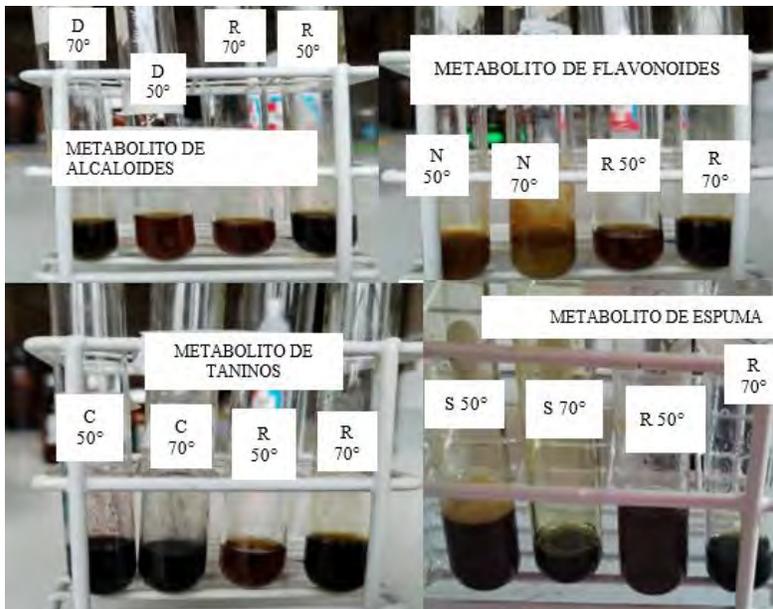
*Reacciones del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de Queñua*



*Nota:* Donde, R: extracto acuoso, D: identificación con Dragendorff en extracto acuoso, N: identificación con NaOH en el extracto acuoso, C: identificación con FeCl<sub>3</sub> y S: identificación con espuma.

**Figura 4.2**

*Reacciones del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroetanólicos a 50% y 70%*



*Nota:* R50°: extracto hidroetanólico a 50%; R70°: extracto hidroetanólicos a 70%; D: identificación con Dragendorff; N: identificación con NaOH; S: identificación con espuma; C: identificación con FeCl<sub>3</sub>.

En la Tabla 4.1 se observará los resultados del tamizaje fitoquímico para los tres extractos.

**Tabla 4.1**

*Resultados cualitativos del tamizaje fitoquímico*

<b>Metabolito</b>	<b>Reacción</b>	<b>Extracto hidroetanólico a 50%</b>	<b>Extracto hidroetanólico a 70%</b>	<b>Extracto acuoso</b>
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	-	-	-
<b>Flavonoides</b>	NaOH	++	+++	+
<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>	++	+++	+++
<b>Saponinas</b>	Espuma	+	-	+++

*Nota:* Interpretación, + presencia escasa, ++ presencia relativamente abundante, +++ presencia abundante, - no detectado.

En la Tabla 4.1 se puede observar que los extractos hidroetanólicos de 50%, 70% y extracto acuoso no presentan alcaloides al no reaccionar con el reactivo de Dragendorff, lo cual indicaría según Pucurimay (2018), que los extractos no contienen características de toxicidad, analgésicas ni alucinógenas. En la prueba de reacción de los metabolitos de flavonoides se observó que hay mayor presencia en el extracto hidroetanólicos a 70% seguidamente del extracto hidroetanólicos a 50% y por último el extracto acuoso; este metabolito tiene propiedades antioxidantes, efectos antiinflamatorios, antivirales, antimicrobianos y antifúngicas. También en la tesis que realizó Abregu (2021), indica que los flavonoides tienen una fuerte actividad antioxidante, gracias a su bajo potencial de oxidación lo que les otorga una buena capacidad para estabilizar radicales libres donando

electrones o átomos de hidrógeno.

En el metabolito taninos se observó que hay mayor presencia en el extracto acuoso e hidroetanólicos a 70% y en menor cantidad en el extracto hidroetanólicos a 50%, esto por el viraje de color a negro azulado indicando la presencia de taninos pertenecientes a los derivados del ácido pirogálico, tal como indica Flórez (2022); quien también menciona que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes.

Se ve también la ausencia de saponinas en los extractos hidroetanólicos, sin embargo, se observó la presencia abundante en el extracto acuoso. Según Mena et al., (2015), las saponinas son las que presentan acción de protección frente a agentes externos y también posee un efecto antioxidante.

Los resultados obtenidos coinciden con la investigación realizada por Cubas y Huaman (2018), quienes realizaron el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico a 96% de las hojas de Queñua, evidenciando gran cantidad de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, y en pequeñas cantidades de triterpenos y esteroides.

En la investigación de Esquivel y Mas (2021), se evaluaron los fitoconstituyentes de la especie *Trichoderma ss.*, ellos resaltan que esta especie posee bioactivos tales como, alcaloides, flavonoides, esteroides, proteínas, saponinas y glicósidos a los cuales les atribuyen la capacidad de reducir los metales. Los metabolitos antes descritos son también fitoconstituyentes de la Queñua, lo cual explica que la planta utilizada tiene la capacidad de reducir los cationes de plata para formar las AgNPs.

Se pudo evidenciar que preparar el extracto de Queñua con diferentes solventes de diferente polaridad afectan la extracción de metabolitos, también se corroboró que los diferentes extractos tienen los compuestos fitoquímicos necesarios para cumplir la función como agente reductor. Cabe mencionar que los metabolitos extraídos expuestos en la Tabla 4.1

permanecen intactos después de dos meses de mantener los 3 extractos en refrigeración a 4°C.

La certificación de la determinación taxonómica de la Queñua se adjunta en el Anexo A.

#### 4.2. Determinación de compuestos fenólicos totales del extracto de Queñua

Los resultados de la determinación se muestran en la Tabla 4.2:

**Tabla 4.2**

*Determinación de compuestos fenólicos*

Extracto de Queñua	R1	R2	R3	Equivalentes de AG mg/mL de extracto	Equivalentes de AG mg/g de Queñua
Acuoso	10.98	11.09	11.15	11.07	55.38
Hidroetanólico 50%	19.09	19.21	19.04	19.11	95.58
Hidroetanólico 70%	19.66	19.61	19.49	19.59	97.96

*Nota:* R: repetición, AG: ácido gálico

Las pruebas fitoquímicas preliminares revelaron que los extractos hidroetanólico son los que más metabolitos secundarios presenta en comparación con el extracto acuoso. Así mismo, en la prueba de determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu corrobora esta afirmación. Los extractos hidroetanólicos de 50% y 70% presentaron mayores concentraciones y en menor concentración el extracto acuoso. Cubas y Huaman (2018) reportan una cantidad de 1.44 mg AG/ g Queñua, quienes realizaron una extracción con etanol de 96%, Ticllacuri y Travezaño (2019) presentaron análisis de compuestos fenólicos en los extractos acuosas con restos de café igual 1.27 mg AG/ g; ambos realizaron una extracción acuosa a 60°C por una hora con agitación constante.

Estas diferencias pueden explicarse tal como menciona Ranko (2014) por las circunstancias climáticas, la época del año en la que se recolectó el material, las características del suelo como: pH, cantidad de nutrientes o incluso a factores genotípicos que juegan un rol importante en la producción de algunos tipos de fenoles como antocianinas y flavonoides.

La diferencia también podría explicarse debido a la cantidad de proporción de mezcla entre solventes y solutos para realizar las extracciones de estos compuestos fenólicos, así como también las condiciones físicas (temperatura). En caso del extracto acuoso obtenido a temperatura de ebullición durante 40 minutos, la temperatura fue el factor influyente para una buena extracción de compuestos fenólicos. Teniendo similitud a la investigación realizada por Muñoz et al., (2015), quienes enfatizan que la cantidad de compuestos fenólicos extraídos es proporcional al aumento de la temperatura.

También Pérez (2013), menciona que la polaridad de los solventes acuosos y los hidroetanólicos tienen influencia en el proceso, ya que existen compuestos fenólicos complejos como los flavonoides que presentan grupos hidroxilos los cuales son considerados polares, por lo que son más solubles en etanol y agua, pero también menciona que los compuestos fenólicos del tipo flavonoide glicósidos y agliconas son más polares y aumentan su solubilidad en soluciones alcohólicas acuosas.

En este sentido, el haber obtenido mayores concentraciones de fenoles con las mezclas etanólicas de 50% y 70% se podría confirmar que hay compuestos fenólicos que son más solubles en esta mezcla debido a la polaridad que presentan estos extractos, sin embargo en los disolventes puros tal como indica Muñoz et al., (2015), la solubilidad en agua y alcohol de los compuestos fenólicos, generalmente es mayor para los compuestos difenoles y polifenoles, por lo cual también se evidencia que este tipo de compuestos están presentes en los extractos acuosos e hidroetanólicos de Queñua.

Se resalta que la relación masa de planta/concentración de solvente utilizado, tiene significancia en la extracción de fenoles ya que se obtienen diferentes concentraciones de compuestos fenólicos, habiendo una diferencia de 77% al usar como solvente una mezcla acuosa a una mezcla hidroetanólica de 70%.

El contenido de estos fenoles en los extractos preparados está directamente relacionado con la actividad antioxidante y reductora como menciona Shahidi y Ambigaipalan (2015), ya que estos poseen propiedades redox, y actúan como agentes reductores, donadores de hidrógeno. Siendo los principales compuestos que actúan para reducir la sal de plata a plata elemental.

La certificación de la determinación de compuestos fenólicos totales se adjunta en el Anexo B.

### **4.3. Biosíntesis de las nanopartículas de plata**

En la Tabla 4.3 se observa los resultados de la biosíntesis de la nanopartícula de plata.

**Tabla 4.3***Resultados de la biosíntesis de nanopartículas de plata*

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Tamaño de AgNP</b>
<b>N°</b>				
<b>Experimento</b>	<b>C.E (%)</b>	<b>Ph</b>	<b>T (°C)</b>	<b>nm</b>
1	70	12	20	124.30
2	50	7	20	49.82
3	70	10	60	69.34
4	70	12	60	136.5
5	50	12	20	84.54
6	70	10	20	83.78
7	50	7	60	220.70
8	0	7	60	111.20
9	0	12	20	147.60
10	50	10	60	62.70
11	0	7	20	178.50
12	50	12	60	268.40
13	70	7	60	2000.00
14	70	7	20	81.30
15	0	10	60	52.44
16	0	10	20	58.68
17	50	10	20	34.77
18	0	12	60	48.89

De los 18 ensayos de AgNPs sintetizadas, siguiendo la metodología reportada, se pudo observar que las muestras cambiaron su apariencia visual poco después de la adición del extracto de la planta a la solución de  $\text{AgNO}_3$ , las mezclas de reacción (extracto +  $\text{AgNO}_3$ ) eran soluciones ligeramente mostaza con los siguientes pH's expuestos en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4***pH inicial de los 3 tipos de extractos*

<b>Tipos de extractos</b>	<b>Ph</b>
Acuoso (0%)	4.74
Hidroetanólico de 50%	5.32
Hidroetanólico de 70%	5.35

Al mezclar el extracto con la sal de plata los pH's de las soluciones variaron a los valores expuestos en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5***pH de los 3 extractos mezclados con  $AgNO_3$* 

<b>Tipo de extracto + <math>AgNO_3</math></b>	<b>Ph</b>
Acuoso (0%)	4.59
Hidroetanólico de 50%	4.76
Hidroetanólico de 70%	4.81

A medida que se procedía a realizar la corrección del pH las mezclas de reacción se volvieron marrones oscuros de forma inmediata. En la siguiente Figura 4.3 se puede observar que al añadir NaOH aparece el color marrón oscuro en la mezcla de reacción.

**Figura 4.3**

*Mezcla de reacción*

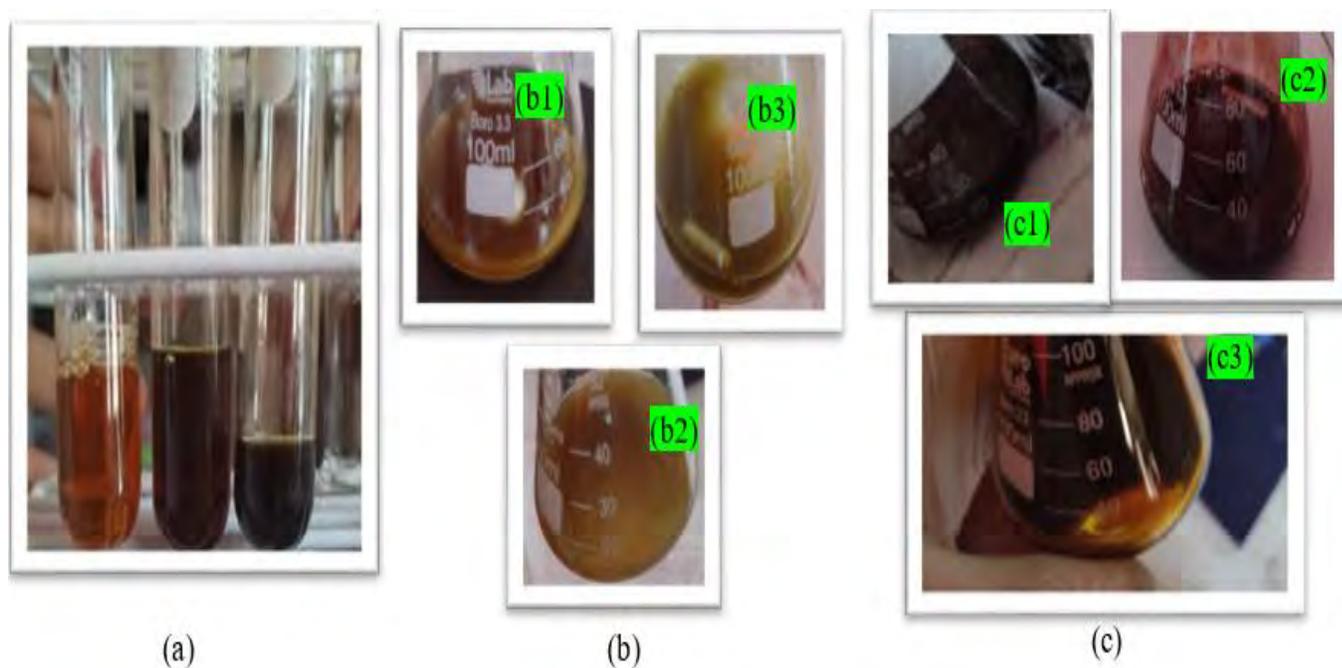


En la Figura 4.3 la coloración indicó que había formación de nanopartículas de plata; tal como indica Rodríguez et al., (2013), quienes mencionan que este cambio de color se debe a la fuerte absorción de la luz visible debido a la excitación de los plasmones de la superficie de las nanopartículas. Cumbal et al., (2017), indica que existe una reducción de los iones de  $\text{Ag}^+$  para formar los átomos de  $\text{Ag}^0$ , los cuales se aglomeran en clústeres para conformar las AgNPs.

En la Figura 4.4 se observa el mismo cambio de coloración de las soluciones de reacción en los 18 experimentos realizados

#### Figura 4.4

*Cambio de coloración de las soluciones de reacción*



*Nota:* Donde, (a) se observa el color característico del extracto acuoso, hidroetanólicos de 50% y 70%, en la Figura (b) se aprecia la mezcla de reacción de  $\text{AgNO}_3$  0.1 M y extracto, donde: b1: extracto acuoso, b2: extracto hidroetanólicos 50% y b3: extracto hidroetanólicos 70%, finalmente en la Figura (c) se observa el color marrón oscuro característico de la formación de AgNPs, donde: c1 pH :7, c2 pH: 9, c3 pH: 10.

En el proceso de síntesis realizado en la presente investigación hubo un cambio de coloración muy precipitada lo cual indica que hubo una reacción de reducción espontánea al agregar el NaOH, esto a diferencia de la biosíntesis que realizó Pardo et al., (2022), con extracto acuoso de hojas de Romero a una temperatura de 65 °C y a un pH de 10, quienes reportaron que obtuvieron mejores longitudes de onda al tercer día donde recién las soluciones se tornaron de color amarillo a marrón oscuro. Del mismo modo Cardeño y

Londoño (2014), usaron extracto de ajo como agente reductor, el cual fue obtenido mediante un proceso de hervido y posteriormente le agregaron solución de  $\text{AgNO}_3$  a una temperatura de  $50\text{ }^\circ\text{C} - 60\text{ }^\circ\text{C}$ , mediante este método observaron la reducción de iones de plata en un tiempo de 30 minutos mediante el cambio de color característico.

Se evidencio que la preparación del extracto al realizarse con los tallos y hojas de la planta, afectaron de manera directa en la síntesis debido a su contenido fitoquímico que contiene grupos hidroxilo, carboxilo, fenólicos y metabolitos que podrían estar involucrados en la síntesis de nanopartículas. Los resultados obtenidos en la síntesis coinciden con Rodríguez et al., (2013), quienes en su trabajo prepararon extractos con hojas y tallos de *Rumex hymenosepalus* Torr, el cual contenía polifenoles, e indican que los mismos mecanismos moleculares que otorgan propiedades antioxidantes a estas moléculas promueven la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  donde el mecanismo principal es la extracción de hidrógeno debido a los grupos  $\text{OH}^-$  en las moléculas de polifenol.

Esta diferencia de cambio de color en las diferentes investigaciones se puede deber como manifiesta Urnukhsaikhan et al., (2021), que al realizar extractos con las diferentes partes de las plantas afectan de manera diferente en la síntesis de nanopartículas de plata, teniendo una mejor formación de AgNPs usando como agente reductor toda la planta obteniendo un color más oscuro en comparación al usar solo el tallo y la flor.

En la evaluación del pH como variable de estudio, observamos que el pH tiene un alto impacto importante en la síntesis de AgNPs, al incrementarse este hacia valores de pH alcalino se muestran picos de longitud de onda más característicos de las AgNPs tipo esféricas alrededor de los 420 nm (Singh et al., 2015). También se puede indicar que al aumentar el pH de las mezclas de reacción se observaron valores de absorbancia más altos,

lo cual indicaría según Martínez et al., (2021), un aumento en la concentración de nanopartícula.

Al analizar el efecto de la temperatura en los espectros UV-visible se observaron que a picos de absorbancia altos y longitudes de onda bajos, el tamaño de las AgNPs sintetizadas disminuye con el aumento de la temperatura, lo que probablemente se podría deber a que, a una alta temperatura, las energías cinéticas de las moléculas aumentan y los iones de plata se consumen más rápido, lo que deja menos posibilidades de crecimiento de las partículas. A si mismo Sánchez (2017), indica que la temperatura ejerce una influencia importante en el control del tamaño de las AgNPs, afectando a la etapa de nucleación siendo está mucho más rápida a altas temperaturas generando una gran cantidad de núcleos de crecimientos de  $\text{Ag}^0$  (nanoclusters) permitiendo que la etapa de crecimiento de las NPs transcurra de manera homogénea dando lugar a partículas de tamaño similar.

Sin embargo, las AgNPs sintetizadas a 60 °C en su evolución de estabilidad en el tiempo se pudo observar un corrimiento a longitudes de onda mayores, lo cual indicaría un aumento en el tamaño de las AgNPs. Este fenómeno se podría deberse según Jiang (2011) que al aumentar proporcionalmente la temperatura se refleja un crecimiento más rápido de las NPs mediante un mecanismo de fusión lo que implicaría una agregación sin control durante el crecimiento mediante la unión entre dos o más nanopartículas. A sí mismo en su trabajo de investigación para seguir la formación y el crecimiento con el tiempo efecto de la temperatura al elevar de 17°C a 55°C, se comprobó que el tamaño de partícula aumenta con el tiempo de 25 nm a 48 nm para el diámetro de NPs esféricas. No obstante, el efecto de la temperatura sobre el aumento del tamaño de las nanopartículas fue significativo bajo las condiciones reportadas lo cual se pudo corroborar en el análisis de DLS.

La Figura 4.5 muestra los 18 ensayos después de las 24 h de agitación. La falta de

semejanza en las tasas de bioreducción con otras investigaciones analizadas, puede deberse a que se utilizan extractos de diferentes partes de las especies vegetales como agentes reductores y estabilizantes. Por lo que, el presente estudio también aporta con la identificación de nuevas especies vegetales para la síntesis de nanopartículas de plata.

#### Figura 4.5

*Los 18 ensayos después de las 24 horas de agitación*



En la Figura 4.6 y Tabla 4.5 se muestra la relación entre la absorbancia y la longitud de onda máximas que muestran bandas de absorción de superficies de plasmón superficial (SPR).

En la siguiente Tabla 4.6 se observa a detalle los picos de SPR de cada ensayo en las diferentes fechas de análisis usando el software VISION pro.

**Tabla 4.6**

*Lectura del espectrofotómetro UV-visible /AgNPs con extracto acuoso*

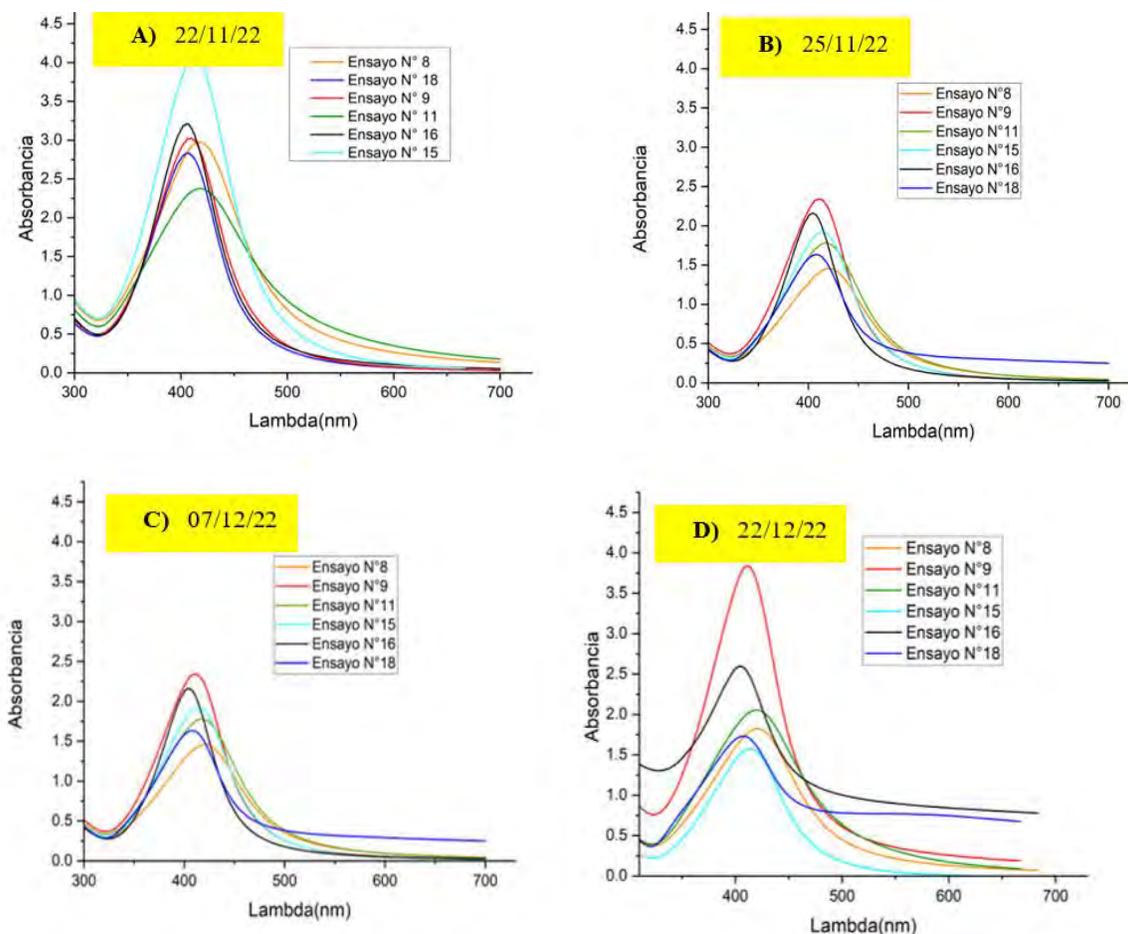
Ensayo N°	pH	T (°C)	Fecha :22/11/22		Fecha :25/11/22		Fecha :07/12/22		Fecha :22/12/22	
			Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)
8	7	60	2.97	416	2.68	420	1.45	421	1.82	421
9	12	20	3.02	410	2.94	410	2.34	411	3.88	411
11	7	20	2.37	417	2.19	416	1.77	417	2.05	419
15	10	60	4.12	413	3.49	415	1.91	414	1.57	415
16	10	20	3.21	405	2.89	405	2.15	405	2.59	405
18	12	60	2.83	406	2.31	407	1.63	408	1.73	408

Se observó mediante los resultados del espectrofotómetro que hay formación de AgNPs con formas esféricas y en concentraciones altas de acuerdo a sus aspectos visuales y la relación con sus absorbancias en el rango de 400 a 470 nm; estos resultados concuerdan con lo reportado por Pardo et al., (2022), quienes mencionan que los mejores picos encontrados en las soluciones preparadas de NPs están entre las longitudes de onda mencionadas, las cuales están relacionados con nanopartículas de plata de forma esférica con diámetros en el orden 1 nm - 50 nm.

En la Figura 4.6 se observan cuatro diagramas UV-visible/ AgNPs con extracto acuoso en diferentes fechas usando el software Origin 2022b.

**Figura 4.6**

*Lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto acuoso en diferentes fechas*



En la primera lectura del espectro se visualiza la influencia de la temperatura de reacción en la muestra de los ensayos 15 (pH: 10, T:60 °C) y 8 (pH: 7, T:60 °C), en los cuales se aprecia

los máximos picos de absorbancia que son atribuidos a una mayor concentración de AgNPs; esto coincide con Jiang (2011), quien en su investigación menciona que a mayores temperaturas la velocidad de reacción también se incrementa, lo cual provoca un crecimiento más rápido de NPs, esto debido a que aumenta la energía cinética de las moléculas que reaccionaron, esto indica que más iones de  $\text{Ag}^+$  colisionaron con moléculas reductoras del extracto acuoso.

En los ensayos 15 (pH: 10, T:60 °C), 16 (pH: 10, T:20 °C), 9 (pH:12, T:20 °C) y 18 (pH: 12, T: 60 °C) que se sintetizaron con pH alcalino, también se observó que poseen absorbancias altas, esto sugiere una reducción eficiente de los  $\text{Ag}^+$  en presencia de iones de hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), lo que es similar a los hallazgos reportados por Riaz et al., (2021). Estos autores encontraron que un pH mayor de 10 y una temperatura de 60 °C de síntesis, los espectros de absorbancia presentaron un solo pico en forma de campana definida y simétrica, de lo cual indican la formación de AgNPs de forma esférica regular y monodispersas.

Posteriormente, se observó en la investigación presente, que en el transcurso del tiempo ocurrió un corrimiento a longitudes de onda mayores del ensayo 8 (pH:7, T:60 °C) y 11 (pH: 7, T:20 °C), por consiguiente, representa que las nanopartículas sintetizadas a esas condiciones tuvieron un aumento de tamaño y pasarían de ser monodispersas a polidispersas siendo estas dos muestras unas de las que sufrieron mayores cambios en su dispersión y tamaño.

En los ensayos 8 (pH:7, T:60 °C), 11(pH: 7, T:20 °C) y 15(pH: 10, T:60 °C) se observó una mayor longitud de onda junto a un mayor ensanchamiento visual de los picos, lo que sugiere la formación de AgNPs de diferentes tamaños. Esto contrasta con lo reportado en la investigación realizada por Vera y Cornejo (2018), quienes registraron espectros UV-visible en diferentes intervalos de tiempos de reacción con picos de longitud onda alrededor de 420 nm con un amplio ancho de pico. Sus resultados indicaron la formación de AgNPs estables con características de polidispersidad de tamaños. Cruz et al., (2012), también mencionan que las nanopartículas más grandes provocan un corrimiento a mayores longitudes de onda, junto con un ensanchamiento de la misma. Esto debido a que, en el

interior de la partícula, el campo eléctrico ya no es constante, habiendo una disminución en la densidad de carga en la superficie de la partícula.

Posteriormente, durante el transcurso del tiempo, se observa en los gráficos la evolución UV-visible de las AgNPs. En el ensayo 8 (pH:7, T:60 °C) y 11 (pH: 7, T:20 °C), se produjo un corrimiento a longitudes de onda mayores, lo que indica que las nanopartículas sintetizadas bajo esas condiciones experimentales aumentaron de tamaño. Esto implica que estas muestras sufrieron mayores cambios en su dispersión y tamaño y pasaron de ser monodispersas a polidispersas.

Se evidenció que el ensayo 18 (pH:12, T:60 °C) presentó un ensanchamiento en sus picos, así como la formación de un hombro, lo que podría sugerir una interacción entre nanopartículas y una polidispersidad con una amplia distribución de tamaño. Estos resultados coinciden con la investigación de Requejo Roque (2014) , quien también reportó la aparición de un hombro en las muestras de AgNPs, lo que indicaba la presencia de una polidispersidad en la distribución de tamaño. Además Guzman et al., (2015), reportó la formación de AgNPs de forma triangular con un segundo pico a una longitud de onda mayor a 500 nm, lo que sugiere que estas se formarían a partir de una transformación de los núcleos esféricos. Esto evidenciaría la posible formación de nanopartículas triangulares a estas condiciones.

En las mediciones en diferentes tiempos se observó que el ensayo 9 (pH: 12, T:20 °C), es uno de los que no sufrió mucha variación visual de la forma y simetría de su campana, pero sin embargo hay un ensanchamiento del pico; así mismo la evolución de su longitud de onda en el tiempo se mantuvo constante; lo cual es indicativo que hay presencia de nanopartículas esféricas monodispersas con una distribución homogénea de tamaños.

Los ensayos 15 (pH: 10, T:60 °C) y 18 (pH:12, T:60 °C) presentaron una disminución en

sus anchos de pico, mientras que en los ensayos 16 (pH: 10, T:20 °C), y 18 (pH:12, T:60 °C) se registraron las menores longitudes de onda; estos resultados señalan que las muestras de estos ensayos presentan menores tamaño en dispersión de nanopartículas. Según el estudio realizado por Khan et al., (2013), mencionan que los coloides de plata que se comercializan, tienen picos de longitud de onda que oscilan entre los 395 nm a 404 nm con un tamaño promedio de 10 nm y 20 nm respectivamente. Por lo tanto, se podría inferir que las muestras de los ensayos 16 (pH: 10, T:20 °C), y 18 (pH:12, T:60 °C) presentan estas características.

En la evaluación de estabilidad se observa que, en la mayoría de experimentaciones, a excepción del ensayo 16 (pH: 10, T:20 °C) que evidencia un espectro UV-visible inalterado; confirmando su estabilidad y uniformidad en disolución coloidal manteniendo su posible forma esférica; presentaron un corrimiento a longitudes de onda mayores, lo cual podría deberse a un aumento en el tamaño por agregación debido a que la reacción de reducción sigue avanzando haciendo crecer las partículas moldeándolas en una forma más energéticamente favorable. Sin embargo, también presentan la uniformidad coloidal sin presentar sólidos decantados ni en suspensión.

Los resultados de los tamaños hidrodinámicos se observan en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7**

*Tamaño hidrodinámico promedio(Z) de las AgNPs con extracto acuoso*

N° ensayo	pH	Temperatura(°C)	Pdl	Promedio Z (d.nm)
8	7	60	0.50	111.20
9	12	20	0.43	147.60
11	7	20	0.40	178.50
15	10	60	0.25	52.44
16	10	20	0.48	58.68
18	12	60	0.48	48.89

*Nota:* Distribución de tamaño por DLS, expresa un tamaño hidrodinámico promedio (Z), con su respectivo índice de polidispersidad de las NPs (PDI).

En la Tabla 4.7 se puede observar que la mayoría de ensayos presentaron mayores índices de polidispersidad, de lo cual se puede inferir que estas muestras presentan una gama variada de tamaños con una posible tendencia a aglomerarse en el tiempo. Los resultados expuestos tienen contraste con Filimon et al., (2023), quienes reportaron que el tamaño de las nanopartículas de plata medidas con DLS y con Pdi mayores de una matriz de hidroxipropil metil celulosa tienden a aglomerarse; además, la distribución de tamaños fue más amplia en comparación con las nanopartículas de plata en una matriz de poly N – vinilpirrolidone que presentaron un menor Pdi,

El ensayo 15 (pH:10, T:60°C) presenta el menor Pdi, lo que reflejaría una distribución de tamaños homogéneos de NPs; esto coincide con lo reportado por Geeta Arya R. (2017) , quien indica un tamaño hidrodinámico promedio de las AgNPs determinadas por DLS, de aproximadamente 54 nm junto con PDI de 0.2; ellos mencionan que las AgNPs, empleando extracto de corteza de *Prosopis juliflora* fueron homogéneos en términos de tamaño.

En el ensayo 18 (pH:12, T: 60°C) presentó un Pdi similar al ensayo 8 (pH:7, T: 60°C). La alta temperatura en el ensayo 8 (pH:7, T: 60°C), podría haber causado un proceso rápido de nucleación, pero la tendencia a la aglomeración podría ser el resultado del pH neutro de la solución. Según la investigación realizada por Reddy Bogiredd (2020), un pH menor en la mezcla de reacción producen NPs más grandes debido a la disponibilidad limitada de grupos funcionales OH<sup>-</sup>, mientras que a pH 10 se producen partículas casi esféricas de menor tamaño y con menor tendencia a aglomerarse. Esto se debe a que las NPs adquieren una mayor densidad de carga negativa, lo que las estabiliza e impide su agregación debido a la repulsión de cargas. Mientras en el ensayo 18 (pH:12, T: 60°C), el valor relativamente alto de Pdi podría deberse a la formación de NPs de forma cuasi esféricas o triangular, lo que contrastaría con la formación de un hombro en la lectura UV- visible.

Los resultados indican que es bastante posible controlar la morfología y el tamaño de las AgNPs a través de la biosíntesis modificando el pH.

En los ensayos 15 (pH: 10, T:60 °C) y 18 (pH:12, T: 60 °C), los cuales mostraron los menores tamaños hidrodinámicos se puede evidenciar el efecto de la temperatura y pH de síntesis alcalino lo que conlleva a un proceso de nucleación muy rápido en un inicio, derivándose en una fase de crecimiento continuo de las AgNPs. Estos resultados coinciden con lo reportado por Khan et al., (2013), quienes indican que cuando comenzó a hervir una solución de reacción, el pico de absorción cambió gradualmente de 400 nm a 430 nm, acompañado del aumento continuo en la intensidad de absorbancia, a lo que les atribuyeron un crecimiento homogéneo en las nanopartículas de plata con tamaños entre 20 nm y 50 nm. En el Apéndice N°5 y Tabla 4.8 también observa que, en la mayoría de ensayos, se produjeron distribuciones multimodales por intensidad de tamaño, lo que indica la polidispersidad de las muestras.

Los picos de mayor tamaño (>1000 nm) en los gráficos de intensidad, están presentes debido a que estos cuerpos se interponen en el camino del láser del equipo, por lo cual su aporte a la dispersión de luz es mucho mayor en comparación con las partículas pequeñas. Además, tomando como referencia a Botasini (2016) es importante aclarar que el diámetro efectivo medido por el promedio Z, tienden a sobrevalorar los tamaños reales de las muestras polidispersas, dado que expresa el promedio aritmético de todas las poblaciones presentes, en dónde las partículas de gran tamaño tienen un peso relativo mayor en la cantidad de luz dispersada que las partículas pequeñas.

**Tabla 4.8**

*Distribución de tamaños de AgNPs por intensidad del extracto acuso*

<b>N° ENSAYO</b>	<b>Pico</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>% Intensidad</b>
8	1	173.30	86.50
	2	16.90	7.10
	3	2357	6.40
9	1	24.85	54.30
	2	1036	29.90
	3	2.19	15.80
11	1	177.50	80.90
	2	35.31	19.10
	3	0	0
15	1	39.77	98.20
	2	5560	1.80
	3	0	0
16	1	102	88.40
	2	9.83	9.80
	3	4457	1.80
18	1	31.47	70.50
	2	1097	26.40
	3	5198	3.10

Los resultados permitieron identificar de 2 a 3 poblaciones en los ensayos 8 (pH:7, T: 60 °C), 9 (pH:12, T: 20 °C), 15 (pH:10, T: 60 °C), 16(pH:10, T: 20 °C) y 18 (pH:12, T: 60 °C), quienes presentaron picos de intensidad en tamaños mayores a 1000 nm (pico 3: 2357 nm

6.4%; pico 2: 1036 nm 29.9%; pico 2: 5560 nm 1.8%; pico 3: 4457 nm 1.8%; pico 3: 5198 nm 3.1% respectivamente), estos tamaños están relacionados con material orgánico en suspensión del extracto que enmascara a las nanopartículas lo cual contribuye a una mayor dispersión de luz, el cual es captado por el DLS y se ve reflejado en los gráficos por intensidad, teniendo coherencia con el fenómeno de la dispersión de Rayleigh quien postula, que la contribución a la luz total dispersada por las partículas pequeñas será extremadamente pequeña a la luz dispersada por las partículas más grandes (Malvern, 2017) . A si mismo Reddy (2020), reporta un mayor tamaño de NPs en las mediciones de DLS en comparación con el histograma SEM y los resultados de XRD a lo cual le atribuye la contribución adicional de la biomasa que fue confirmado en su análisis SEM.

Los picos con mayor intensidad (pico 1 y 2), tienen un tamaño proporcional de 178 nm hasta los 2 nm, evidenciando claramente la polidispersidad en cuanto al tamaño de las NPs obtenidas. Los resultados de tamaño coinciden con los informados por Sinhg et al., (2015), quienes obtuvieron un rango de tamaños de 50 nm – 150 nm y un diámetro hidrodinámico de 97 nm. También contrasta con lo expuesto por Tippayawat et al., (2016), quienes, mediante una síntesis verde usando como agente reductor la planta de Aloe Vera, sintetizaron AgNPs de forma esférica con un tamaño de partícula que oscilaba entre 70.70 nm a 192.02 nm Además, informaron que el tiempo de reacción y la temperatura influyen significativamente en la fabricación de nanoestructuras de plata.

También Vera y Tamo (2018), indica que los tamaños más grandes por intensidad podrían hacer referencia a que fracciones del extracto no se encapsulan y se mantiene en solución y una mayor parte del extracto si fueron incorporados en las nanopartículas.

Los ensayos 8 (pH:7, T: 60 °C), 9(pH:12, T: 20 °C) y 11 (pH:7, T: 20 °C) que mostraron longitudes de onda en el UV-visible característicos de menores tamaños de AgNPs, no coinciden con los resultados obtenidos por DLS. Como explicación a esta diferencia referenciamos a Moreno (2021), quien menciona que los diámetros obtenidos en esta técnica son mayores debido a que se mide el radio hidrodinámico el cual está definido no solamente por el tamaño del núcleo metálico sino también por la doble capa eléctrica que se genera entre la superficie de la partícula y el seno de la solución. Botasini (2021) también menciona que estas variables puede variar en función de la carga superficial, el agente de recubrimiento, el pH y la fuerza iónica de la solución. Teniendo en cuenta que el análisis DLS se realizó después de 7 semanas de la última lectura UV-visible, podría significar que hubo una agregación de NPs, pero sin embargo refleja que aún se mantienen estables y en solución coloidal.

En las distribuciones por volumen y número (ver Apéndice N°5), presentaron un solo pico de distribución de tamaño, por lo cual se puede afirmar que las soluciones están conformadas por más de un 94% de NPs con tamaños menores a 100 nm, siendo las muestras 9 (pH:12, T: 20 °C) y 16 (pH:10, T: 20 °C) las que presentan una distribución porcentual con menores volúmenes y tamaños de NPs menores a 100 nm. En general todas las muestras mantienen una cierta estabilidad a las 11 semanas de su síntesis, pero con una tendencia a aglomerarse en el tiempo.

En las Tablas 4.9 y 4.10 se muestran las lecturas UV-visible de la síntesis de AgNPs sintetizado con extracto hidroetanólicos a 50% y 70%, las mediciones se realizaron en diferentes tiempos para poder observar la estabilidad de las muestras.

**Tabla 4.9***Lectura del espectrofotómetro UV-visible /AgNPs con extracto hidroetanólico a 50%*

Ensayo N°	Ph	T(°C)	Fecha :25/11/22		Fecha : 07/12/22		Fecha :21/12/22		Fecha :28/12/22	
			Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)
2	7	20	2.05	429	2.05	429	3.67	422	3.35	428
5	12	20	3.65	419	2.84	420	1.87	415	1.46	412
7	7	60	1.83	428	1.83	428	1.52	429	1.92	429
10	10	60	2.96	419	2.96	419	3.42	420	3.24	422
12	12	60	2.62	415	2.62	415	1.27	410	0.54	411
17	10	20	1.96	425	1.96	425	3.08	422	3.48	424

**Tabla 4.10***Lectura del espectrofotómetro UV-visible /AgNPs con extracto hidroetanólico a 70%*

Ensayo N°	Ph	T(°C)	Fecha :25/11/22		Fecha : 07/12/22		Fecha :21/12/22		Fecha :28/12/22	
			Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)	Absorbancia	Lambda (nm)
1	12	20	2.34	422	2.26	422	1.08	435	1.34	419
3	10	60	4.40	415	3.24	419	1.38	420	2.99	418
4	12	60	1.93	420	2.46	421	1.43	431	1.50	425
6	10	20	1.79	423	1.79	423	1.05	424	1.87	422
13	7	60	1.94	425	1.94	425	4.22	427	2.30	427
14	7	20	3.17	426	2.24	429	2.17	429	2.42	429

Se visualizó que las muestras cambiaron de color, lo que indicó la formación de AgNP en la solución y los SPR se registraron mediante espectroscopia UV-vis. En todos los casos, los espectros UV-vis exhibieron una banda de absorción de energía entre 415 y 429 nm, lo que sugiere una excitación de las vibraciones longitudinales del plasmón de las AgNPs en las soluciones. Todos las AgNPs sintetizadas con extracto hidroetanólico, presentaron picos de SPR a mayores longitudes de onda comparadas con los extractos acuosos. Esta diferencia de longitudes de onda que hace referencia a la formación de NPs más grandes, está relacionado a con los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, se obtuvo una mayor concentración de compuestos fenólicos en los extractos hidroetanólicos a comparación del extracto acuoso. Yousaf et al., (2020), mencionan que la variación en tamaño y forma, puede deberse a la presencia de diferentes grupos funcionales en los extractos, también indica que los compuestos presentes en los extractos etanólicos suelen ser de mayor tamaño molecular y tienen una mayor capacidad de unión a las nanopartículas, lo que puede llevar a la formación de partículas de mayor tamaño.

Las nanopartículas sintetizadas con extracto hidroetanólicos de 50% y 70% a pH de 7 presentaron un corrimiento a longitudes de onda mayores, esto muy independientemente de la variación de temperatura. Mientras que, para todas las muestras sintetizadas con pH alcalino, sus picos se centraron entre 415 nm y 425 nm, lo que sugiere tamaños de partículas más pequeños para estas muestras. De lo cual podemos inferir, que hubo una diferencia entre la síntesis con pH alcalino y pH neutro.

En los ensayos donde se sintetizo con pH alcalino y con temperatura alta (60 °C) se observó un corrimiento a longitudes de onda mayores en el tiempo entre 418 nm y 425 nm; y a temperatura ambiente de síntesis, los plasmones obtenidos se encontraron alrededor de 412 nm y 424 nm. Una de las posibles razones de la generación de NPs de mayor tamaño al

sintetizar a 60 °C, como ya se mencionó podría ser porque hay una rápida degradación del extracto que favorece el proceso de nucleación aumentando la tasa de reacción de reducción de los iones de plata. La presente investigación denota que en el tiempo aumenta la tasa de agregación y crecimientos de las AgNPs cuando se sintetizó a una temperatura de 60 °C.

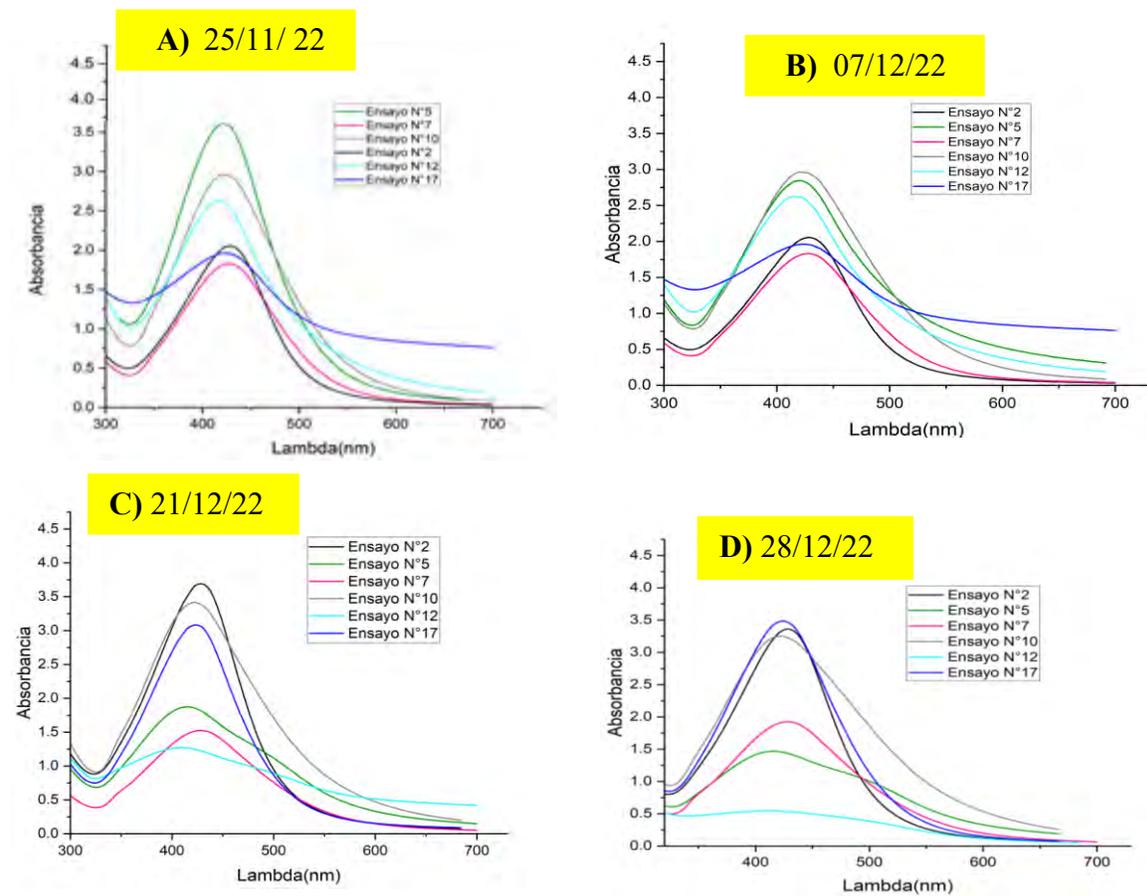
Los resultados expuestos coinciden con Pontaza et al., (2019) , ellos reportaron que al sintetizar AgNPs con extracto acuoso de *Paulownia tomentosa* a temperaturas bajas sus picos de SPR eran mucho menor que al sintetizar con temperaturas altas, las cuales bordeaban alrededor de 420 nm, seguidamente también sintetizaron NPs con extracto etanólico, reportándose que los picos de SPR al sintetizar con una temperatura de 80 °C, se centralizaron en un rango de longitud de 460 nm y 480 nm y al sintetizar con una temperatura de 30 °C los picos SPR se encontraban alrededor de los 420 nm; resaltan que según el solvente de extracción utilizado se pueden obtener diferentes tamaños de partículas.

Campos et al., (2021), sintetizaron AgNPs con extractos etanólicos de *Eucalyptus globulus* donde también mostraron picos de resonancia entre 410 nm y 430 nm, ellos mencionan que la mejor síntesis fue con valores de pH aproximados o iguales a 10.

En la Figura 4.7 se observa 4 gráficos de la lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto hidroetanólicos de 50% de igual manera en la Figura 4.8 de la lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto hidroetanólicos de 70% en diferentes fechas usando el software Origin 2022b.

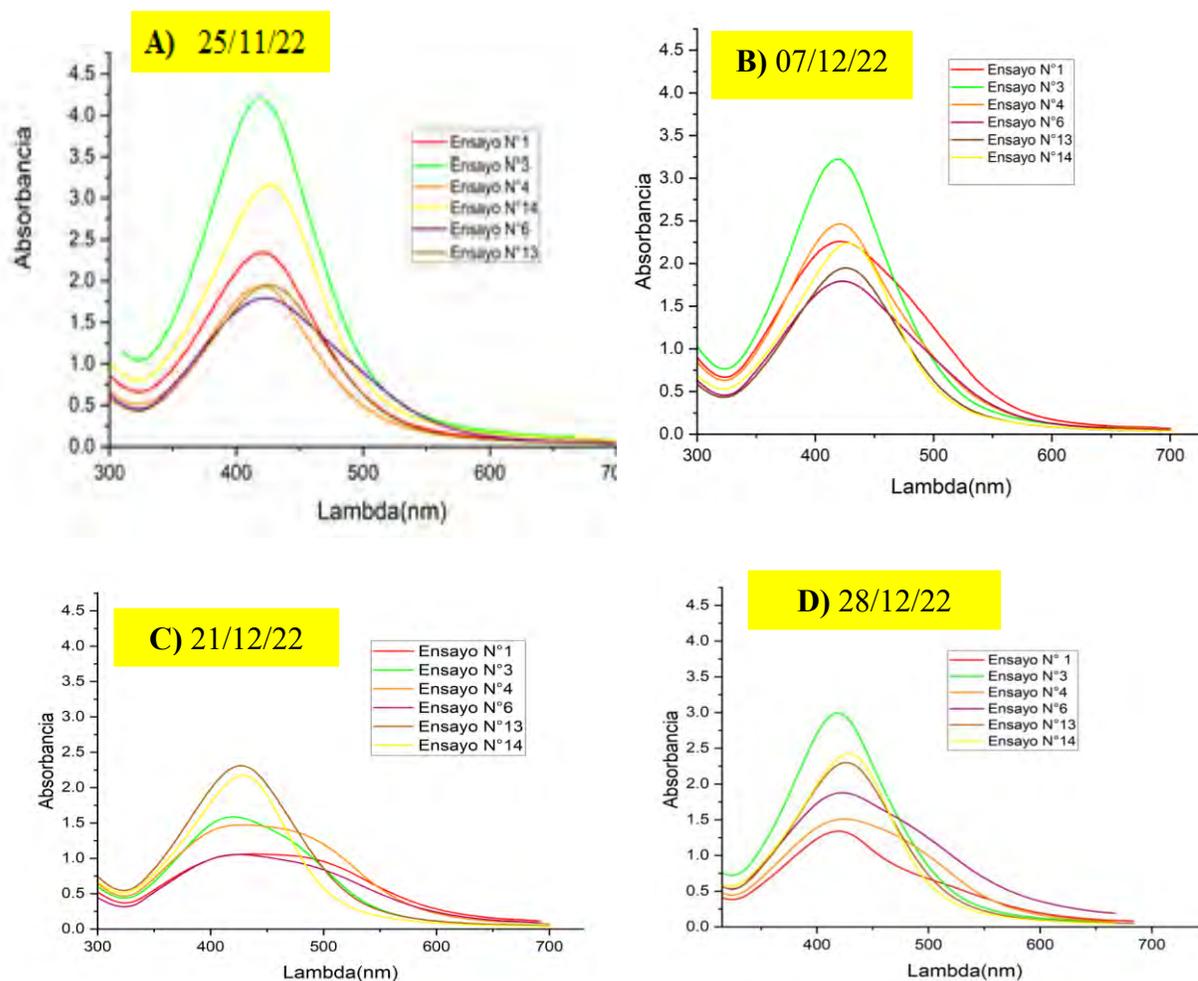
**Figura 4.7**

*Lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto hidroetanólico de 50% en diferentes fechas*



**Figura 4.8**

*Lectura del UV-Visible/ AgNPs con extracto hidroetanólico de 70% en diferentes fechas*



En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestra los espectros UV-visible de las NPs<sub>Ag</sub>, sintetizadas con extracto hidroetanólico a 50% y 70%, para evaluar la estabilidad en el tiempo de las SPR, se observó en un inicio la formación de los picos de resonancia dipolar característicos lo que indica la presencia de NPs. A diferencia de las NPs sintetizadas con extracto acuoso, visualmente se observó anchos de bandas mayores en un inicio, lo cual es indicativo de formación de NPs de mayores tamaños. Se observó que a los 12 días de la síntesis hubo un aumento visual significativo en los anchos de banda. Según Egga et al., (2020), quienes

sintetizaron NPsAg con extracto de *Diospyros maritima Blume*, el fenómeno observado puede explicarse a que una concentración de compuestos fenólicos muy elevados en el extracto, hace que este reduzca las  $Ag^+$  muy rápidamente acelerando las formación de AgNPs, lo cual causa agregación y aglomeración con llevando a producir NPs muy polidispersas.

A los 26 días se observó un achatamiento de la banda SPR del ensayo 12 (pH:12, T: 60 °C) biosintetizado con extracto hidroetanólico a 50%; esto se debe a que el efecto cuántico se ha reducido significativamente debido al tamaño de las partículas. En otras palabras, las partículas de plata han crecido hasta un tamaño en el que ya no exhiben el comportamiento cuántico observado en las partículas más pequeñas. La aparición de un hombro en el ensayo 5 (pH:12, T: 20 °C) con extracto hidroetanólico a 50%, indica según Patil y Chougale, (2021) ,una resonancia cuadrípolar, a lo cual le atribuye la distribución heterogénea del tamaño de las AgNP.

En caso de los ensayos 1 (pH:12, T: 20 °C),4 (pH:12, T: 60 °C) y 6 (pH:10, T: 20 °C) biosintetizados con extractos hidroetanólicos a 70%, todos a pH alcalino, se observó que sus picos sufireron una deformación y un ensanchamiento. Feng et al., (2018), mencionan que estas formaciones ocurren debido a la presencia de partículas no esféricas en AgNPs aglomerados o a las transiciones morfológicas de las AgNPs. Dichos cambios se hicieron mas visibles a los 33 días de la síntesis junto a un mayor ensanchamiento de los picos

Por lo cual inferimos que a pH mayores a 10, temperatura de 60 °C y una concentración muy alta de compuestos fenolicos se genera un crecimiento acelerado y descontrolado de las NPs, lo cual que contribuye a una aglomeración y polidispersidad que se ve reflejado en el tiempo.

Las Tablas 4.11 y 4.12 muestran el tamaño hidrodinámico promedio Z y el índice de polidispersidad de las AgNPs sintetizada con extractos hidroetanólicos.

**Tabla 4.11**

*Tamaño hidrodinámico promedio(Z) de las AgNPs con extracto hidroetanólico 50%*

N° ensayo	pH	Temperatura(°C)	Pdl	Promedio Z (d.nm)
2	7	20	0.56	49.82
5	12	20	0.24	84.54
7	7	60	0.71	220.7
10	10	60	0.50	62.7
12	12	60	0.60	268.4
17	10	20	0.60	34.77

*Nota:* Distribución de tamaño por DLS, expresa un tamaño hidrodinámico promedio (Z), con su respectivo índice de polidispersidad de las NPs (PdI).

En casos de los extractos etanólicos a 50%, los valores altos de PdI indican una distribución heterogénea de tamaños; lo cual concuerda con los gráficos UV-visible, contrastando que, a las 11 semanas de síntesis, las AgNPs tienen una tendencia a aglomerarse y son altamente polidispersas. Los ensayos 7 (pH:7, T: 60 °C) y 12( pH:12, T: 60 °C) muestran los mayores PdI y los tamaños promedios más altos, por lo que uno de los factores que pudo influenciar fue la temperatura de síntesis, lo cual es análogo con la investigación de Liu et al., (2020), quienes demostraron que la alta temperatura favorece tanto a la nucleación, como la de crecimiento; siempre y cuando haya suficiente agente precursor de  $Ag^+$ , pero si hay una deficiencia, sucede una nucleación muy rápida que consumirá la gran cantidad de  $Ag^+$ , por lo que el crecimiento se restringiría debido a la falta de precursores de  $Ag^+$ .

**Tabla 4.12**

*Tamaño hidrodinámico promedio(Z) de las AgNPs con extracto hidroetanólico70%*

N° ENSAYO	pH	Temperatura(°C)	Pdl	Promedio Z (d.nm)
1	12	20	0.36	124.30
3	10	60	0.38	69.34
4	12	60	0.23	136.5
6	10	20	0.30	83.78
13	7	60	0.55	2000
14	7	20	0.69	81.30

*Nota:* Distribución de tamaño por DLS, expresa un tamaño hidrodinámico promedio (Z), con su respectivo índice de polidispersidad de las NPs (PdI).

La Tabla 4.12 contiene menores PdI, a comparación de los PdI de los extractos hidroetanólicos a 50%, también se observan los máximos tamaños que se obtuvieron en todos los ensayos. El ensayo 13 (pH:7, T: 60 °C), donde se ve el efecto del pH y la alta temperatura que influyen directamente en el tamaño y forma de las NPs. Los PdI de los ensayos 1 (pH:12, T: 20 °C), 3 (pH:10, T: 60 °C),4 (pH:12, T: 60 °C) y 6 (pH:10, T: 20 °C) hacen referencia a que se tiene probablemente una dispersión homogénea de tamaños, a comparación de los demás que muestran sistemas polidispersos, que se puede atribuir a diferencias en la tasa de crecimiento de partículas individuales durante la nucleación. Los más grandes tamaños hidrodinámicos se obtuvieron al sintetizar con los extractos hidroetanólicos a 70%. Se evidencia que los fitocompuestos en los extractos hidroetanólicos también pueden tener un papel influenciador en el tamaño hidrodinámico. Estos resultados concuerdan con Kartini et al., (2020), quienes sintetizaron AgNPs usando extractos etanólicos a 80% de *Phyllanthus niruri*, *Orthosiphon stamineus* y *Curcuma longa*, obtuvieron tamaños por DLS en un rango de 715 nm con un PdI de 0.0085 y 918 nm con un PdI de 0.6040.

Se refleja que los diferentes tamaños de las nanopartículas están determinados principalmente por varios fitocompuestos que se encuentran en los extractos.

En las Tablas 4.13 y 4.14 se indican las distribuciones de tamaño por intensidad de las NPs sintetizadas con extractos etanólicos, el tamaño expresado por el DLS también tuvo en cuenta la capa orgánica al calcular el tamaño total de las NPs en los coloides.

**Tabla 4.13**

*Distribución de tamaños de AgNPs por intensidad del extracto hidroetanólico 50%*

N° ensayo	Pico	Diámetro	%
		(nm)	Intensidad
2	1	83.27	81.10
	2	14.96	12.70
	3	4516.00	6.20
5	1	84.66	91.10
	2	14.43	8.90
	3	0.00	0.00
7	1	385.80	71.20
	2	77.42	23.20
	3	5195.00	5.60
10	1	120.80	81.30
	2	17.07	15.20
	3	3950	3.50
12	1	324.90	83.60
	2	52.50	8.50
	3	5042	8.00
17	1	75.38	83.30
	2	7.83	16.70
	3	0.00	0.00

**Tabla 4.14***Distribución de tamaños de AgNPs por intensidad del extracto hidroetanólico 70%*

<b>N° ensayo</b>	<b>Pico</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>% Intensidad</b>
1	1	153.60	97.20
	2	5192.00	2.80
	3	0.00	0.00
3	1	85.06	84.80
	2	11.83	8.40
	3	4616.00	6.80
4	1	161.70	98.20
	2	4942.00	1.80
	3	0.00	0.00
6	1	108.50	91.60
	2	15.64	7.10
	3	5248.00	1.40
13	1	1107.00	88.20
	2	5560.00	6.50
	3	158.80	5.30
14	1	58.95	50.90
	2	383.00	39.90
	3	1.44	5.20

De todo lo sustentado es importante destacar que las experimentaciones con extractos hidroetanólicos al 70% (ensayos 1,3,4,6,13 y 14), presentaron en algunos casos NPs de gran tamaño, en otros sedimentos como se observa en la Figura 4.9 y en todos los ensayos no presentaron estabilidad a medida que paso el tiempo, lo que pudo deberse a una desestabilización de las cargas superficiales lo que conllevó a una aglomeración mediante

atracción electrostática entre ellas y pérdidas de las propiedades superficiales. (Faridul et al., 2022)

Por tanto, se descartaron estas NPs en lo que sigue de la investigación. La Tabla 4.15 muestra los resultados de los ensayos finales.

#### **Figura 4.9**

*Sedimentos de las AgNPs con extractos hidroetanólicos al 70%*



**Tabla 4.15***Resultados finales de la síntesis de AgNP*

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Tamaño de AgNP</b>
<b>N°</b>				
<b>Experimento</b>	<b>C.E (%)</b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Nm</b>
1	50	7	20	49.82
2	50	12	20	84.54
3	50	7	60	220.70
4	0	7	60	111.20
5	0	12	20	147.60
6	50	10	60	62.70
7	0	7	20	178.50
8	50	12	60	268.40
9	0	10	60	52.44
10	0	10	20	58.68
11	50	10	20	34.77
12	0	12	60	48.89

*Nota:* C.E, es la cantidad de etanol en el solvente

Los resultados indican que se obtienen mayores tamaños de NPs con extracto hidroetanólicos 50 % con un pH:12, T:60; se lograron menores tamaños con el extracto hidroetanólicos 50% con pH:10, T:20; lo que involucra que a menor pH y temperatura se alcanza menores tamaños de NPs a la misma concentración de extracto al 50%.

#### ***Efectos estimados para la AgNPs (nm)***

Los efectos de las variables independientes

(cantidad de etanol, pH y temperatura) sobre el tamaño de las NPs se muestra en la Tabla 4.16.

**Tabla 4.16***Efectos estimados*

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Int. Confianza</b>	<b>V.I.F.</b>
Promedio	52.14	+/- 72.08	
A: C.E	20.60	+/- 83.23	1.0
B:pH	-2.70	+/- 101.93	1.0
C:T	35.07	+/- 83.23	1.0
AB	43.91	+/- 101.93	1.0
AC	92.49	+/- 83.23	1.0
BB	73.12	+/- 176.56	1.0
BC	-4.61	+/- 101.93	1.0

*Nota:* Donde; A: cantidad de etanol, T: temperatura, AB: interacción de cantidad de etanol - pH, AC: interacción de cantidad de etanol -temperatura de biosíntesis, BC: interacción pH-temperatura de biosíntesis y BB es la interacción de pH, V.I.F: factor de inflación de varianza.

El efecto estimado se determinó considerando el promedio de los valores altos y el promedio de los valores bajos para cada variable y la diferencia entre los valores altos y bajos. El factor de inflación de varianza indica que no hay multicolinealidad entre las variables independientes.

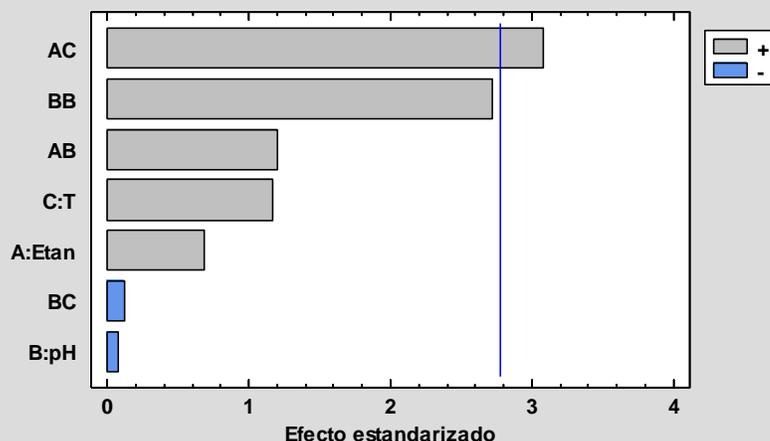
La estimación del efecto de la temperatura resultó positiva, lo cual indica que al elevar la temperatura de 20°C a 60 °C los tamaños de las NPs también aumentan en promedio 35.07 nm; el cambio del solvente acuoso a hidroetanólico (50%) aumenta en promedio 20.60 nm del tamaño de AgNPs. El efecto pH resultó negativo, por lo que disminuye el tamaño de las

NPs en promedio 2.70 cuando hay un incremento de pH 7 a 12.

En la figura 4.10 se muestra el diagrama de Pareto de efecto estandarizado para las AgNPs.

**Figura 4.10**

*Diagrama de Pareto efecto estandarizado para las AgNPs*



*Nota:* Donde; A: cantidad de etanol, T: temperatura, AB: interacción de cantidad de etanol - pH, AC: interacción de cantidad de etanol - temperatura de biosíntesis, BC: interacción pH- temperatura de biosíntesis y BB es la interacción de pH.

La longitud de cada barra es proporcional al valor del estadístico t calculado para los efectos correspondientes. Cualquiera barra fuera de la línea vertical es estadísticamente significativa al 5% del nivel de significancia.

La interacción de: cantidad de etanol - temperatura de síntesis (AC), sobrepasa el nivel de significancia; siendo esta la de mayor efecto, resultando un mayor tamaño de nanopartículas, cuando dichas variables cambian de nivel inferior al nivel superior; es decir cuando se produce el cambio del extracto acuoso a extracto hidroetanólico a 50% y la temperatura de 20 °C a 60 °C aumenta el tamaño de las AgNPs en un promedio de 92.49 nm.

Los resultados del análisis de varianza se muestran en la Tabla 4.17.

**Tabla 4.17**

*Análisis de varianza para AgNPs*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:C.E	1273.49	1	1273.49	0.47	0.529
B:Ph	14.55	1	14.55	0.01	0.945
C:T	3689.71	1	3689.71	1.37	0.307
AB	3855.74	1	3855.74	1.43	0.297
<b>AC</b>	25661.40	1	25661.4	9.52	<b>0.036</b>
BB	19979.80	1	19979.8	7.41	0.052
BC	42.45	1	42.4581	0.02	0.906
Error total	10783.20	4	2695.79		
Total (corr.)	65300.30	11			

*Nota:* Donde; A: cantidad de etanol, B: pH, T: temperatura, AB: interacción de cantidad de etanol -pH, AC: interacción de cantidad de etanol -temperatura de biosíntesis, BC: interacción pH-temperatura de biosíntesis y BB es la interacción de pH.

El análisis de varianza determinó que la variable significativa es la interacción de tipo de extracto y temperatura; esto está sustentado en el valor alto de razón F y un valor  $P < 0.05$ , indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95%. La Tabla ANOVA muestra que cada factor independiente no tiene influencia significativa sobre el tamaño de AgNPs, pero si la interacción de variables. De esta manera, se demuestra que el tamaño de las AgNPs no depende únicamente de cada factor de manera individual, sino que es una combinación de factores que interactúan entre sí. Por tanto, se

demonstró la hipótesis alterna, es decir que la interacción de los factores de cantidad de etanol y temperatura de biosíntesis tiene influencia en el tamaño de las nanopartículas de plata.

El modelo de regresión de los datos experimentales es el siguiente:

$$\text{AgNP (nm)} = 1420.21 - 6.62437 * \text{C. E} - 270.617 * \text{pH} - 0.997704 * \text{T} + 0.35126 * \text{C. E} * \text{pH} \\ + 0.0924867 * \text{C. E} * \text{T} + 13.8494 * \text{pH}^2 - 0.046075 * \text{pH} * \text{T}$$

$$R^2 = 83.48\%$$

Este valor indica que la variación total de la variable respuesta es explicada en un 83.48% por el modelo de regresión; quedando demostrada a bondad de ajuste, por tanto, significa que el modelo es ajustable a los datos experimentales y puede ser utilizado para predecir el tamaño de partícula de las nanopartículas de plata en función de los factores mencionados.

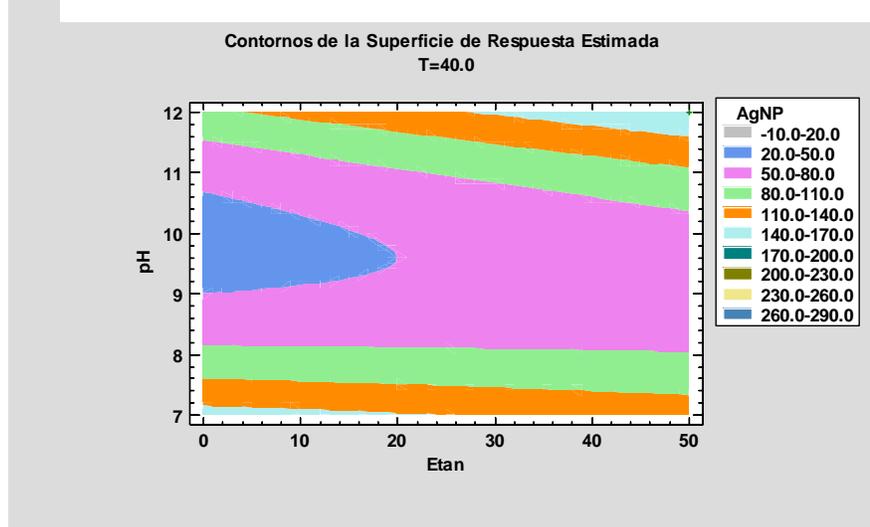
Donde:

E.C: cantidad de etanol

T: temperatura de biosíntesis

AgNP (nm): tamaño de nanopartículas de plata

La superficie de respuesta muestra gráficamente el modelo de regresión para la variable AgNP en la Figura 4.12:

**Figura 4.12***Superficie de respuesta estimada*

La superficie de respuesta estimada, muestra que se logran tamaños nanométricos (<100 nm) de AgNPs, en un rango de contenido de etanol de 0% hasta 50% y pH de biosíntesis menores a 10, los cuales están representados con los colores plomo, azul y rosado; el color azul muestra las condiciones favorables para poder obtener AgNPs con tamaños menores a 50 nm, los cuales se deberían sintetizar con extractos acuosos o hidroetanólicos con un máximo de 20% de etanol. Además, los colores verde, naranja y celeste indica que pH mayores a 11.5 y cualquier tipo de extracto ya sea hidroetanólicos o acuoso no son favorables para la biosíntesis de AgNPs ya que se obtendría NPs de tamaños grandes.

En base a los resultados y considerando el ensayo (N°10) donde se logró menor tamaño de NPs con extracto acuoso, quedó determinado como parámetros un pH:10 y T: 20°C, constituyendo estos los parámetros del proceso de biosíntesis; donde se obtiene un tamaño promedio hidrodinámico de 58.68 nm de NPs ; a pesar de que en otros ensayos se obtuvieron menores tamaño de NPs con pequeñas diferencias del orden del 1,15% pero a

condiciones de temperaturas y pH más elevados, lo cual implicaría mayores gastos cuando estos resultados se apliquen en el escalamiento a nivel piloto e industrial.

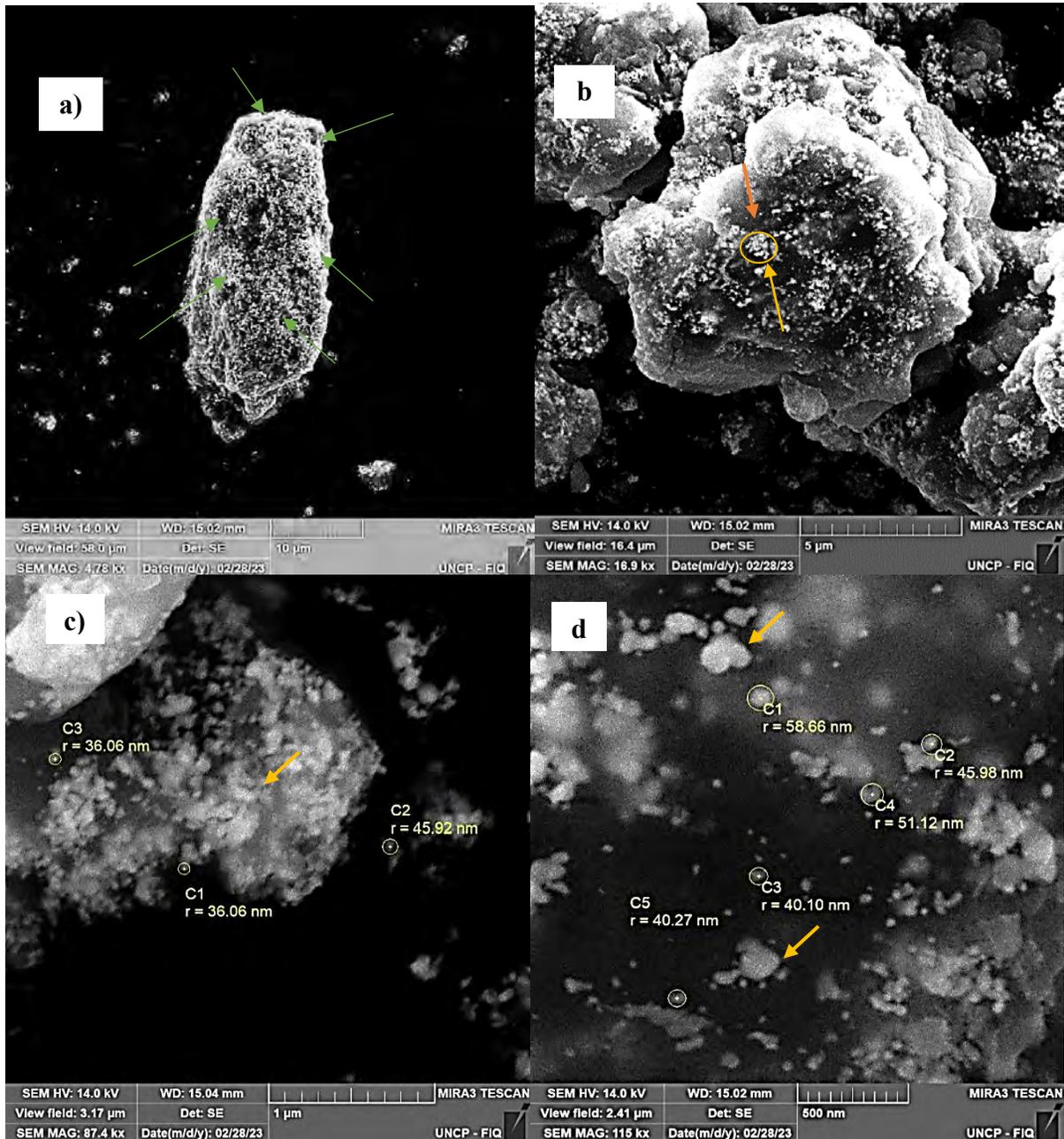
No se consideró a los extractos hidroetanólicos, porque presentaron aglomeraciones y sedimentaciones en el transcurso del tiempo lo cual se evidenció en los anteriores análisis.

#### **4.4. Caracterización de las nanopartículas de plata**

En la Figura 4.13 se observa las microfotografías de las NPs emitidas por el Microscopio electrónico de barrido para el ensayo N°10 (pH :10 y T:20°C), nanopartículas biosintetizadas con extracto acuoso de queñua, obteniendo un tamaño hidrodinámico de 58.68 nm.

Figura 4.13

*Microfotografías de las nanopartículas*



Se observa una nube de color gris más tenue (Figura 4.13-b –señalado con una flecha naranja); Zahir et al., (2021), atribuye a esta película como la fase orgánica. Esta fase según Asif et al., (2022), está compuesto por los metabolitos extraídos de la planta y la biomasa

que esta alrededor de las NPs, la cual se observa como una cobertura de capa gruesa (flecha amarilla en la Figura 4.13-b), siendo estas las responsables de la estabilización de las AgNPs.

Los tamaños observados en el análisis SEM, fueron en promedio de 45.53 nm de radio, teniendo presencia de pocas NPs grandes con tamaños de 119.30 nm y abundantes partículas de 36.06 nm. Además, se observó la presencia de subpartículas de menos de 60 nm de diámetro, que por limitaciones de la técnica no se pudieron medir los tamaños de estas. Se confirmó que la muestra está compuesta por más del 85% de nano estructuras de formaciones

esféricas y en estas el 95% está compuesta por AgNPs y un 5% de material vegetal. Los resultados tienen relación con lo expresado en el análisis de DLS que mostró una polidispersidad en la muestra.

Se observa en la Figura 4.13-c y d (flechas naranjas), como las partículas más pequeñas rodean a las partículas más grandes, formando coágulos. Koehler et al., (2014), sugieren que este fenómeno sucede porque la probabilidad de agregación de las NPs depende de la fuerza de repulsión electrostática entre ellas, que a su vez depende del número de cargas eléctricas en exceso en la superficie de las partículas. Lo que significa, que cuando dos nanopartículas tienen una alta carga en exceso en sus superficies, se repelen fuertemente entre sí, lo que evita su agregación. Sin embargo, cuando las partículas tienen menos cargas en exceso en sus superficies, hay menos repulsión entre ellas y tienen más probabilidad de agregarse.

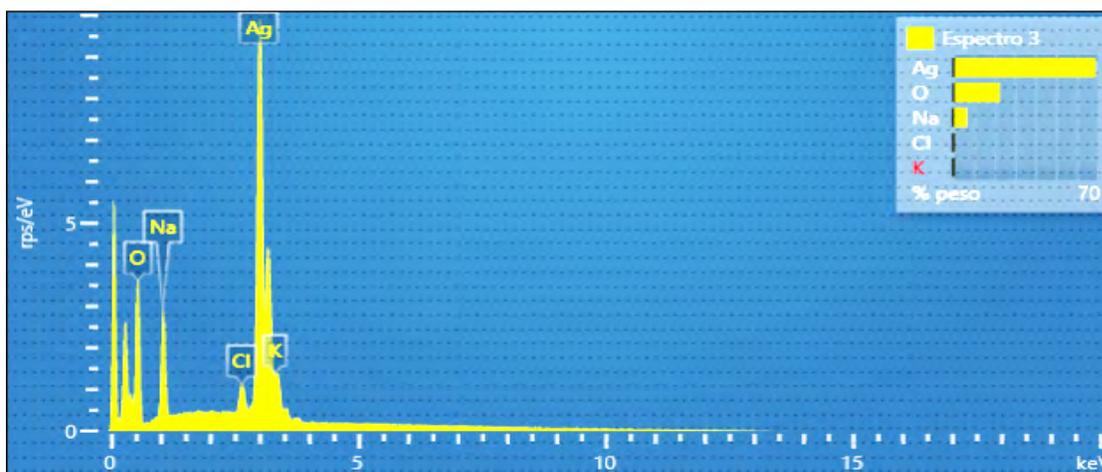
Joudeh y Link (2022), mencionan que para la preparación de muestra para un análisis de microscopía electrónica de barrido de NPs orgánicas (o NPs recubiertas con materiales biológicos), se requieren técnicas de preparaciones de muestras sofisticadas que constituyen

importantes restricciones para su uso. La preparación de la muestra para estas técnicas puede provocar la deshidratación de la muestra, lo que podría conducir, por ejemplo, a la reducción y agregación de la muestra. Otra posible causa de la aglomeración de las NPs podría atribuirse a las condiciones ambientales a las que estuvo expuesta la muestra, ya que tuvo que ser enviada por courier y también que al usar una técnica donde se requiere muestra solida se realizan procesos fisicoquímicos para su secado.

En la Figura 4.14 y Tabla 4.18 se observan los resultados del análisis de Espectroscopia de rayos X, que muestran la composición elemental de las AgNP en un pico intenso a 3 keV el cual está relacionado con la presencia de plata elemental según Paulkumar et al., (2017).

**Figura 4.14**

*Composición elemental de la muestra*



Los resultados indican a la plata (69.31 %) como elemento constituyente principal en comparación con el oxígeno (22.57%), sodio (6.66%) y en menor cantidad cloro y potasio, estos últimos picos se puede atribuirse a biomoléculas unidas a la superficie de las AgNPs involucradas en la protección de estas.

**Tabla 4.18**

*Porcentaje de la composición elemental de las AgNP por Espectroscopia de rayos X (EDS)*

<b>ELEMENTO</b>	<b>% PESO</b>
O	22.57
Na	6.66
Cl	0.84
K	0.62
Ag	69.31
<b>Total</b>	<b>100</b>

El análisis EDX confirmó la presencia de elementos presentes en las AgNPs después de 14 semanas de su síntesis, obteniendo Ag<sup>0</sup> 69.31%. Los resultados tienen relación con la investigación realizada por Menon et al., (2017), que mediante análisis EDX afirmaron la presencia de Ag<sup>0</sup> junto con cloro, carbono y oxígeno; mencionan que estos son grupos funcionales adsorbidos en las nanopartículas. También Srirangam y Parameswara (2017), realizaron una síntesis con extracto *Malachra capitata L.*, los cuales mostraron espectros EDX con un porcentaje de peso de plata de 70.36 % y carbono 35.13%, mencionan que la cantidad de Ag<sup>0</sup> en porcentaje representa la eficiencia de conversión. En la investigación que realizaron Femi et al., (2019), mostraron espectros EDX de AgNPs sintetizados con *Gleichenia pectinata (Willd.) C. Presl*, encontraron Ag<sup>0</sup> (16%) un pico característico de absorción óptica a 3 keV en presencia con otros elementos químicos como oxígeno (68%), silicio (12%), aluminio (5%), potasio (4%), mencionan que estos elementos sirvieron como agentes orgánicos de recubrimiento unidos a la superficie de las nanopartículas de plata.

El resultado de la medición del potencial Zeta de las AgNPs, dio -10 mV; al respecto Bhattacharjee et al., (2018), mencionan que esta técnica sólo evalúa los efectos electrostáticos e indica la carga superficial de las NPs, los valores Z de dispersión más

bajos conducirán a la agregación, la coagulación o la floculación debido a la atracción entre partículas de Van der Waals. Mientras que en las NPs con altos valores de potencial Z es contrario.

Este valor indicó evidentemente una carga negativa sobre la superficie de las AgNPs cuando esta dispersada en agua, también proporcionó evidencia satisfactoria sobre su poca tendencia a la agregación y la polidispersidad de la muestra, ya que según Elamawi et al., (2018), las AgNPs son de naturaleza polidispersa, debido a su alto potencial Zeta negativo; por lo tanto, la fuerza de repulsión electrostática entre ellos da como resultado la prevención de la aglomeración de las nanopartículas y también es muy útil para la estabilidad a largo plazo en la solución. Teniendo en cuenta que la síntesis se realizó a un pH alcalino, es posible que el valor Z de la muestra en un inicio de síntesis era superior a los resultados expuestos después de 14 semanas, esta posible disminución del valor Z se podría explicar referenciando la investigación realizada por Bélteky et al., (2019), quienes demuestran que los grupos funcionales presentes en las superficies de las nanopartículas pueden desprotonarse en soluciones básicas, lo que produce un aumento en la cantidad de carga superficial negativa de las partículas. Este incremento en la carga negativa de la superficie puede mejorar la repulsión electrostática entre las partículas, lo que disminuiría el tamaño promedio de los agregados y, por ende, explicaría los valores promedios negativos de potencial Z; adicionalmente mencionan que al agregar NaCl observaron agregación en sus muestras mediante análisis DLS; lo cual explican que estos cambios drásticos en la agregación se debió al aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$ , ya que en grandes cantidades estos iones pueden proteger los grupos superficiales cargados negativamente, proporcionando estabilización electrostática y con la disminución de la repulsión, las partículas podrían formar agregados más grandes tras la colisión. En

analogía, es posible que el valor Z disminuya en el tiempo debido a una posible oxidación de la superficie de las nanopartículas de plata a  $\text{Ag}^+$ , debido a la presencia de grupos funcionales en la superficie de las NPs que se unen al extracto acuoso y se ionizan electrostáticamente disminuyendo su capacidad de estabilización, aunque es importante señalar que la naturaleza atenuante de la matriz biológica nuevamente pudo evitar aumentos drásticos en el diámetro hidrodinámico, lo cual sugiere la existencia de la acción de protección de las biomoléculas presentes en el extracto de Queñua para estabilizar las NPsAg mediante la introducción de suficientes cargas negativas que mantienen todas las partículas alejadas unas de otras, lo cual explica que a pesar de 14 semanas y sin el uso de otro compuesto estabilizante aún se mantienen en solución coloidal estable manteniendo formas esféricas en tamaños nanométricos, pero con una tendencia a la aglomeración.

Los resultados expuestos guardan relación con la investigación que realizaron Feng et al., (2022), quienes sintetizaron NPsAg con extracto acuoso de *Glycyrrhizin* y reportaron valores Z de -16 mV el cual es atribuido con una relativa estabilidad coloidal en suspensión con poca tendencia a aglomerarse, también menciona que el Z negativo afirma la presencia de moléculas del extracto en la superficie de la AgNPs. Así mismo Pontaza et al., (2019), afirman que las biomoléculas de los extractos se unen a la superficie de las NPs y aumentan significativamente su carga superficial, lo que mejora su estabilidad al inhibir la agregación debido a la repulsión negativa-negativa; así mismo reportaron que para las AgNP sintetizadas con extracto acuoso de *Paulownia tomentosa* el valor Z fue  $31 \pm 0.79$  mV.

#### 4.5. Aplicación antibacteriana

En la Tabla 4.19 se muestra los resultados de los ensayos antibacterianos para las muestras de agua filtradas de la PTAR y con diferentes dosificaciones de AgNPs.

**Tabla 4.19**

*Ensayos de la aplicación antibacteriana para 500 mL de agua filtrada de la PTAR*

Ensayo	Dosificación de AgNPs (mL)	NMP coliformes totales /100 mL	NMP coliformes termotolerantes /100 mL	% de eliminación de bacterias
1	-	$33 \times 10^6$	$33 \times 10^6$	-
2	50	<1.8	<1.8	100
3	70	<1.8	<1.8	100
4	90	<1.8	<1.8	100
5	110	<1.8	<1.8	100
6	130	<1.8	<1.8	100

Los resultados del análisis bacteriológico de los coliformes totales y coliformes termotolerantes de la muestra de agua filtrada de la PTAR, resultó un valor de  $33 \times 10^6$  NMP/100 mL, mientras que aplicando las diferentes dosis de AgNPs dio por resultado un contenido de < 1.8 NMP/100 mL; lo cual refleja que al aplicar las AgNPs se eliminó el 100% de los coliformes totales y termotolerantes, lo que confirma lo reportado por Ticllacuri y Travezaño (2019), quienes indican que a tamaños nanométricos de las nanopartícula, se presenta mayor superficie de contacto, por ende, mayor será su actividad antibacteriana.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se comprobó la alta eficiencia de AgNP en el tratamiento antibacteriano, por tanto el cumplimiento de los límites máximos permisibles para los efluentes de la PTAR y los Estándares de Calidad Ambiental para Aguas de categoría 1 (El Peruano, 2008), que pueden ser potabilizadas por desinfección, que establece un nivel de 50 NMP/100 mL de coliformes totales para un agua apta para la

población.

Los resultados coinciden con Peña y Quispe (2022) quienes determinaron que con AgNPs de 22.4 nm con una polidispersidad de 0.148, obtuvieron mejores resultados en el tratamiento de aguas grises domésticas, aplicando una dosis de 10 mL de AgNPs en un tiempo de 75 minutos, logrando reducir los coliformes totales al 100%, mejorando con ello la calidad de las aguas grises.

Menon et al., (2017), mencionan que la acción antibacteriana de las AgNP, se debe a su capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana celular y la respiración de las células bacterianas. Las AgNP interactúan con grupos que contienen tiol, lo que genera especies reactivas de oxígeno y dañan la célula. Además, las AgNP pueden causar la formación de pequeñas depresiones o cavidades que se forman en la pared celular de las bacterias en la pared celular de las bacterias, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y provoca la muerte celular. También sugiere que las AgNP interactúan con enzimas y proteínas esenciales para la producción de ATP, lo que interrumpe la función celular y causa la muerte bacteriana.

La certificación de la acción antibacteriana se adjunta en el Anexo N°9.

## CONCLUSIONES

1. Se determinó los fenoles totales, los extractos acuosos presentaron menor concentración de compuestos fenólicos a comparación de los extractos hidroetanólicos al 50% y 70%. Por ende, el etanol es un solvente más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos de Queñua.
2. Del estudio de la biosíntesis de AgNPs en función de la temperatura, pH de biosíntesis y el tipo de extracto, se ha determinado que las mejores condiciones para replicar con facilidad y mejor control es de T:20 °C, pH:10 y extracto acuoso, así mismo se evidencio que las solas influencias de los niveles de las variables no tienen significancia en el tamaño de las AgNPs, sin embargo, las interacciones de los niveles si influyen significativamente en el tamaño de las AgNPs, siendo la interacción de cantidad de etanol y temperatura de síntesis la significativa.
3. La espectrofotometría UV-visible ha permitido determinar que las nanopartículas de plata sintetizadas tienen un pico de absorción en torno a 420 nm, lo cual es característico de las AgNPs de forma esférica, también se observó la estabilidad del tamaño en el tiempo, siendo las más estables las AgNPs sintetizadas con extracto acuoso. Con la técnica de DLS se obtuvieron tamaños hidrodinámicos de AgNPs, demostrando que las sintetizadas con extractos hidroetanólicos al 70% poseen un tamaño hidrodinámico en el rango de 69.34 nm a 2000 nm, los hidroetanólicos al 50% en un rango de 34.77 nm a 268.40 nm y los mejores tamaños hidrodinámicos se obtuvieron con extractos acuosos en un rango de 48.89 nm a 178.50 nm.
4. La técnica de SEM indican un tamaño promedio de 45.53 nm de las nanopartículas de plata biosintetizadas con extracto acuoso a temperatura de 20 °C y pH 10,

además la técnica EDX ha confirmado la presencia de plata en un 69.31% en las partículas sintetizadas y el valor del potencial Z de -10 mV indicando que tienen una carga superficial negativa moderada, debido a la presencia de grupos funcionales en la superficie de las partículas que contribuyen a la estabilidad coloidal teniendo un tamaño y forma uniforme.

5. Se ha demostrado el 100% de eliminación de bacterias (coliformes totales y termotolerantes) en la muestra de agua del afluente de la PTAR- Cusco con AgNPs biosintetizadas con extracto acuoso de Queñua.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar experimentaciones disminuyendo la concentración de  $\text{AgNO}_3$  a pH de 10 y temperatura de 20 °C con extractos acuosos y evaluar la influencia en el tamaño de las AgNPs.
2. Evaluar la eliminación de coliformes totales y termotolerantes con dosificaciones de AgNPs menores al 10% del volumen de la muestra a diferentes condiciones a las reportas en la presente investigación.
3. Se recomienda hacer análisis de DQO y DBO después de la dosificación de las AgNPs en las muestras de agua.
4. Realizar el análisis de caracterización de DLS y SEM inmediatamente después de realizar la biosíntesis, para tener así la diferencia precisa del tamaño real de la AgNP.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Cruz, D., C. Rodríguez, M., M., L. J., M. Herrera, V., G. Orive, A., y H. Creus, A. (2011). Nanopartículas Metálicas y Plasmones de Superficie: Una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*.
- Abregu Yactayo, S. (2021). *Tamizaje fitoquímico y evaluación antioxidante del extracto acuoso a diferentes temperaturas de hojas y corteza de Miconia barbeyana (PALIPERRO)*. Tingo Maria: Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Adeeyo, A., Edokpayi, J., Alabi, M., M. Msagati, T., y Odiyo, O. (2021). Plant active products and emerging interventions in water potabilisation: disinfection and multi-drug resistant pathogen treatment. *Clinical Phytoscience*, 7(31). Obtenido de <https://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-021-00258-4>
- Alarcón, H., Tolmos, M., Villacrés, N., y Huarote, E. (2021). Química verde una alternativa eco-amigable en la obtención de nanopartículas de Ag. *Rev Soc Quím Perú.*, 298-306.
- APHA-AWWA-WPCF. (1992). *Metodos Normalizados para el Analisis de aguas Potables y Residuales*. España : Diaz de Santos, SA.
- Aragón Manani, S. (2020). *Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de plata en matriz de arcilla chak'o y su actividad antimicrobiana en E. coli ATCC51813*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.]
- Asif, M., Yasmin, R., y Shehla, U. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and their Antibacterial Potential. *Sage Journals*, 20(2).
- Asmat Campo, D., Delfin Narciso, D., Juárez Cortijo, L., y Nazario Naveda, R. (2021).

Ecological and sustainable synthesis of silver nanoparticles from alcoholic extract of *Eucalyptus globulus*: Evaluation of alcoholic solvent influence (70° and 96°).

*IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 897. doi:10.1088/1755-1315/897/1/012014

Ávalos, A., Haza, A., Mateo, D., y Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *RCCV "Revista Complutense de Ciencias Veterinarias"*, 6-7.

Balbuena, L. M., Vivas, B. M., López, I. S., Lino, A. C., y García, J. C. (2020).

Antioxidantes naturales y su poder reductor frente a iones plata: alternativa en la recuperación de metales. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*.

Behravan, M., Hossein Panahi, A., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R., y Mirzapour, A. (2019). Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 148-154.

Bélteky, P., Rónavi, A., Igaz, N., Szerencsés, B., Y Tóth, I., Pfeiffer, L., . . . Kónya, Z.

(2019). Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 667-687.

Bhattacharjee, T., Castilho, M., y De Oliveira, I. (2018). FTIR study of secondary structure changes in Epidermal Growth Factor by gold nanoparticle conjugation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1862(3), 495-500.

Bofill Mas, S. C.-C.-G. (2005). Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista Española de Salud Pública*, 253-269.

- Botasini, S. (2016). *Estudio de la estabilidad de las nanopartículas y desarrollo de un sensor colorimétrico*. 2016: Universidad de la Republica Uruguay, Facultad de Química.
- Botasini, S. (2021). Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición. *INNITEC*(21). Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/6061/606164861001/html/>
- Caceda Quiroz, C. J. (2012). Evaluación de la Actividad Antibacteriana "in Vitro" del extracto alcohólico de las hojas de *Polylepis rugulosa* ("queilua") frente a cultivos bacterianos uropatógenos aislados en el hospital Hipólito Unanue - Tacna. *Ciencia y Desarrollo*, 51-58.
- Campos Pinilla, C. (2003). *Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas*. Ciudad de Mexico: Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIRA-UAEM).
- Cárdenas, G. G. (2013). *"Evaluación de bosques de Polylepis y plan de restauración ecológica en la microcuenca de cancha Cancha-Calca"*. [Tesis de Pregrado, Facultad de Biología, Escuela profesional de Biología, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.]
- Cardeno Calle, L., y E. Londoño, M. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *Soluciones de Postgrado*, 129-140. Obtenido de <https://revistas.eia.edu.co/index.php/SDP/article/view/604>
- Cartaya, O., y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivo Tropicales*, 5-14.
- Castaño Moreno, E., y Bernal Osorio, S. (2015). *Validación del método de ensayo de Coliformes totales y fecales por la técnica de Número más probable (NMP) en la*

- calidad del queso fresco producido a pequeña escala*. Pereira: Universidad Libre Seccional Pereira.
- Covinich, M. M., Scipioni, G. P., y Brusilovsky, D. L. (2020). *Resultados económicos y de sustentabilidad en sistemas en las ciencias agrícolas*. Argentina : Atena Editora.
- Cruz, D., Rodríguez, M., Juan, L., Herrera, V., Orive, A., y Creus, A. (2012). Nanopartículas Metálicas y Plasmones de Superficie: Una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 67-78.
- Cubas Villanueva, M. P., y Huaman Jimenez, D. (2018). *Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de Polylepis incana kunth*. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
- Cumbal, L., Kumar, B., Smita, K., y Debut, A. (2017). Green syntesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. *Saudi J Biol Sci*, 45-50. doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.006
- Domenech Gordillo, F. (2017). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de Ambrosia arborescens (marco) como reductor químico*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Durán, E. M., Moreno, D. H., Santiyán, M. P., Rodríguez, F. S., y López, M. P. (2021). *Las nanopartículas y sus aplicaciones biomédicas*. España: Universidad de Extremadura.
- E.Medina, M., E.Galván, R., y E.Reyes, G. (Marzo de 2015). Las nanopartículas y el medio ambiente. *sciELO*. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-48212015000100005&lng=pt&nrm=isoyt&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-48212015000100005&lng=pt&nrm=isoyt&lng=es)
- Egga Agustina, T., Handayani, W., y Imawan, C. (2020). The UV-VIS Spectrum Analysis

- From Silver Nanoparticles Synthesized Using *Diospyros maritima* Blume. Leaves Extract. *Advances in Biological Sciences Research*, 14, 411-419.
- El Peruano . (17 de Marzo de 2010). *Aprueba Límites Máximos Permisibles*. Lima .
- El Peruano. (2008). *Aprueban los Estandares Nacionales de calidad Ambiental para Agua*. Lima.
- Elamawi, R., Al Harbi, R., y Hendi, A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(28).
- Eman H., I., Mostafa M., H., y Khaled Z., E.-B. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 1131-1139.
- Esquivel Figueredo, R., y Mas Diego, S. M. (2021). Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie *Trichoderma*. *Revista Cubana de Química*, 33(2), 23-45.
- Faridul Hasan, K., Xiaoyi, L., Shaogin, Z., Bak, M., y Alpár, T. (2022). Functional silver nanoparticles synthesis from sustainable point of view: 2000 to 2023 – A review on game changing materials. *Heliyon*, 8(12).  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12322>.
- Femi Adepoju, A., Oluwasogo Dadá, A., Opeyemi Otun, K., Olufemi Adepoju, A., y Paul Fatoba, O. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using terrestrial fern (*Gleichenia Pectinata* (Willd.) C. Presl.): characterization and antimicrobial studies. *Heliyon*, 5(4).
- Feng, A., Cao, J., Wei, J., Chang, F., Yang, Y., y Xiao, Z. (2018). Facile synthesis of silver nanoparticles with high antibacterial activity. *Materials*, 11(12:2498).

- Feng, D., Zhang, R., Zhang, M., Fang, A., y Shi, F. (2022). Synthesis of eco-friendly silver nanoparticles using *Glycyrrhizin* and evaluation of their antibacterial ability. *Nanomaterials*, 12(2636).
- Filimon, A., Onofrei, M., Bargan, A., Luliana, S., y Dunca, S. (2023). Bioactive materials based on Hydroxypropyl Methylcellulose and silver nanoparticles: structural-morphological characterization and antimicrobial testing. *Polymers*, 15(7), 1625.
- Flórez, S. M., Gallego, J. G., Culebras, J. M., y Tuñón, M. J. (202). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.
- Forero, J. E. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada. *CTyF-Ciencia tecnología y futuro*, 97-109.
- Gabriela Fernanda, N. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (ruta graveolens), con alto contenido de polifenoles*. Quito.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A. (s.f.). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu*. Valencia: ETSIAMN. Universidad Politècnica de València. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%c3%adnez%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Garzón Gómez, M. (15 de Agosto de 2018). *Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis Verde*. Obtenido de <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/191/209>
- Geeta Arya R, K. M. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Prosopis juliflora* bark extract: reaction optimization, antimicrobial and catalytic activities. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 985-993. doi:<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1354302>

- Gimerno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Actualidad Profesional*, 80-84. Obtenido de - <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
- Gómez, G. L. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad vol.2*.
- Gutiérrez Avella, D., Alberto Ortiz, C., y Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología 2008*. Obtenido de [https://www.cenam.mx/simposio2008/sm\\_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf](https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf)
- Guzman Carissimi. (2015). *Nanopartículas de plata para su uso como agente antibacteriano. Uruguay. [Tesis de grado, Universidad de la Republica Uruguay, Facultad de Ciencias]*.
- Haytham M.M. Ibrahim. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Banana peel* extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 265-275. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007>.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). (2015). Libro de *Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales*. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT).
- ISO. (2017). Organización Internacional de Normalización. *ISO 22412:2017(en) Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS)*. Obtenido de ISO.org: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22412:ed-2:v1:en>

- Jordá Sierra, A. (2015). Los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales para superar situaciones de estrés abiótico. *TERRALIA*, 44-52.
- Joudeh, N., y Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(262).
- Kartini Kartini, Alviani, A., Anjarwati, D., Finna Fanany, A., Sukweenadhi, J., y Avanti, C. (2020). process optimization for green synthesis of silver nanoparticles using Indonesian medicinal plant extract. *Processes*, 8(8:998).
- Khan Vu, N., Zille, A., Ribeiro Oliveira, F., Carneiro, N., y Pedro Souto, P. (2013). Effect of deposition onto dielectric barrier discharge particle size on silver nanoparticle (DBD) plasma functionalized polyamide fabric. *Plasma Processes and Polymers*, 10(3), 285-296. doi: <https://doi.org/10.1002/ppap.201200089>
- Koehler, J., Visaveliya, N., y Knauer, A. (2014). Controlling formation and assembling polarization, and electrochemical potential of nanoparticles by control of electrical charging. *Nanotechnol*, 3(6), 553-568.
- Lao Magin, R., Zevallos Pollito, P., y De la Cruz Silva, H. (1990). *Información preliminar de la Ecología, Dendrología y distribución geográfica de las especies del género Polylepis en el Perú*. Lima: PUCP. Obtenido de <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/espacioydesarrollo/article/view/7882>
- Liu, H., Huan, Z., Jie, W., y Junfu, W. (2020). Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: Deep insight into microscopic kinetics analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1011-1019.
- Magin, R. L., Pollito, P. Z., y Silva, H. d. (s.f.). *Información preliminar de la ecología, dendrología y distribución geográfica de las especies del género Polylepis en el*

*Perú.*

Malvern Panalytical. (4 de Noviembre de 2017). Obtenido de

[www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com)

Marchand Pajares, E. O. (2002). *Microorganismos Indicadores de la Calidad de Agua de Consumo Humano en Lima Metropolitana*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Martinez M., F., Zuñiga G., E., y Sanchez Lafarga, A. K. (2021). Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *Mundo nano*, 10(6), 103-108.

doi:<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2013.10.50967>

Mena Valdés, L., Tamargo Santos, B., Salas Olivet, E., Plaza Parede, L., y Blanco

Hernández, Y. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.

Mendoza, B. E., Palacios, M. P., Vizuete, S. N., y Larreta, F. S. (2022). Actividad

Antioxidante, Polifenoles Totales y Tamizaje Fitoquímico de Chilangua (*Eryngium Foetidum*). *RECIAMUC*.

Mendoza, W., y Cano, A. (2011). Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae,

*Sanguisorbeae*) en los Andes peruanos. *Rev. Perú. biol. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM*, 1-3.

Mendoza, W., y Cano, A. (2011). Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae,

*Sanguisorbeae*) en los Andes peruanos. *Revista Peruana de Biología*, 197-200.

Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727->

99332011000200011yscript=sci\_arttextylng=en

- Menon, S., Agarwal, H., Rajesh Kumar, S., y Kumar, V. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plant *Acalypha* leaf extracts and its application as an antioxidant and antimicrobial agent against foodborne pathogens. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(5), 42-50.
- Millán, F. (2016). *Libro de Espectroscopía UV Visible*.
- Morales, J., Morán, J., Quintana, M., y Estrada, W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta Sol-Gel a partir de nitrato de plata. *Sociedad Química Perú*, 177-184.
- Moreno Vargas, J. M. (2021). *Síntesis verde de nanopartículas de plata para aplicaciones como fungicida en los fitopatógenos Fusarium solani y/o Rhizopus stolonifer que atacan la planta de aguacate*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia .
- Mostacedo, B., y Fredericksen, T. (2000). *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. Santa Cruz de la Sierra: El País.
- Moyo, M. G. (2015). Afzelia quanzensis bark extract for green synthesis of silver nanoparticles and study of their antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 329-338. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s40090-015-0055-7>
- Muñoz C., W., C. Pabon, L., y Chavez R., W. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (Campomanesia). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 38-46.
- National Human Genome Research Institute. (10 de Abril de 2023). National Human Genome Research Institute. *Glosary of genomic and genetic terms*. Bethesda, Maryland, E.E.U.U. Obtenido de National Human Genome Research Institute:

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria#:~:text=Definici%C3%B3n,extremas%20de%20temperatura%20y%20presi%C3%B3n>.

Nazeruddin, G., Prasad, N., Prasad, S., Shaikh, Y., Waghmare, S., y Adhyapak, P. (2014).

El extracto de semilla de *Coriandrum sativum* ayudó a la síntesis verde in situ de nanopartículas de plata y su actividad antimicrobiana. En *Industrial Crops and Products*. Elsevier.

Ojeda Guzzini, M. (2015). *Tratamiento de agua potable*. Madrid: Elearning S.L.

Organización Mundial de la Salud. (2006). *Guías para la calidad del agua potable*.

Pandey, A., y Kumar, S. (2013). Perspective on Plant Products as Antimicrobials Agents: A Review. *Pharmacologia*, 4(7), 469-480.

Pardo, L., Arias, J., y Molleda, P. (2022). Elaboración de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y su uso como conservante. *La granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 35(1), 1-14.  
doi:<https://doi.org/10.17163/lgr.n35.2022.04>

Patcharapon, T., Nutthakritta, P., y Parichart, B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*, 4. doi:10.7717/peerj.2589

Patil, R., y Chougale, A. (2021). Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review. *Materials Today: Proceedings*, 47(16), 5520-5532.

Paulkumar, K., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Pavunraj, M., y Annadurai, G. (2017). Green synthesis of silver nanoparticle and silver based chitosan bionanocomposite using stem extract of *Saccharum officinarum* and assessment of its antibacterial activity.

*Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8.

- Peña Pecho, J., y Quispe Cutipa, D. (2022). *Tratamiento de aguas grises domésticas mediante nanopartículas sintetizadas con el Agave americana L. Comas, Lima 2022*. [Tesis de pregrado, Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería, Ingeniería Ambiental].
- Pérez Nájera V.C, L. C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta risso*) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 18-22.
- Pontaza Licon, Y., Ramos Jacques, A., Cervantes Chávez, J., López Miranda, J., Ruíz Baltazar, Á., Maya Cornejo, J., y Rodríguez Morales, A. (2019). Alcoholic extracts from *Paulownia tomentosa* leaves for silver nanoparticles synthesis. *Results in Physics*, 12, 1670-1679. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.01.082>.
- Prashant K. Jain, X. H.-S.-S. (2008). Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research*.
- Pucurimay Dalia, P. J. (2018). Diferencias en la presencia de alcaloides y fenoles de cinco muestras de muña de expendio informal procedentes de mercados populares en Lima - Perú. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(3), 25-29.
- Pulluquitin Tituaña, G. I. (2013). “*Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación flor de campo en la estancia y Mushukwiñary en tambalo de pasa, para promover su desarrollo*”. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Ramos Colina, A. C. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa*

*de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco).*

Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Ranko Dragović, B. G. (2014). Assessment of the impact of geographical factors on the spatial distribution of heavy metals in soils around the steel production facility in Smederevo (Serbia). *Journal of Cleaner Production* , 550-562.

doi:10.1016/j.jclepro.2014.03.060

Reddy Bogireddy, N. (2020). *New bio-nanomaterials for environmental remediation.*

Cuernava: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

doi:10.13140/RG.2.2.30330.93122

Requejo Roque, K. (2014). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con quitosana como agente reductor y estabilizador.* Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.

Reynaldo, O. C. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.*

Riaz, M., Mutreja, V., Sareen, S., Ahmad, B., Faheem, M., Zahid, N., . . . Park, J. (2021).

Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature. *Scientific Reports*. Obtenido de <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82555-z>

Rodríguez Díaz del Castillo, F. (2012). *Introducción a los Nanomateriales.* Cuautitlán Izcalli.

Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., y Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus*

- extracts). *Nanoscale Research Letter*. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-318>
- Sánchez Moreno, M. (2017). *Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos*. Madrid: Universidad Nacional de Educación.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol*, 7(8), 979-990.
- Serena Domingo, P. A. (2010). *La nanotecnología*. Madrid: Catarata.
- Servat Grace P., M. W. (2002). Flora y fauna de cuatro bosques de *Polylepis* (rosaceae) en la cordillera del vilcanota (Cusco, Perú). *Ecología Aplicada*, 11.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., y Poinern, G. E. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, 8(11).
- Shaheed, A., R. Templeton, M., L. Matthews, R., K. Tripathi, S., y Bhattarai, K. (2009). Disinfection of waterborne coliform bacteria using *Luffa cylindrica* fruit and seed extracts. *Environ Technology*, 30(13), 1435-1440.
- Shahidi, F., y Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods*, 820-897.
- Sharanappa, A., Anil R., S., Laxmikant R., P., Veeresh S., H., y Santosh, K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and their application as antibacterial agent. *International Journal Of Research Inpharmaceutical Sciences*, 11(3), 4726-4732.
- Sharma Kumar, N., Vishwakarma, J., Rai, S., S. Alomar, T., AlMasoud, N., y Bhattarai, A. (2022). Green Route Synthesis and Characterization Techniques of Silver

- Nanoparticles and Their Biological Adeptness. *ACS Omega*, 7(31), 27004-27020.
- Singh, S., Bhardi, A., y Kumar Meena, V. (2015). Green synthesis of multi-shaped silver nanoparticles: optical, morphological and antibacterial properties. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 26, 3638-3648.
- Singh, P., Yeon Ju, K., Singh, H., Wang, C., Hyon Hwang, K., El-Agamy Farh, M., y Chun Yang, D. (2015). Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2567-2577.  
doi:<https://doi.org/10.2147/IJN.S72313>
- Sista Kameswara, S., Deen Dayal, G., Dan Bahadur, P., Pradeep Kumar, M., y Siddh Nath, U. (2016). Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A. *Green and Sustainable Chemistry*, 6(1), 34-56.
- Srika, S. K., Giri, D. D., Pal, D. B., Mishra, P. K., y Upadhyay, S. N. (Febrero de 2016). Síntesis verde de nanopartículas de plata: una revisión. *Scientific Reseach An Academic Publisher*, 35-39.
- Srirangam, G., y Parameswara Rao, K. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Malachra capitata* (L.). *Rasayan Journal*, 10(1), 46-53.
- Talavera Núñez, M. E., Zea Apaza, I., Vera Gonzales, C., Zea Álvarez, J., y Benavente Talavera, L. (2018). Aplicación del nanocomposito arcilla - carboximetilquitosano - nanopartículas de plata en filtros para el tratamiento de aguas de consumo de zonas rurales de Camaná, Arequipa. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 499 - 512.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2023). *Thermo Fisher Scientific Inc.* Obtenido de <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/materials-science/eds-technology.html#:~:text=La%20espectroscopia%20de%20rayos%20X,qu%C3%AD>

mica%2Fan%C3%A1lisis%20elemental%20de%20materiales.

Ticllacuri Perales, V., y Travezaño Neyra, E. (2019). *Caracterización de Nanopartículas de Plata obtenidas mediante síntesis biogénica usando extracto de Coffea arabica procedente de Satipos -Junín para uso antimicrobiano*. 2019: Universidad Nacional del Centro del Perú.

*Universidad de Alicante* . (20 de Diciembre de 2018). Obtenido de

<https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x-de-monocristal-y-espectroscopias-vibracional-y-óptica/espectroscopía-ultravioleta-visible.html>

Uribe, G. M., y Rodríguez-López, J. L. (2007). *La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso*. México : Perfiles Latinoamericanos 29.

Urnukhsaikhan, E., Bold, B. E., Gunbileg, A., Sukhbaatar, N., y Mishig-Ochir, T. (2021).

Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*. *Scientific Reports*. Obtenido de <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00520-2>

Urnukhsaikhan, E., Bold, B. E., Gunbileg, A., Sukhbaatar, N., y Mishig-Ochir, T. (2021).

Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*. *Scientific Reports*, 11(21047). Obtenido de <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00520-2>

Vera Nuñez, L., y Tamo Cornejo, J. (2018). *Biosíntesis y caracterización de*

*nanopartículas de plata (AgNPs) con Thelypteris glandulosolanosa (Raqui-Raqui) y evaluación de su efecto anticancerígeno en línea celular de cáncer de mama MCF-7*. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín.

Vilana, L. (Junio de 2021). *PUCE*. Obtenido de

<https://bioweb.bio/galeria/Foto/Polylepis%20pauta/Registros%20fotogr%C3%A1fic>

os/487687

- Villanueva, M. P., y Jiménez, D. A. (15 de noviembre de 2018). *Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de Polylepis incana Kunth*. Obtenido de <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/3334>
- Walpole, R., Myers, S., Myers, R., y Ye, K. (2012). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. México: Pearson Education.
- XC, Jiang, WM, C., CY, C., SX, X., y AB, Y. (2011). Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles Through a Synergetic Reduction Approach. *Nanoscale Res Letters*. doi: 10.1007/s11671-010-9780-1
- Yousaf, H., Mehmood, A., Ahmad, K., y Raffi, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles and their applications as an alternative antibacterial and antioxidant agents. *Materials Science and Engineering: C*, 112(110901). doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110901>
- Zahir Shah, M., Guan, Z.-H., Ud Din, A., Ali, A., Ur Rehman, A., Jan, K., Adnan, M. (2021). Synthesis of silver nanoparticles using *Plantago lanceolata* extract and assessing their antibacterial and antioxidant activities. *Scientific Reports*, 11(20754).
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundonano, Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Zimmerman, J., y Mihelcic, J. (2012). *Ingeniería ambiental: fundamentos, sustentabilidad*. México: Alfaomega.
- Zuorro, A., Lannone, A., Natali, S., y Lavecchia, R. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Bilberry and Red Currant Waste Extracts. *Procesos de Separación y Extracción Verde*, 7(4:193).

## APÉNDICES

### Apéndice N°1, Recolección de muestra de Queuña



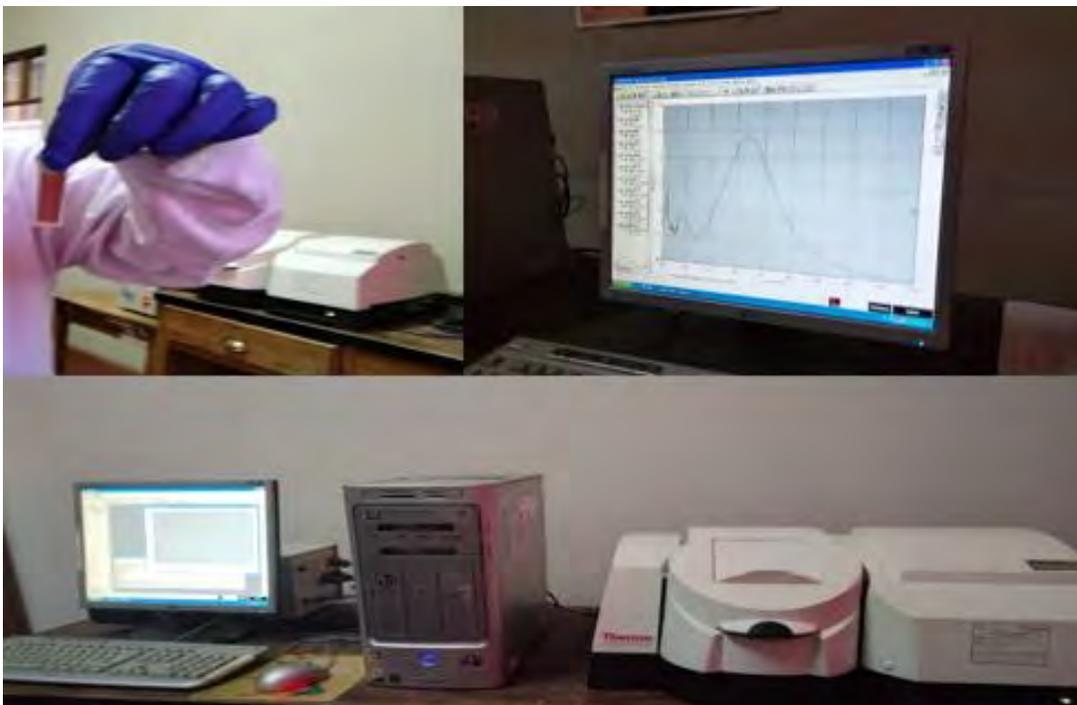
## Apéndice N°2, Procedimiento de preparación de extractos



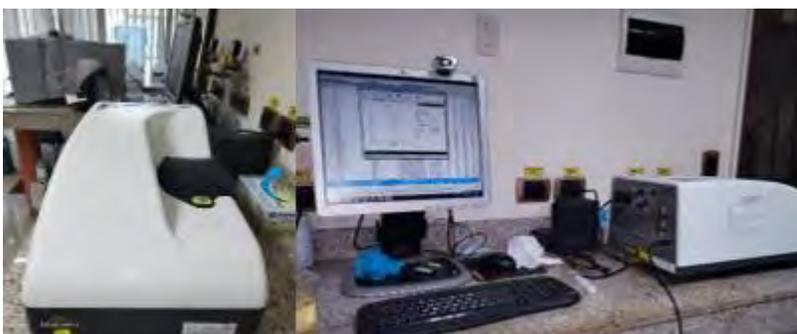
**Apéndice N°3, Imágenes de la determinación de compuestos fenólicos totales**

*Nota :* a) Extractos hidroetanólico a 50% ,70% y extracto acuoso de *Polylepis racemosa Ruiz y Pav*, b) Reactivo Folin – Ciocalteu phenol reagent, c) Pesado de ácido gálico y carbonato de sodio, d) Disolución de carbonato de sodio , reactivo Folin - Ciocalteus y ácido gálico, e) Tubos de ensayo con las diluciones de los extractos, carbonato de sodio, Folin - Ciocalteu y la preparación de la curva patrón con ácido gálico, se dejó reposar por 90 minutos y f) Espectrometro de UV – visible.

**Apéndice N°4, Imágenes de las preparaciones de muestra de nanopartículas de plata  
con UV-Visible, DLS y SEM**



*Nota:* Preparación de muestras y lectura por espectrometría UV-visible en el laboratorio de Físicoquímica de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.



*Nota:* Preparación de muestras y lectura de tamaño de nanopartículas por DLS en el Laboratorio de la empresa NEOTEC CIENTIFICA S.A. en la ciudad de Lima.



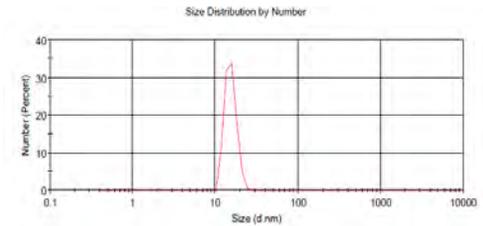
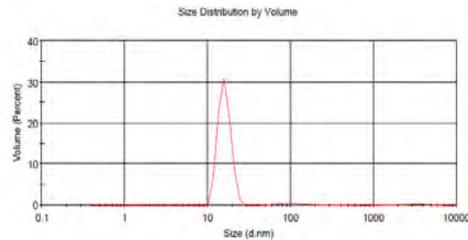
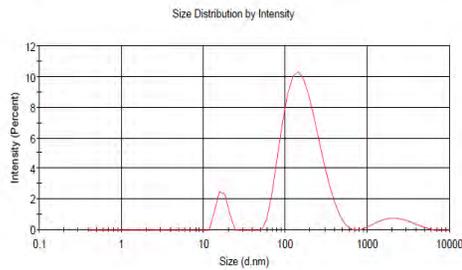
*Nota:* Preparación de muestras y lectura de las AgNp en el SEM.

Apéndice N°5, Reporte de Dispersión de luz Dinámica (DLS)

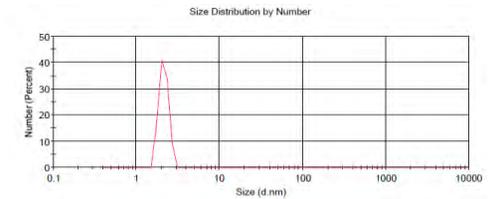
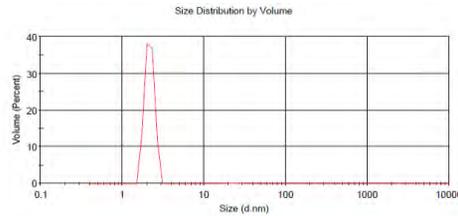
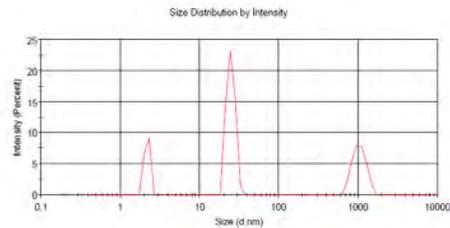
DIAGRAMAS DE LAS LECTURAS DE LA DISPERSION DINAMICA DE LA LUZ (DLS) / NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO ACUOSO

N° ENSAYO	Distribución de tamaño por Intensidad	Distribución de tamaño por Volumen	Distribución de tamaño por Número
-----------	---------------------------------------	------------------------------------	-----------------------------------

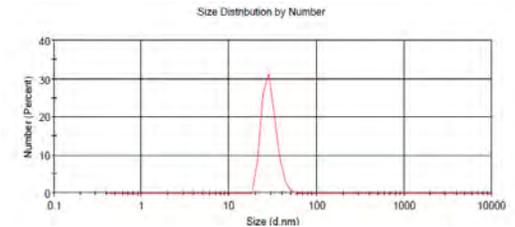
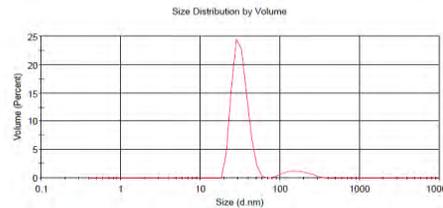
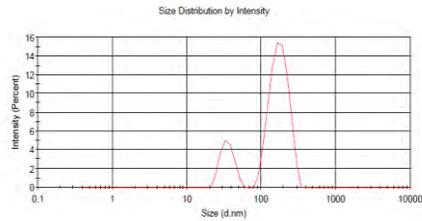
8



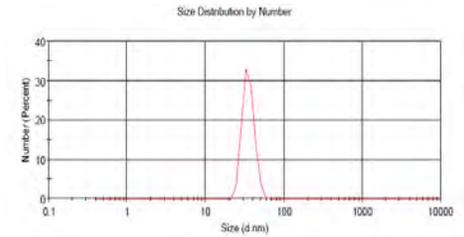
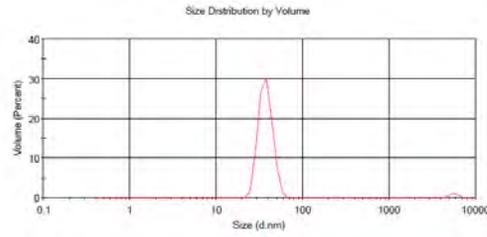
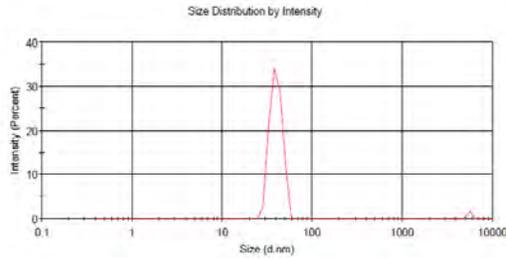
9



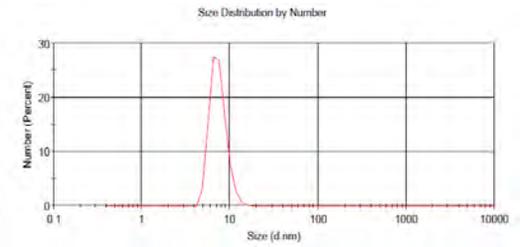
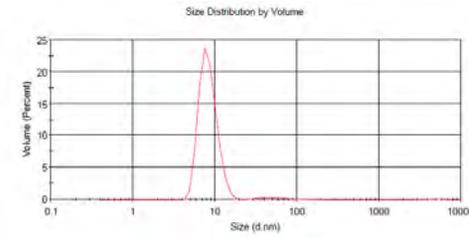
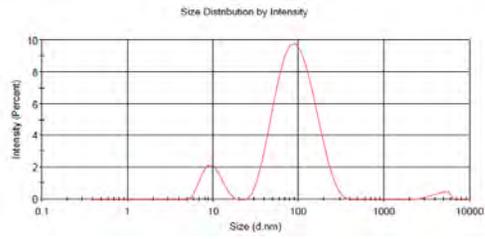
11



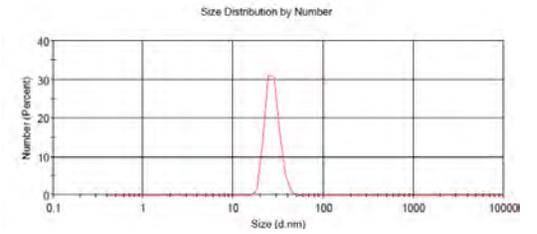
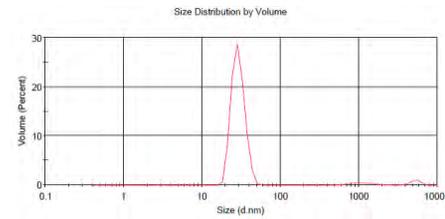
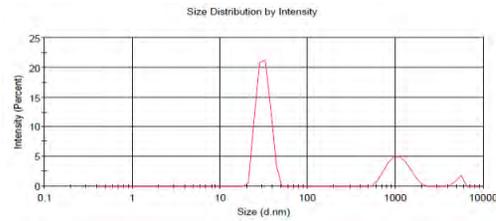
15



16



18



Elaboración usando el software Size Distribution Report MALVERN

**LECTURAS DE LA DISPERSION DINAMICA DE LA LUZ (DLS) / NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON  
EXTRACTO ACUOSO**

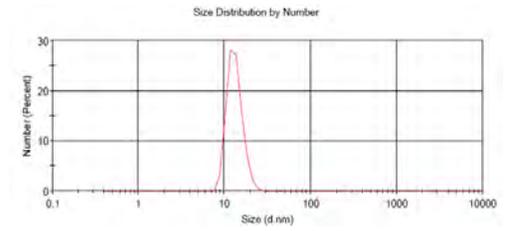
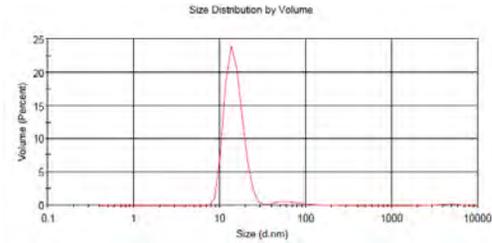
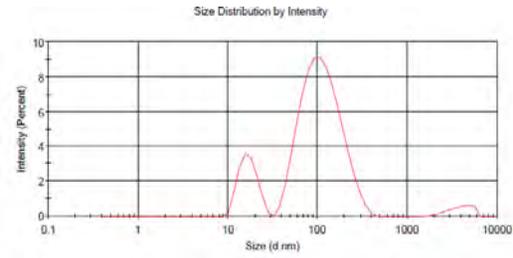
N° ENSAYO	Distribución de tamaño por Intensidad				Distribución de tamaño por Volumen			Distribución de tamaño por Número		
	Pico	Tamaño (dnm)	% Intensidad	St Dev (dnm)	Tamaño (dnm)	% Volumen	St Dev (dnm)	Tamaño (dnm)	% número	St Dev (dnm)
8	1	173.3	86.5	86.52	152.5	4.7	15.6	15.31	10	2.47
	2	16.9	7.1	2.337	16.07	92.8	2.745	83.16	0	30.09
	3	2357	6.4	1036	3094	2.5	1278	0	0	0
9	1	24.85	1036	2195	2.172	99.7	0.2765	2.138	100	0.2704
	2	54.3	29.9	15.8	23.98	0.3	3.7333	0	0	0
	3	2.989	197.3	0.1567	0	0	0	0	0	0
11	1	177.5	80.9	48.4	169.2	8	56.65	129.1	0.1	10.12
	2	35.31	19.1	7.07	31.77	92	6.921	29.06	99.9	5.661
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1	39.77	98.2	5.914	39.77	97.4	6.789	35.3	100	6.133
	2	5560	1.8	6.1E-04	5590	2.6	5.8E+02	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	102	88.4	51.46	58.67	2.3	32.22	7.44	100	1.634
	2	9.838	9.8	2.392	8.417	97.5	2.114	40.14	0	12.9
	3	4457	1.8	897.7	4789	0.2	953.6	0	0	0
18	1	31.47	70.5	5.271	29.24	94.6	5.617	27.33	100	4.889
	2	1097	26.4	305.5	1123	2.8	351.6	0	0	0
	3	5196	305.5	475.1	5303	2.6	704.6	0	0	0

Elaboración usando el software Size Distribution Report MALVERN

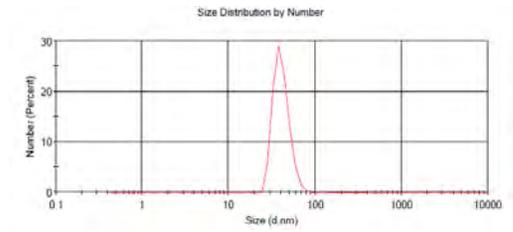
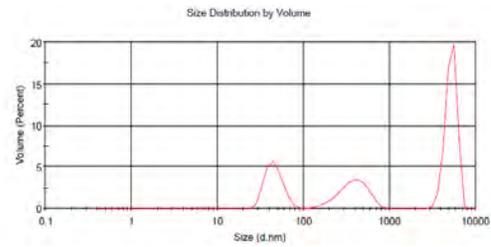
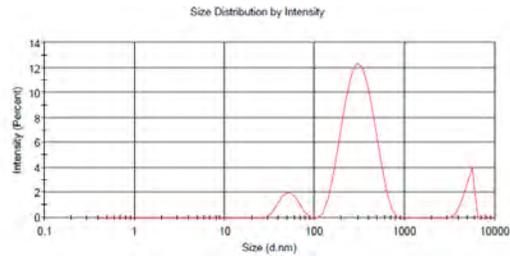
**DIAGRAMAS DE LAS LECTURAS DE LA DISPERSION DINAMICA DE LA LUZ (DLS)/NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO HIDROETANÓLICO A 50°**

N° ENSAYO	Distribución de tamaño por Intensidad	Distribución de tamaño por Volumen	Distribución de tamaño por Número
2			
5			
7			

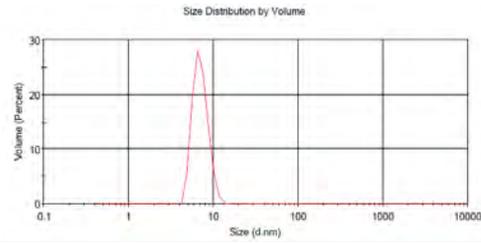
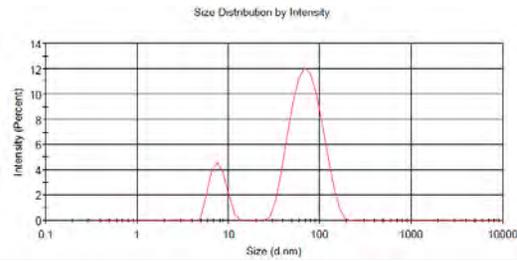
10



12



17



Elaboración usando el software Size Distribution Report MALVERN

**LECTURAS DE LA DISPERSION DINAMICA DE LA LUZ (DLS) /NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO  
HIDROETANÓLICO A 50°**

N° ENSAYO	Distribución de tamaño por Intensidad				Distribución de tamaño por Volumen			Distribución de tamaño por Número		
	Pico	Tamaño (dnm)	% Intensidad	St Dev (dnm)	Tamaño (dnm)	% Volumen	St Dev (dnm)	Tamaño (dnm)	% número	St Dev (dnm)
2	1	83.27	81.1	32.92	57.31	6.5	22.9	12.12	99.9	2.421
	2	14.96	12.7	3.097	13.35	91.2	3.036	43.52	0.1	12.71
	3	4516	6.2	870.4	4826	2.2	935.1	0	0	0
5	1	84.66	91.1	25.39	67.15	6.8	21.77	54.37	0.1	14.73
	2	14.43	8.9	2.926	12.85	93.2	2.917	11.57	99.9	2.424
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	385.8	71.2	137.3	465.8	28.3	156.6	51.77	99.7	13.29
	2	77.42	23.2	23.23	62.18	28.3	19.06	324.7	0.3	126.2
	3	5195	5.6	477.3	5300	43.4	705.3	0	0	0
10	1	120.8	81.3	61.61	75.9	4.2	46.13	13.3	99.9	2.837
	2	17.07	15.2	3.915	14.89	94.5	3.59E+00	53.69	0.1	15.91
	3	3950	3.5	1100	4480	1.2	1104	0	0	0
12	1	324.9	83.6	118.6	394.4	23.2	142.4	41.06	99.7	8.858
	2	52.5	8.5	11.46	46.15	23.4	11.2	252.2	0.3	108.3
	3	5042	8	586.9	5189	53.4	760.4	0	0	0
17	1	75.38	83.3	28.38	52.95	1	20.19	6.573	100	1.227
	2	7.836	16.7	1.508	7.116	99	1.486	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaboración usando el software Size Distribution Report MALVERN

**DIAGRAMAS DE LAS LECTURAS DE LA DISPERSION DINAMICA DE LA LUZ (DLS)/NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO HIDROETANÓLICO A 70°**

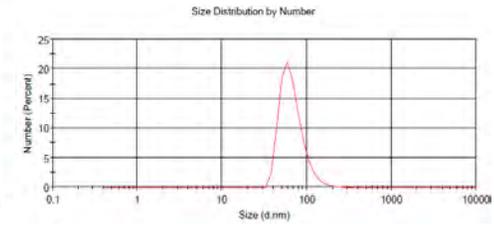
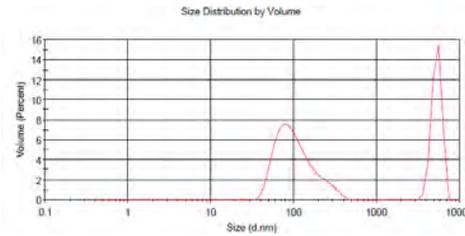
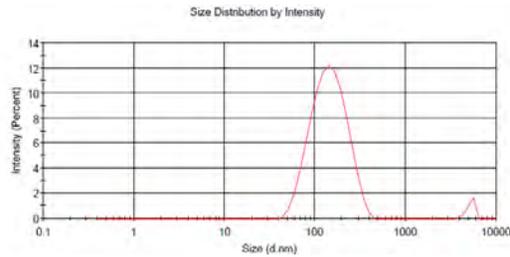
**N°  
ENSAYO**

**Distribución de tamaño por Intensidad**

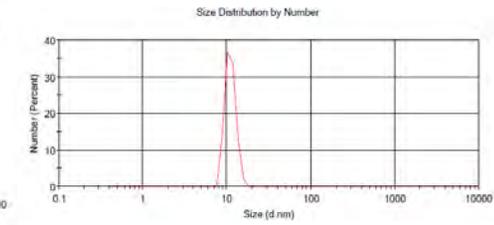
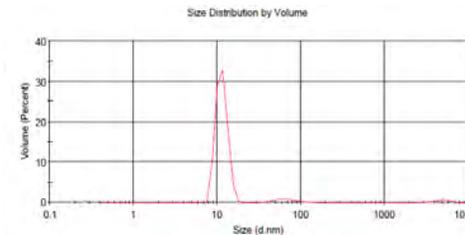
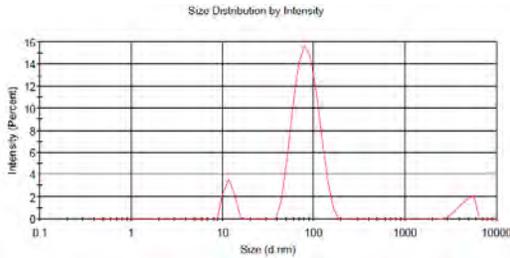
**Distribución de tamaño por Volumen**

**Distribución de tamaño por Número**

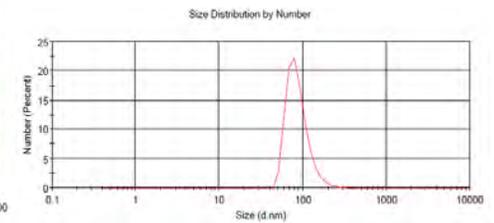
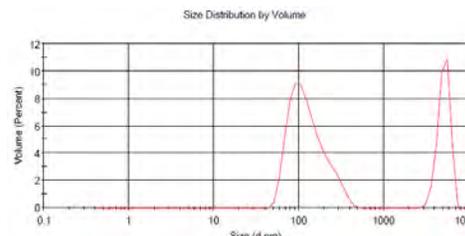
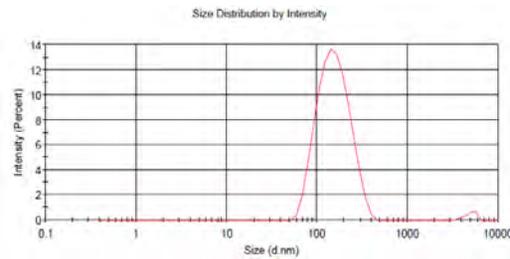
1



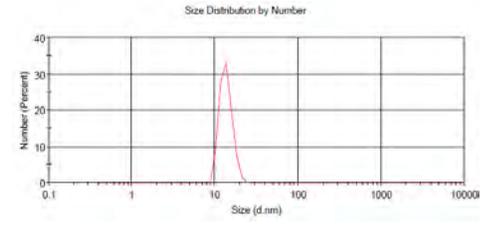
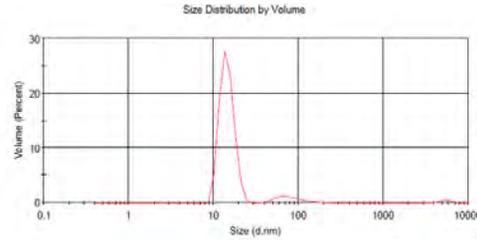
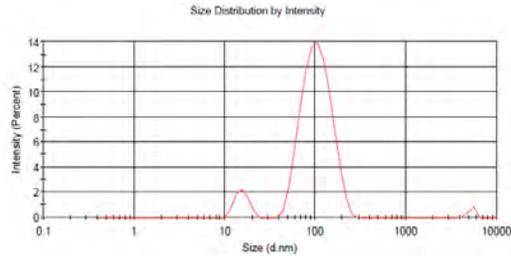
3



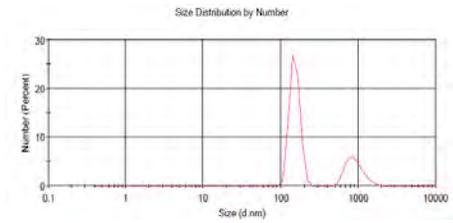
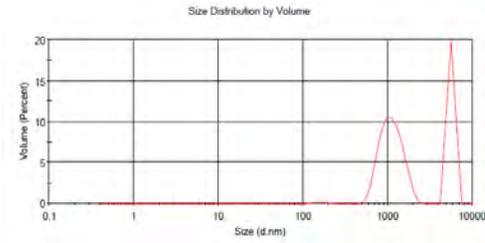
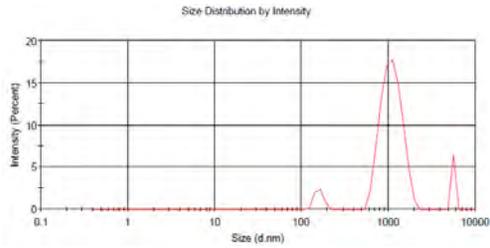
4



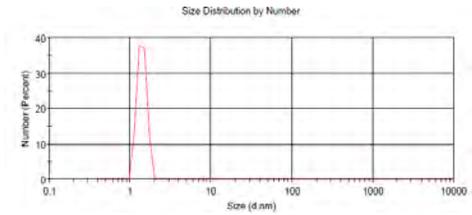
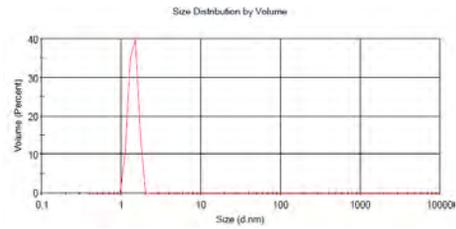
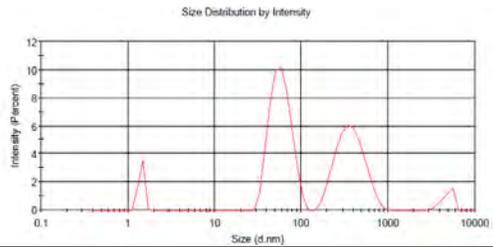
6



13



14



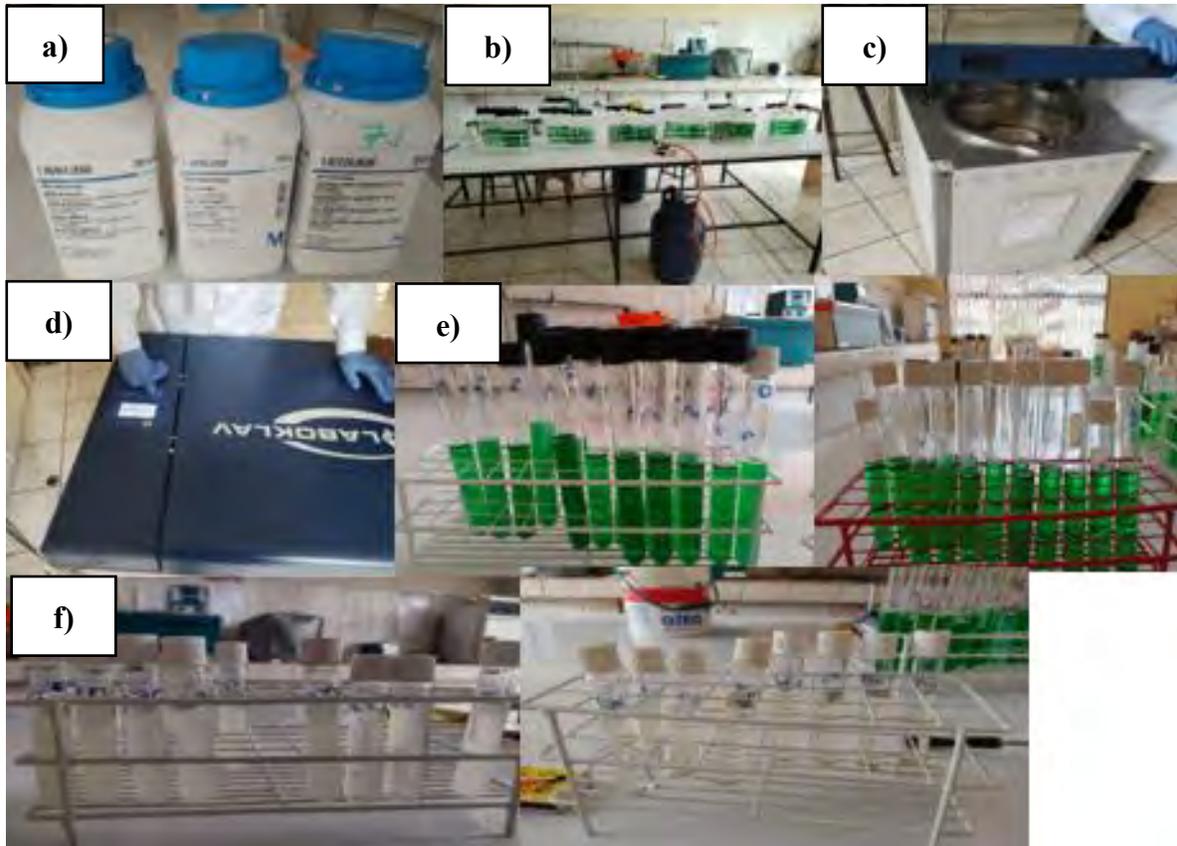
Elaboración usando el software Size Distribution Report MALVERN

**LECTURAS DE LA DISPERSION DINAMICA DE LA LUZ (DLS) / NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO  
HIDROETANÓLICO A 70°**

N° ENSAYO	Distribución de tamaño por Intensidad				Distribución de tamaño por Volumen			Distribución de tamaño por Número		
	Pico	Tamaño (dnm)	% Intensidad	St Dev (dnm)	Tamaño (dnm)	% Volumen	St Dev (dnm)	Tamaño (dnm)	% número	St Dev (dnm)
1	1	153.6	97.2	66.47	116.3	61.7	68.75	68.43	100	23.35
	2	5192	2.8	479.1	5298	36.6	706.2	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	85.06	84.8	25.03	68.99	4.1	21.21	11.05	100	1.616
	2	11.83	8.4	1.408	11.43	93.6	1.761	57.57	0	14.48
	3	4616	6.8	819.7	4891	2.3	902.3	0	0	0
4	1	161.7	98.2	64.02	137.4	68.5	70.89	88.08	100	30.7
	2	4942	1.8	640.8	5114	31.5	792.3	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1	108.5	91.6	38.75	81.85	7.1	32.04	13.64	99.9	2.407
	2	15.64	7.1	2.566	14.56	91.5	2.77E+00	62.35	0.1	18.26
	3	5248	1.4	443.7	5342	1.4	688.5	0	0	0
13	1	1107	88.2	293.5	1130	59.8	338.6	914.2	26.7	256
	2	5560	6.5	0	5590	39.6	579.8	5590	0.1	579.8
	3	158.8	5.3	17.66	157.4	0.6	24.15	151.9	73.3	22.82
14	1	58.95	50.9	15.87	1.425	100	0.1812	1.402	100	0.1795
	2	383	39.9	137.5	49.07	0	13.55	0	0	0
	3	1.44	5.2	0.09962	0	0	0	0	0	0

Elaboración usando el software Size Distribution Report MALVERN

**Apéndice N°6, Preparación de caldos para los análisis de coliformes totales y termo  
tolerantes**



*Nota :* a) Reactivos: caldo verde brillante- bilis- lactosa, caldo EC y agua peptonada (tamponada ), b) Caldos preparados, c) y d) Autoclave con los caldos preparados, e) Resultados de coliformes totales del afluente de la PTAR, f) Resultados de coliformes termotolerantes del afluente de la PTAR

## ANEXOS

## Anexo A, Certificado de determinación taxonómica de Queñua



## UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL  
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO  
Calle Tigre N° 127  
Teléfonos: 222271 - 234891 - 234181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA  
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232170 - 232375 - 252226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210  
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL  
Plaza de Armas s/n  
Teléfono: 227571 - 225721 - 234015
- MUSEO INKA  
Cuesta del Almirante N° 105 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA  
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"  
Av. De la Cultura N° 721  
"Estudio Universitario" - Teléfono: 227192

## HERBARIO VARGAS CUZ

## CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 06-2023-HVC-FCB-UNSAAC

La Directora del Herbario Vargas CUZ, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la señorita **Nataly Gutierrez Sierra**, bachiller de la Carrera Profesional de Ingeniería Química, con DNI N° 72958420; ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ, una muestra botánica para su determinación taxonómica (expediente N° 505411), para realizar el proyecto de tesis "**BIOSINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUEÑUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR - CUSCO (Resolución n°889-2022-FIP-UNSAAC)**", la que al ser diagnosticada por el Mgt. Abel Monteagudo Mendoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del herbario, concuerdan con las siguientes especies; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE LOCAL
1	Rosaceae	<i>Polylepis racemosa</i> Ruiz & Pav.	"queñua"

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 01 de febrero de 2023

  
 Bлга. María Luisa Ochoa Cámara  
 Directora del Herbario Vargas CUZ



## Anexo B, Certificado de determinación de compuestos fenólicos totales



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

### RESULTADOS

Cusco, 21 de Febrero del 2023

Solicitantes : Natally Gutierrez Sierra y Nestor Jair Mesco Aquisé  
Tipo de Análisis : Determinación de Compuestos Fenólicos Totales  
Metodo : Colorimetrico Folin Ciocalteu  
Cantidad de Muestra : 3 frascos rotulados como Extractos Acuoso,  
Hidroetanolico 50° y 70°  
Almacenamiento : 4 °C.

#### Condiciones de Análisis por Espectrofotómetro

Equipo : Espectrofotómetro Génesis 20 Thermo Electrón  
Longitud de Onda : 765 nm  
Celda de Lectura : Cubetas de Vidrio de 1cm  
Ecuación de la curva patrón :  $y = 0.0315x + 0.0692$ ,  $R^2 = 0.9961$

Extracto de Queuña	Repeticiones			Promedio Equivalentes Ácido Gálico mg/ml de Extracto
	1	2	3	
E1	10.9829	11.0971	11.1543	11.1
E2	19.0971	19.2114	19.0400	19.1
E3	19.6686	19.6114	19.4971	19.6

Nota: Expresa los miligramos en equivalentes de Ácido Gálico que están presente en un mililitro de Extracto.

#### Referencia consultada

- Vernon L. Singleton, Rudolf Orthofer, Rosa M. Lamuela-Raventós 1999 Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent Methods in Enzymology Volume 299, 1999, Pages 152-178
- Pugliese A.G, Francisco A. Tomas-Barberan, Pilar Truchado, Maria I. Genovese, Flavonoids, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of Theobroma grandiflorum (Cupuassu) Pulp and Seeds J Agric Food Chem. 2013 Mar 20;61(11):2720-8. doi: 10.1021/jf304349u.
- Huang, R. T., Lu, Y. F., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2015). Determination of phenolic acids and flavonoids in Rhinacanthus nasutus (L.) kurz by high-performance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry. Journal of Functional Foods, 12, 498-508. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.002>
- Raphanus raphanistrum L Sulu Ekstresinin Antioksidan Aktivitesi ve Total Fenolik İçerigi. (s. f.). Recuperado 17 de enero de 2019, de <http://www.turkjps.org/archives/archive-detail/article-preview/antoxdant-actvty-and-total-phenolic-content-of-aque/12445>



Químico Jorge Choquenaira Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría - UNSAAC  
CQP - 914

**Anexo C, Reporte de la microscopia electrónica de barrido (SEM) y  
Espectroscopia de Dispersión de energía (EDS) para la AgNPs con extracto acuoso**

**Reporte de Interpretación de Microscopia  
Electronica de Barrido - Nanoparticulas de  
Plata  
Rep. 0022\_BNCC\_CIN**

(View - Repts, Unused Repts, Meta-  
Data, Signature, History)  
Printed on 2023/02/28 16:31 -  
Martes

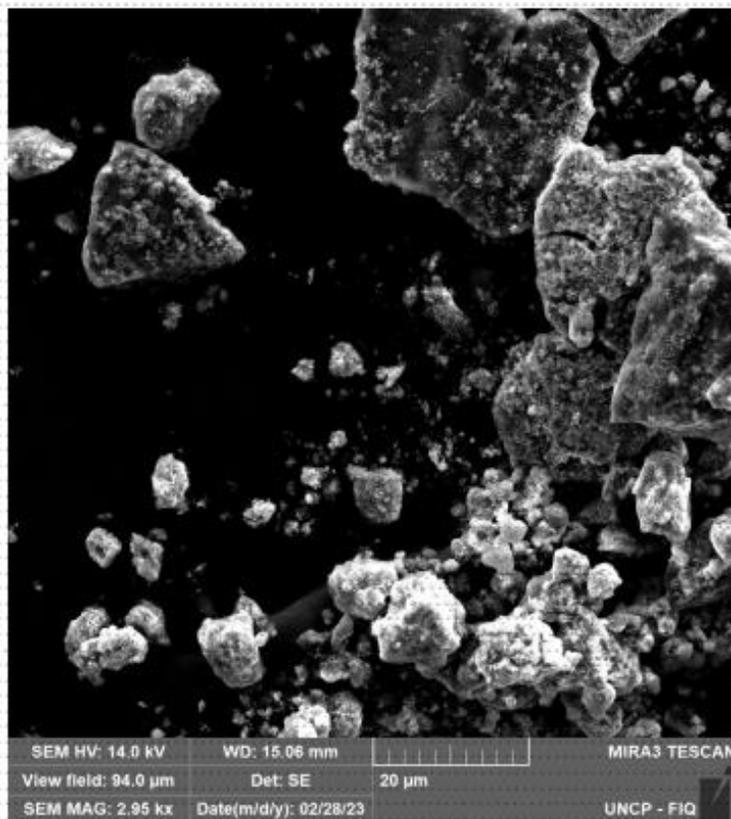
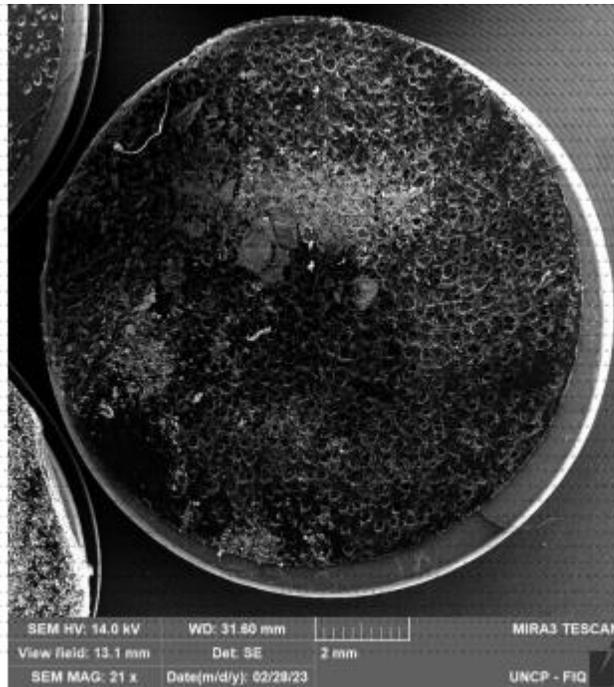
**Report Summary Information  
REP. 0022\_BNCC\_CIN**

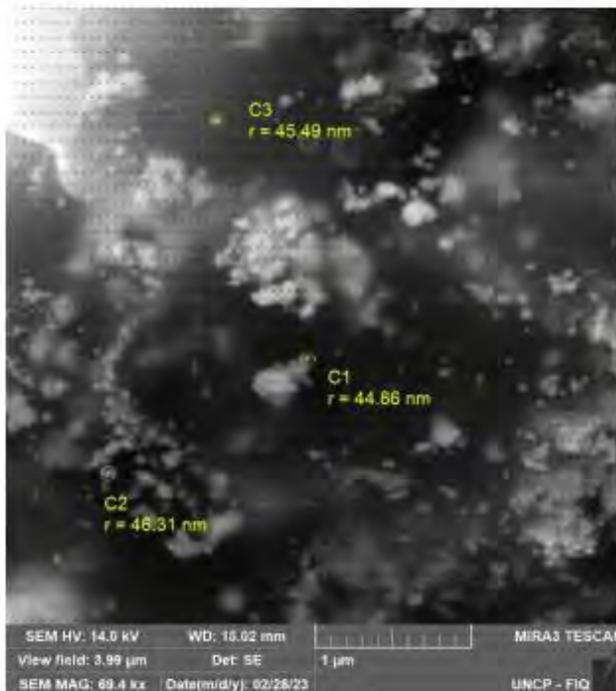
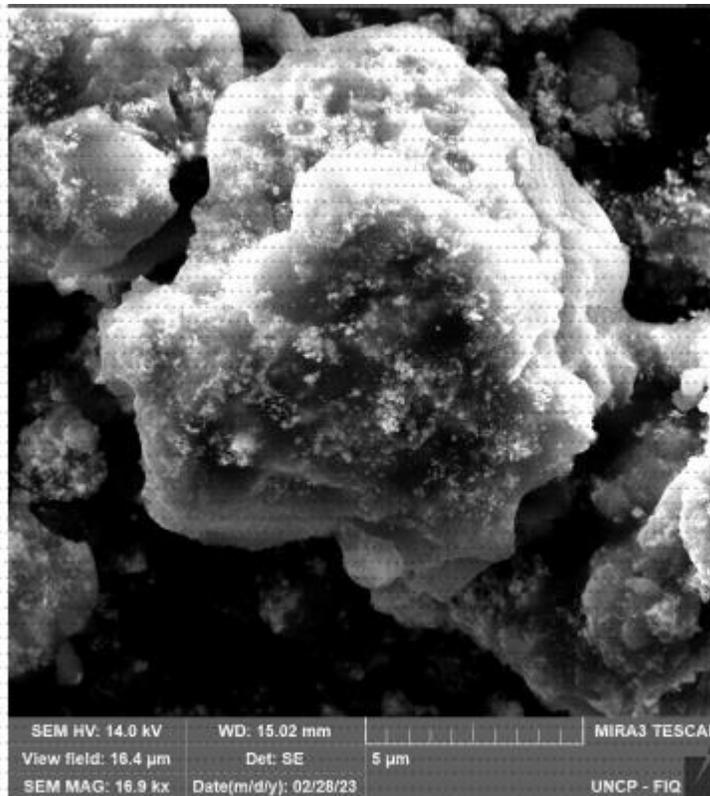
Schedule Name: Nanoparticulas de Plata Engine: 1.0.2.217  
Morfologia Superficial Version:  
Instrument Name: Scanning Electron Microscope - Field Emission Firmware: 1.0.0631  
TESCAN MIRA 3 Version:  
Report Version: 1 of 1 Connection: TCP/IP: 192.168.2.101  
Report Creation by SEM (SEM) (v1)  
Operators (schedule version):

Comment: Solicitante: Nataly Gutierrez Sierra y Nestor Jair Mesco Aquise

**SEM Report Results**

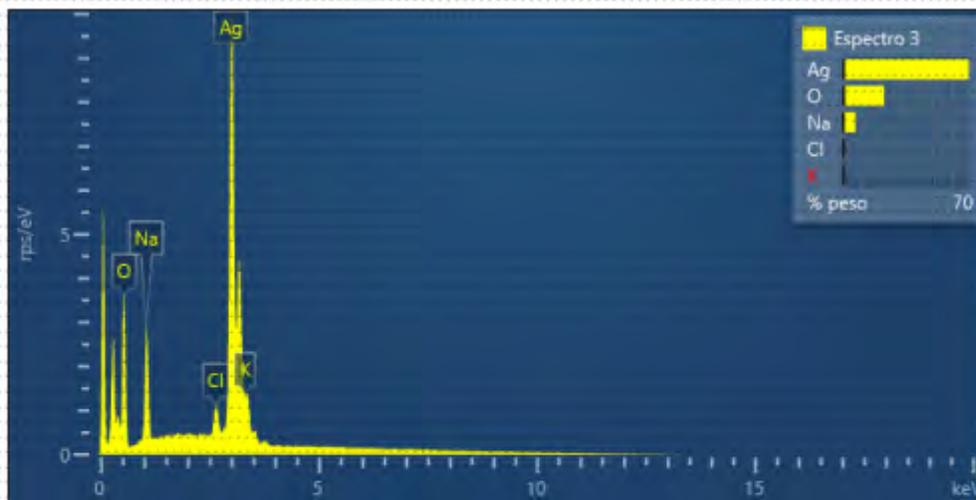
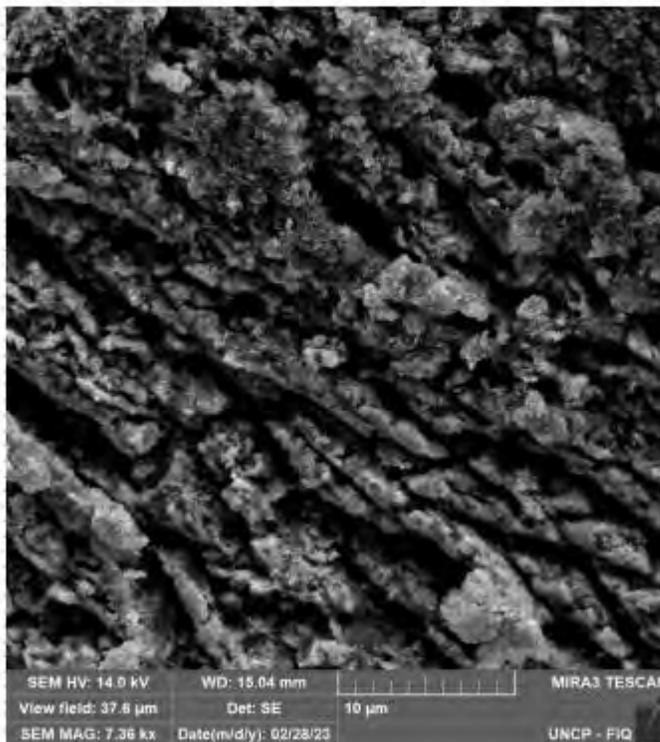
Sample Type: Nanoparticula de Oxido de Plata		From Schedule Version 1				
Pos	Analysis Type	Sample ID			Start Time	
⊕ (clean)		Nanoparticulas			13:53	
Rep #	Base Analysis Type	Adjusted (Abs)	NDIR (Abs)	Baseline (Abs)	Pressure (pa)	Run Time (min)
1	SEM	EDS	SECONDARY ELECTRON	0.00	2.75E-03	08:36:38





**Conclusiones:** Imagen Electronica por Barrido muestra formaciones esfericas de, 45.53 nm de radio (las mas pequeñas) y formaciones esfericas de 119.13 nm (las mas grandes). Formacion de cumulos de > 100 unidades de particulas. Estructura superficial normal, característica luminia correspondiente a formaciones metálicas puras (Plata). Dispersión nominal correcta. Presencia de sub particulas de < 100 nm de diametro. Potencial Z relativo superior a -10mV. Posible solubilidad de agua mayor al promedio. Formaciones amorfas presentes, característica de precursores de nanoparticulas remanentes. Existencia de nanoparticulas >95%p. Porosidad Baja. Abundancia de especies esféricas >85%. Nanoparticulas de plata (confirmado) (45.53nm de radio).

**REPORTE DE ANALISIS DE ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DE  
ENERGIA DISPERSIVA (EDS)**



Elemento	%peso	Sigma % peso
O	22.57	0.27
Na	6.66	0.10
Cl	0.84	0.06
K	0.62	0.11
Ag	69.31	0.29
Total:	100.00	

### Meta Data Used in this Report

#### Blanks

Version	IC (Adj ABS)	TC (Adj ABS)	TOC (Adj ABS)	TN (Cld)	Save Time	Operator
v284	0.0000	0.0000	22.0500	0.0000	2023/02/28 14:27	Ing. Brenda Cueva
v285	0.0000	0.0000	23.3600	0.0000	2023/02/28 14:11	Ing. Brenda Cueva

#### Calibrations

Name: CALIBRACION (SEM)

Version: v2 Calibration curve formula: SIZE SEM:  $y = 0.718x + 28.222$   
 Ver Creation: 2022/05/08 17:29  $r^2$  value: SIZER:  $r^2 = 0.99862$   
 Operator: Ing. Brenda Cueva  
 Method Type: SEM FEG  
 Comment:

Basic Analysis Type: TOC

Sample ID	Radius Particle	Y Raw Value	X Expected	Message
	20.000 nm	44.7150	20.0000	
	50.000 nm	66.0330	50.0000	
	100.000 nm	101.0500	100.0000	
	250.000 nm	198.4530	250.0000	
	500.000 nm	391.2670	500.0000	

### Methods

Name: METODO 1 (SEM FEG)

Version: 5 Operator: Default

Ver Creation: 2022/09/08 16:11

Comment:

Parameter	Value	Advanced Parameter	Value
SampleVolume	0.1 mg	High Voltage Value	15 KV
Water residual	0.50 mL	Work Distance	15 mm
Relation Imagen	1:1	Astigmatism	-4.08; -3.89
NumberOfDetectorUsed	3	Spot Size	10 nm
High Voltage	On	Mode Resolution 1	Wild Field
Beam Intesity	9.50	Mode Resolution	Deep
Zoom Mag.	1000000x	Scanning Time /sample	01:30:00
Detector 1	SE	Gas Supply	6.9 Bar Nitrogen 99%
Detector 2	InBeam	Temp. Room	17
Detector 3	BSE	Noise Vibration	<10dB
Vacuum	High	Gun Tilt	60.8; 23.19
Sputtering	10 nm	Mov.	Scroll
		Operation	Manual - Operator
		Imagen SEM Res.	4200px 3680px
		Rotation 3D	ON
		Gun Pressure	1.8 E-003 Pa
		Column Pressure	2.3 E-003 Pa
		High Vaccum Chamber Pressure	1.8 E-003 Pa

### Acceptance / Approval

#### Electronic Signatures

Report Version	User Name	Acceptance	Reason	Date
0052_BN CC_CIN	Ing. Brenda Cueva C.	Aprobado	Verificacion Aprobada	2023/02/28
0052_BN CC_CIN	MSc. Ing. Erick Anthony Huaman Alvarado	Aprobado	Verificacion Aprobada	2023/02/28

  
Brenda Nicolí Cueva C.  
ANALISTA QUIMICO  
UNICOR

#### Report History

#### Report History

Report Version	User Name	System Reason	User Reason	Date
1	Ing. Brenda Cueva	Schedule completed	Schedule completed	2023/02/28 16:31

**Anexo D, Convenio de cooperación específico para ejecución de tesis con la empresa prestadora de servicios de saneamiento pública de accionario municipal SEDA CUSCO S.A.**



**CONVENIO N° 023 -2023-GG-EP6 SEDACUSCO**

**CONVENIO DE COOPERACIÓN ESPECÍFICO PARA EJECUCIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO CON EL TEMA DE TESIS "BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUENUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR - CUSCO"**

Conste por el presente documento, denominado **CONVENIO DE COOPERACIÓN ESPECÍFICO PARA EJECUCIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO CON EL TEMA DE TESIS "BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUENUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR - CUSCO"** que celebran de una parte **LA EMPRESA PRESTADORA DE SERVICIOS DE SANEAMIENTO PÚBLICA DE ACCIONARIO MUNICIPAL SEDACUSCO S.A.**, con RUC N° 20136353315, con domicilio en el inmueble N° 384 de la Av. Anselmo Álvarez del distrito de Wanchaq, provincia y departamento del Cusco, representado por su Gerente General Ing. **YABEL SILVA GUEVARA**, identificado con DNI N° 34002918, designado mediante Sesión Ordinaria de Directorio 03/ISO-05-2023-DIR de fecha 05/febrero/2023, a quien en adelante se le denominará **"LA EPS"** y de otra parte los Bachiller **NATALLY GUTIÉRREZ SIERRA**, identificada con DNI N° 72958420 con domicilio en la Av. Tupac Amaru E-2, del distrito, provincia y departamento del Cusco y el Bachiller **NÉSTOR JAIR MESCO AQUISE**, identificado con DNI N° 7358720, con domicilio en la Av. Hermanos Ayar Mz I Lt-8, Picchu la Rinconada, distrito provincial y departamento del Cusco, que en adelante se denominarán **"LOS TESISISTAS"**

**CLÁUSULA PRIMERA: DE LAS PARTES**

**LA EPS:** Tiene por objeto realizar todas las actividades vinculadas a la prestación de los servicios de agua potable y alcantarillado en el ámbito de su administración y responsabilidad aplicando políticas de desarrollo, control, operación, mantenimiento, planificación, financiación, normatividad, preparación de proyectos, ejecución de obras, supervisión, asesoría y asistencia técnica de conformidad al Texto Único Ordenado del Decreto Legislativo N° 1280, Decreto Legislativo que aprueba la Ley Marco de la Gestión y Prestación de los Servicios de Saneamiento, aprobado mediante Decreto Supremo N° 005-2020-VIVIENDA, D. S. N° 016-2021-VIVIENDA, que aprueba el Texto Único Ordenado del Reglamento del Decreto Legislativo N° 1280 y su Estatuto Social.

**LOS TESISISTAS:** Egresados de la Escuela Profesional de Ingeniería Química de la Universidad San Antonio Abad del Cusco, vienen formulando su IIRSA para obtener el Título Profesional de Ingeniero Químico con el tema titulado **"BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUENUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR - CUSCO"**

**CLÁUSULA SEGUNDA: BASE LEGAL**

- ✓ Constitución Política del Perú
- ✓ Texto Único Ordenado del Decreto Legislativo N° 1280, Decreto Legislativo que aprueba la Ley Marco de la Gestión y Prestación de los Servicios de Saneamiento aprobado mediante Decreto Supremo N° 005-2020-VIVIENDA,
- ✓ D. S. N° 016-2021-VIVIENDA, que aprueba el Texto Único Ordenado del Reglamento del Decreto Legislativo N° 1280,
- ✓ Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado Ley N° 27662
- ✓ Ley N° 30220, Ley Universitaria

AV. ANSELMO ÁLVAREZ N° 384 - WANCHAQ - CUSCO - TELÉFONOS 284434 - 284435 - FAX 280721 244070  
E-MAIL: [contacto@sedacusco.com.pe](mailto:contacto@sedacusco.com.pe) WEB: <http://www.sedacusco.com.pe>



- ✓ Reglamento de Grados de la Universidad San Antonio Abad del Cusco
- ✓ Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General
- ✓ Estatuto Social de la EPS SEDACUSCO S.A.
- ✓ Reglamento de Prestación de los Servicios de Saneamiento, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 011-2007-SUNASS-CD y sus modificatorias

#### CLÁUSULA TERCERA: OBJETIVO

Es objeto del presente Convenio facilitar las condiciones y mecanismos para la realización de los estudios de la tesis titulada "BIOSINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON EXTRACTO DE QUEÑUA Y SU APLICACIÓN ANTIBACTERIANA EN EL AFLUENTE DE LA PTAR - CUSCO".

#### CLÁUSULA CUARTA:

Constituyen obligaciones de las partes las que a continuación se detallan:

#### OBLIGACIONES DE LA EPS.

- 1) Permitir el acceso a la PTAR San Jerónimo, en el horario que el jefe de departamento de aguas residuales lo establezca previo coordinación con los tesisistas.
- 2) Permitir la toma de muestras en los puntos que se determinen.
- 3) Entregar los resultados de los análisis de laboratorio solicitados por los tesisistas.
- 4) Asistir con personal profesional, para consultas en temas que tengan relación al proyecto de investigación, no teniendo carácter de exclusividad.
- 5) Facilitar información concerniente a las áreas y temas de investigación que tengan relación para la elaboración del proyecto de investigación, siempre y cuando la EPS cuente con dicha información.

#### OBLIGACIONES DE LOS TESISISTAS

- 1) Cumplir estrictamente con lo establecido en el Plan de Trabajo, salvo variaciones propias del mismo y coordinadas con la EPS SEDACUSCO S.A., así mismo alcanzará el correspondiente Plan de Trabajo Actualizado si el caso lo amerita.
- 2) Realizar las actividades de investigación en los horarios que establece la EPS SEDACUSCO S.A., dando cumplimiento a las disposiciones internas de la empresa.
- 3) Hacer entrega a la EPS SEDACUSCO S.A. de toda la información que se genere, producto del referido trabajo, siendo propiedad de ésta, de allí que sólo podrá ser utilizada en los volúmenes correspondientes a la tesis a ser presentada ante la Universidad.
- 4) El cumplimiento del convenio se dará con la conformidad al informe final de resultados dentro del plazo convenido, para lo cual deberán los tesisistas realizar una exposición al personal de la PTAR, detallando las conclusiones de la investigación.
- 5) Una vez sustentado y aprobado el trabajo de investigación los tesisistas, se comprometen a entregar a la EPS SEDACUSCO S.A. un ejemplar en físico y en formato digital.
- 6) Cualquier copia o publicación del trabajo de tesis, deberá hacerse previa autorización de la EPS SEDACUSCO S.A. hasta antes de su sustentación.
- 7) Se compromete a seguir en todo momento las prácticas concernientes al proyecto de investigación de forma segura, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de las medidas necesarias en materia de salud, seguridad, accidentes y prevención de riesgos laborales, así como contar con sus respectivos seguros de trabajo contra todo riesgo - SCTR.



8) Los cambios en la ejecución de la tesis se solicitan por escrito y con la debida anticipación y tendrán que ser aprobados por la EPS SEDACUSCO S.A.

9) En caso de averías de los equipos facilitados por la EPS, se harán cargo de su reparación o reposición.

**CLÁUSULA QUINTA: DERECHOS DE LAS PARTES**  
**DERECHOS DE LA EPS**  
 La EPS, si lo estima conveniente, podrá difundir los resultados mencionados siempre que respete los derechos de propiedad intelectual e industrial que puedan originarse.

**DERECHO DE LOS TESISISTAS**  
**LOS TESISISTAS** tienen derecho a ser reconocido como titular de los derechos de propiedad intelectual que le puedan corresponder.

**CLÁUSULA SEXTA: COORDINACIÓN ENTRE LAS PARTES**  
 Con el propósito de lograr una eficaz ejecución del presente convenio, las partes realizarán una permanente coordinación, verificación y supervisión a través de sus encargados, designando como Coordinadores:

- Por la EPS: Designará al personal del área competente, el cual se dará a conocer mediante Carta, por la Gerencia de Administración y Finanzas una vez suscrito el presente convenio.
- Por **LOS TESISISTAS**: Comunicarán a la EPS mediante carta la designación del Asesor de Tesis, en un plazo de 5 días hábiles después de haber sido suscrito el convenio y/o coordinador.

**CLÁUSULA SEPTIMA - LIBRE ADHESIÓN Y SEPARACIÓN**  
 De conformidad a lo establecido por el numeral 89.3 del artículo 88° del Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado con Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, LAS PARTES suscriben el presente convenio de manera libre y de conformidad a sus competencias.

**CLÁUSULA OCTAVA - DEL PLAZO.**  
 La vigencia del presente Convenio es de DIECISEIS (16) días hábiles, que serán contados a partir de la suscripción de las partes.

**CLÁUSULA NOVENA: DE LA RESOLUCIÓN**  
 Sin perjuicio del plazo de la vigencia establecido en la cláusula anterior, el presente convenio podrá ser resuelto, bastando para ello comunicado por escrito:

1. Cualquiera de las Partes podrá resolver el presente Convenio, cursando a la otra parte una Carta, con la exposición de motivos que fundamenta su decisión, con no menos de 5 días naturales de anticipación para su resolución.
2. Por acuerdo de las partes, el cual debe constar por escrito.
3. Por incumplimiento injustificado de las obligaciones asumidas por las partes en el presente convenio.
4. Por razones de fuerza mayor o caso fortuito que no permita que una de las partes continúe cualquiera de las obligaciones contraídas.
5. Cuando **LOS TESISISTAS** hayan renunciado a proseguir su tesis.
6. En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la Normativa reguladora de los procedimientos de admisión del proyecto de tesis, de elaboración.

AV. ANSELMO ALVAREZ Nº 384 - BANCHAO - CUSCO TELÉFONOS 04429 / 226421 / 044 23854 / 24420  
 EMAIL: [zasamir@sedacusco.com.pe](mailto:zasamir@sedacusco.com.pe) WEB: <http://www.sedacusco.com.pe>



#### **CLÁUSULA DÉCIMA.- DE LAS MODIFICACIONES.**

Las partes, de común acuerdo, podrán revisar los alcances del Convenio y efectuar los ajustes, modificaciones y/o ampliaciones de los términos que consideren convenientes, los que constarán en las adendas correspondientes, las cuales firmarán para integrante del presente documento.

#### **CLÁUSULA ONCEAVA.- DE LAS COMUNICACIONES.**

Toda comunicación que deba ser cursada entre las Partes, se efectuará por escrito y se entenderá válidamente realizada desde el momento en que el documento correspondiente sea entregado al destinatario, en los domicilios consignados en la parte introductoria del presente Convenio. Toda variación del domicilio deberá ser comunicada a la otra parte por escrito. Se adiciona también la siguiente dirección electrónica para la comunicación con los TESISISTAS:

- 150265@unsaac.edu.pe
- 155480@unsaac.edu.pe

#### **CLÁUSULA DOCEAVA.- DEL FINANCIAMIENTO.**

Las Partes convienen en precisar que tanto la celebración como la ejecución del presente Convenio Específico de Cooperación, no generará transferencias de recursos, compromisos financieros, ni pagos como contraprestación alguna de las partes, sino la colaboración eficaz que coadyuva al cumplimiento de sus fines.

#### **CLÁUSULA TRECEAVA.- DE LA SOLUCIÓN DE CONTROVERSIAS.**

Las Partes declaran que celebran el presente Convenio, conforme a las reglas de buena fe y común intención, en virtud de lo cual acuerdan que, en caso de producirse alguna discrepancia o controversia en la interpretación, ejecución y/o eventual incumplimiento del Convenio, será resuelta en forma armoniosa.

Estando de acuerdo las partes con lo expresado en todas y cada una de las cláusulas del presente Convenio, se obligan a su fiel cumplimiento y lo suscriben en dos (02) ejemplares de igual valor, en lugar y fecha indicada por las Partes.

Cusco, 17 de febrero de 2023



**Anexo E, Índice NMP y límites de confianza del 95 % para varias combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan cinco tubos por dilución.**

**TABLA 9221: IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATION OF POSITIVE RESULT WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION**

Combinación de tubos positivos			NMP/100ml	Límites de 95% de confianza		Combinación de tubos positivos			NMP/100ml	Límites de 95% de confianza	
				Inferior	Superior					Inferior	Superior
0	0	0	< 1.8	-	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	0	1	1.8	0.090	6.8	4	1	0	17	6.0	40
0	1	0	1.8	0.090	6.9	4	1	1	21	6.8	42
0	1	1	3.6	0.70	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	0	3.7	0.70	10	4	1	3	31	10	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	1	26	9.8	70
1	0	0	2.0	0.10	10	4	2	2	32	10	70
1	0	1	4.0	0.70	10	4	2	3	38	14	100
1	0	2	6.0	1.8	15	4	3	0	27	9.9	70
1	1	0	4.0	0.71	12	4	3	1	33	10	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	2	39	14	100
1	1	2	8.1	3.4	22	4	4	0	34	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	1	40	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	0	8.3	3.4	22	4	5	0	41	14	100
1	3	1	10	3.5	22	4	5	1	48	15	120
1	4	0	10	3.5	22	5	0	0	23	6.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	1	31	10	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	2	43	14	100
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	3	58	22	150
2	1	0	6.8	1.8	17	5	1	0	33	10	100
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	1	46	14	120
2	1	2	12	4.1	26	5	1	2	63	22	150
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	3	84	34	220
2	2	1	12	4.1	26	5	2	0	49	15	150
2	2	2	14	5.9	36	5	2	1	70	22	170
2	3	0	12	4.1	26	5	2	2	94	34	230
2	3	1	14	5.9	36	5	2	3	120	36	250
2	4	0	15	5.9	36	5	2	4	150	58	400
3	0	0	7.8	2.1	22	5	3	0	79	22	220
3	0	1	11	3.5	23	5	3	1	110	34	250
3	0	2	13	5.6	35	5	3	2	140	52	400
3	1	0	11	3.5	26	5	3	3	170	70	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	4	210	70	400
3	1	2	17	6.0	36	5	4	0	130	36	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	1	170	58	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	2	2	20	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	0	17	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	5	430	150	1100
3	3	2	24	9.8	70	5	5	0	240	70	710
3	4	0	21	6.8	40	5	5	1	350	100	1100
3	4	1	24	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
3	5	0	25	9.8	70	5	5	3	920	220	2600
4	0	0	13	4.1	35	5	5	4	1600	400	4600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	5	> 1600	700	-
4	0	2	21	6.8	40						

Fuente: STANDARD METHODS 9221 B. STANDARD TOTAL COLIFORM FERMENTATION TECHNIQUE, JUNE 2003

**Anexo F, Límites Máximos Permisibles para los efluentes de PTAR**

**LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES  
PARA LOS EFLUENTES DE PTAR**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>LMP DE EFLUENTES PARA VERTIDOS A CUERPOS DE AGUAS</b>
Aceites y grasas	mg/L	20
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 mL	10,000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	100
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	200
pH	unidad	6.5-8.5
Sólidos Totales en Suspensión	mL/L	150
Temperatura	°C	<35

Fuente: (El Peruano , 2010)

## Anexo G, Certificado de análisis bacteriológico

### ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUA RESIDUAL (AFLUENTE)

**MUESTRA** : Agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (afluente)  
**DEPARTAMENTO** : Cusco  
**DISTRITO** : San Jerónimo  
**SOLICITANTES** : Bach. Natally Gutierrez Sierra  
 Bach. Nestor Jair Mesco Aquisé  
**FECHA DE INICIO:** 28 Febrero de 2023  
**FECHA DE CONCLUSIÓN DEL ANÁLISIS:** 03 Marzo de 2023

#### RESULTADOS:

MUESTRA	Criterios Bacteriológicos	
	NMP Coliformes Totales/100 ml	NMP Coliformes Termotolerantes/100 ml
1 Agua Residual (afluente)	33 X 10 <sup>6</sup>	33 X 10 <sup>6</sup>
2 Agua con NpAg. 10%	<1.8	<1.8
3 Agua con NpAg. 14%	<1.8	<1.8
4 Agua con NpAg. 18%	<1.8	<1.8
5 Agua con NpAg. 22%	<1.8	<1.8
6 Agua con NpAg. 26%	<1.8	<1.8

< 1.8= Ausente

#### METODOLOGÍA:

Se siguió la metodología de tubos múltiples recomendada por el APHA-AWWA.WPCF: "Métodos Normalizados para el análisis de agua Potable y Residuales" 19th Edición 2012.

#### CONCLUSIÓN:

Las muestras de agua residual (afluente) presenta Coliformes Totales y Termotolerantes /100 ml., a excepción de las muestras de aguas 2, 3, 4, 5, 6, dosificadas con nanopartículas de plata (NpAg) a diferentes concentraciones se encuentran ausentes.

  
 .....  
 Dra. Blga. Hedy Y. Espinoza Carrasco