DICTAMEN DE EVALUACIÓN DEL DOCUMENTO DE TESIS

Datos del documento de tesis:

Título del proyecto:	Aprovechamiento de agro-residuos citrícolas para la síntesis de nanopartículas bimetálicas antimicrobianas dispersadas sobre caolín
Nombre del estudiante:	Javier Emanuel Castañeda Aude
Nombre del director de tesis:	Dr. Carlos Enrique Escárcega González
Posgrado y orientación:	Maestría en Ciencias con orientación en Procesos Sustentables

Dictamen del documento de tesis:

Aprobado [X] Rechazado [ ]

Observación:
La tesis fue revisada en por los integrantes del comité tutorial y todos aprobaron la tesis.

NOMBRES	**FIRMAS**
Revisor 1 Dra. Eileen Susana Carrillo Pedraza	
Revisor 2 Dra. Andrea Quetzalli Cerdán Pasarán	
Revisor 3 Dr. Enrique Díaz Barriga Castro	Enrique Díaz Barriga Castro

Dr. Javier Rivera De la Rosa

Coordinador académico del posgrado

Dra. Maria Elena Cantú Cárdenas

Subdirectora de Posgrado

FECHA:23 de junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

APROVECHAMIENTO DE AGRO-RESIDUOS CITRÍCOLAS PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS ANTIMICROBIANAS DISPERSADAS SOBRE CAOLÍN.

Presenta:

JAVIER EMANUEL CASTAÑEDA AUDE

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

con Orientación en Procesos Sustentables

_____

Asesor de Tesis

Dr. Carlos Enrique Escárcega González

Junio, 2022

CONTENIDO

Capitulo ..... Página

Capítulo 1. Problemática 10

1.1 Planteamiento del Problema 10
1.2 Aportación Científica 13
1.3 Hipótesis 13
1.4 Objetivos de la investigación 14
1.4.1 Objetivo general 14
1.4.2 Objetivos específicos 14
1.5 Metas 14
1.6 Delimitación de la investigación 15
1.6.1 Delimitación espacial 15
1.6.2 Delimitación temporal 15
1.6.3 Delimitación del contenido 15
2 Capítulo 2. Marcos de referencia 16

2.1 Antecedentes 16
2.1.1 Residuos orgánicos en el mundo 16
2.1.2 Aprovechamiento de los residuos orgánicos 17
2.1.3 Flavonoides presentes en los extractos citrícolas 19
2.1.4 Importancia de uso de nanopartículas metálicas 20
2.1.5 Síntesis de nanopartículas metálicas por medio extractos orgánicos 21
2.1.6 Síntesis de nanopartículas metálicas por medio extractos citrícolas 22
2.1.7 Aplicaciones de nanopartículas metálicas 24
2.1.8 Mecanismo de síntesis de nanopartículas de plata 26
2.1.9 Propiedades de las nanopartículas metálicas 26
2.1.10 Caracterización de nanopartículas metálicas 27
2.1.11 Dispersión de nanopartículas metálicas en caolín 27
2.2 Marco conceptual 28

Capitulo ..... Página

2.2.1 *Citrus sinensis* 28
2.2.2 Flavonoides en la cascara de naranja valencia 29
2.2.3 *Citrus aurantifolia* 30
2.2.4 Flavonoides en la cascara del limón mexicano 31
2.2.5 *Citrus paradisi* 32
2.2.6 Flavonoides en la cascara de toronja sangría 34
2.2.7 Polifenoles 35
2.2.8 Flavonoides 35
2.2.9 Narirutina 36
2.2.10 Hesperidina 37
2.2.11 Eriocitrina 38
2.2.12 Naringina 39
2.2.13 Tangeretina 40
2.2.14 Método verde 41
2.2.15 Caracterización de nanopartículas mediante espectrofotometría UV-Vis 42
2.2.16 Staphyloccocus aureus 42
2.2.17 Medio de cultivo microbiano 43
3 Capítulo 3. Metodología 44

3.1 Tipo de investigación 44
3.2 Técnicas de recolección de información 45
3.3 Variables 45
3.4 Materiales y equipos 45
3.5 Origen de los reactivos 48
3.6 Preparación de las cáscaras cítricas 49
3.7 Preparación del agente reductor y estabilizador a partir de la cáscara de cítricos 49
3.8 Preparación del nitrato de plata acuoso 50
3.9 Preparación del nitrato de cobre acuoso 50
3.10 Síntesis de nanopartículas de plata 50
3.10.1 Síntesis de AgNPs por ultrasonido 50

Capitulo..... Página

3.10.2 Síntesis de AgNPs por baño de agua 51
3.10.3 Síntesis de AgNPs sin energía..... 51
3.11 Síntesis de nanopartículas de cobre..... 51
3.11.1 Síntesis de CuNPs por ultrasonido..... 51
3.11.2 Síntesis de CuNPs por calentamiento..... 52
3.11.3 Síntesis de CuNPs extracto en exceso 52
3.12 Purificación de nanopartículas de plata y cobre 52
3.13 Secado de nanopartículas de plata y cobre..... 53
3.14 Dispersión de AgNPs en caolín 53
3.15 Dispersión de CuNPs en caolín 54
3.16 Purificación de nanopartículas de plata y cobre dispersas en caolín... 54
3.17 Secado de nanopartículas de plata y cobre dispersas en caolín 54
3.18 Caracterización de nanopartículas 55
3.18.1 Espectrofotometría UV-Vis..... 55
3.18.2 Técnicas microscópicas (TEM y HRTEM)..... 56
3.19 Prueba antibacteriana in vitro 56
3.20 Concentración Mínima Inhibitoria 57
3.21 Concentración bactericida mínima (MBC) 58
4 Capítulo 4. Análisis de resultados 59

4.1 Síntesis de nanopartículas de plata..... 59
4.2 Síntesis de nanopartículas de cobre..... 60
4.3 Dispersión de AgNPs en caolín 61
4.4 Dispersión de CuNPs en caolín 62
4.5 Caracterización de nanopartículas por espectrofotometría UV-Vis 63
4.6 Caracterización de nanopartículas por difracción de rayos X 67
4.7 Caracterización de nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión 70
4.8 Caracterización de nanopartículas por espectroscopía de rayos X por energía dispersiva 76
4.9 Actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas 79
4.9.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI) 80

Capitulo..... Página

5 Conclusiones.....91

6 Recomendaciones.....93

7 Referencias 94

LISTA DE FIGURAS

Figura..... Página

Figura 1. Fruta Naranja tipo valencia 29

Figura 2. Fruta Limón tipo mexicano.....31

Figura 3. Fruta Toronja tipo sangría.....34

Figura 4. Estructura química de la narirutina 37

Figura 5. Estructura química de la hesperidina.....38

Figura 6. Estructura química de la eriocitrina.....39

Figura 7. Estructura química de la naringina 40

Figura 8. Estructura química de la tangeretina 41

Figura 9. Solución de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de cáscara de a) limón, b) naranja, c) toronja y su d) combinación.....60

Figura 11. Solución de Caolín-AgNps después de 24 horas a partir de extracto de cáscara de a) limón, b) naranja, c) toronja y su d) combinación.....62

Figura 13. Análisis de AgNPs por espectroscopía UV-Vis.....64

Figura ..... Página

Figura 14. Análisis de CuNPs por espectroscopía UV-Vis.....64

Figura 15. Análisis de Caolín-AgNPs por espectroscopía UV-Vis 65

Figura 16. Análisis de Caolín-CuNPs por espectroscopía UV-Vis 65

Figura 17. Patrones de difracción de rayos X de AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja).....67

Figura 18. Patrones de difracción de rayos X de CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja).....68

Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de Caolín-AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja).....68

Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de Caolín-CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja).....69

Figura 20. (A) Micrografía TEM de baja resolución de las AgNPs. (B) Micrografía TEM de alta resolución de las AgNPs. (C) Patrón SAED de las AgNPs con los anillos marcados. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las AgNPs. 71

Figura 21. (A) Micrografía TEM de baja resolución de las CuNPs. (B) Micrografía TEM de alta resolución de las CuNPs. (C) Patrón SAED de las CuNPs con los anillos marcados. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las CuNPs 72

Figura 22. (A) (B) (C) Micrografía TEM de baja resolución de las Caolín-AgNPs. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las Caolín-AgNPs.....73

Figura..... Página

Figura 23. (A) (B) (C) Micrografía TEM de baja resolución de las Caolín-AgNPs. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las Caolín-AgNPs.....75

Figura 24. Espectro EDS de las AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados.....76

Figura 25. Espectro EDS de las CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados.....77

Figura 26. Espectro EDS de las Caolín-AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados.....77

Figura 27. Espectro EDS de las Caolín-CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados.....78

Figura 28. Actividad antimicrobiana de AgNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos.....80

Figura 29. Actividad antimicrobiana de AgNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos.....81

Figura 30. Actividad antimicrobiana de AgNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos.....81

Figura 31. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos 82

Figura 32. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos.....83

Figura ..... Página

Figura 33. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos.....83

Figura 34. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos.....84

Figura 35. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos 84

Figura 36. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos 85

Figura 37. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos.....86

Figura 38. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos.....86

Figura 39. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos 87

Figura 40. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos 88

Figura 41. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos.....88

Figura 42. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos.....89

Figura..... Página

Figura 43. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos 89

TABLAS

Tabla 1. Flavonoides identificados en la cáscara de la naranja valencia.....30

Tabla 2. Flavonoides identificados en la cáscara de limón mexicano.....32

Tabla 3. Flavonoides presentes en la cáscara de la toronja sangría 34

Tabla 4. Materiales y equipos utilizados 46

Capítulo 1. Problemática

1.1 Planteamiento del Problema

Debido al incremento de la población mundial se ha demandado una mayor expansión de la industria alimenticia, A su vez, se ha aumentado la generación de residuos orgánicos de origen doméstico, agrícola y principalmente industrial. Tan solo en México el Sistema Nacional de Información Estadística y Geográfica (SNIEG) reportó para finales del 2016 el 90.2% de los municipios y delegaciones contaron con recolección y disposición final de residuos. Durante el 2016 la cantidad promedio diaria de residuos sólidos recolectada a nivel nacional fue de 104 mil 735 toneladas. El cultivo de cítricos es una actividad importante del sector agrícola de muchos países.

Tan solo estas ocupan un lugar de suma importancia en la alimentación básica en el mundo teniendo una producción estimada de 400 mil toneladas de mandarina, 6.7 toneladas de toronja y 975 mil toneladas de limón para el 2019/20 (USDA, 2019). De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) tan solo en Nuevo León en 2019 se produjeron un total de 364948, 4142, 49678.30 y 33871.16 toneladas de naranja, limón, mandarina y toronja respectivamente (anuario estadístico de la producción agrícola, 2019), ocupando el tercer lugar a nivel nacional en la producción de naranjas.

El procesamiento de naranjas genera grandes cantidades de residuos, que ascienden aproximadamente a 8-20 millones de toneladas por año en todo el mundo. Procesar una tonelada de naranjas puede producir 0.5-0.6 toneladas de

residuos sólidos de cítricos, 0-9% de una tonelada de semillas, 60-75% de una tonelada de cáscaras, 23-33% de una tonelada de residuos de membrana (Rosas-Mendoza et al., 2020). Los flavonoides se encuentran comúnmente en frutas y verduras; Por lo cual son de gran importancia ya que tienen diversos usos como antioxidantes naturales, eliminadores de radicales libres y también pueden quelar metales prooxidantes, lo cual quiere decir que estos compuestos forman complejos con iones de diversos metales; reduciendo así su capacidad para producir radicales libres. Gran parte de los flavonoides de los cítricos son flavanonas unidas como glucósidos. En la cáscara de naranja y mandarina predomina la hesperidina, para la toronja sobresale la naringina y narirutina. Por último, la eriocitrina y la hesperidina sobresalen en el limón y la lima (Montanari et al., 1998).

Con el fin de reducir los problemas de la disposición final de residuos orgánicos y la incidencia en la resistencia microbiana contra los antibióticos, ha aumentado el interés en descubrir nuevas estrategias alternativas para diseñar y desarrollar nuevos agentes antimicrobianos. Por lo cual una de las soluciones a este problema son las propiedades que poseen las partículas a escala nano, el término nano proviene de la palabra griega que significa “enano”. Cuando utiliza como prefijo indica una medida de 10^{-9}m, por lo que un nanómetro (nm) es una mil millonésima parte de un metro. Entonces una nanopartícula es una partícula microscópica con al menos una dimensión menor a 100 nm (Thakkar et al., 2010).

La nanotecnología cuenta con una gran cantidad de metodologías de síntesis y diseños para desarrollar agentes antimicrobianos para combatir el

problema de la resistencia antimicrobiana. Diversas investigaciones han demostrado que las nanopartículas compuestas de diferentes metales nobles se pueden utilizar para matar cepas bacterianas tanto resistentes como no resistentes.

La síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos naturales basados en plantas ha crecido considerablemente, debido a que no tienen efectos nocivos y se puede obtener un producto de valor por medio de restos de frutas, verduras, plantas que no se utilizan en la industria alimenticia. Por lo cual ya se han realizado investigaciones sobre la síntesis y formación de nanopartículas de plata (AgNPs) por diferentes tipos de agentes reductores tales como: *Acacia rigidula* (Escárcega-González et al., 2018), Aloe vera (Chandran et al., 2006), limón (Najimu et al., 2014), y también nanopartículas bimetálicas de oro-paladio con cáscara de naranja (Wicaksono et al., 2020), entre otras. En este contexto, la estructura que posee la caolinita proporciona grandes ventajas en muchos procesos gracias a su alta estabilidad química (Suraj et al., 1998) y bajo coeficiente de expansión (Mitchell, 1993), por lo que la utilización de arcillas naturales como la caolinita para la producción de AgNPs imparten mejores propiedades antimicrobianas a los compuestos resultantes.

Las NPs producidas mediante el método de reducción fotoinducida, presentan mayores propiedades antimicrobianas en comparación a otras metodologías que incorporan NPs preparadas por reducción con $NaBH_4$ (Nasr et al., 2019). Al respecto, la combinación de dos sales metálicas para producir nanopartículas bimetálicas presenta mejores propiedades (Rosbero y Camacho,

2017); por lo cual en este proyecto se busca combinar las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiparasitarias y anticancerosas de las CuNPs (Ingle et al., 2013). Además, sumadas con las propiedades de las AgNPs que van desde actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antiangiogénicos hasta actividades anticancerígenas (Zhang et al., 2016). Por este motivo, como en el estudio realizado por Nazeruddin et al., 2014, se confirman que las de Ag-CuNPs tienen una capacidad antibacteriana eficiente, por lo tanto, tienen un alto potencial para la fabricación de agentes antimicrobianos.

1.2 Aportación Científica

Aprovechamiento de residuos orgánicos cítricos para la síntesis de nanopartículas bimetálicas dispersadas sobre caolín con actividad antimicrobiana.

1.3 Hipótesis

El aprovechamiento de los residuos orgánicos cítricos permitirá obtener nanopartículas bimetálicas y su dispersión en caolín para el uso de aplicaciones antimicrobianas.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Aprovechar diversos residuos orgánicos cítricos para sintetizar nanopartículas bimetálicas dispersadas en caolín con aplicaciones antimicrobianas.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtención de extractos a partir de diversos residuos orgánicos cítricos utilizando solventes ecológicos (o no tóxicos).
- Sintetizar nanopartículas bimetálicas a partir de los extractos obtenidos de los residuos orgánicos cítricos.
- Dispersar las nanopartículas bimetálicas sintetizadas sobre caolín.
- Caracterizar las nanopartículas metálicas obtenidas mediante Técnicas como: Espectroscopía UV-Vis, Microscopía TEM (HRTEM, SAED) y XRD.
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas.

1.5 Metas

- Aprovechar residuos orgánicos cítricos para revalorizarlos y caolín para obtener nanopartículas bimetálicas con actividad antimicrobiana eficiente.
- Obtener el título de Maestría en Ciencias con Orientación en Procesos Sustentables.
- Asistir a un congreso Nacional para la divulgación de los resultados.

- Realizar una estancia nacional o extranjera en una institución de prestigio.
- Escribir por lo menos un artículo científico para su publicación en una revista indexada en JCR.

1.6 Delimitación de la investigación

Para llevar a cabo esta investigación es primordial establecer algunas limitaciones para llevar a cabo este estudio, tales como la hora, el lugar y la fecha, estos detalles serán descritos a continuación.

1.6.1 Delimitación espacial

Este proyecto se va a realizar en el Centro de Investigación de Biotecnología y Nanotecnología y en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

1.6.2 Delimitación temporal

Se estima que el proyecto de investigación se realice en dos años, es decir la duración de la maestría en ciencias con orientación en procesos sustentables.

1.6.3 Delimitación del contenido

El proyecto se va a basar mediante estudios sobre la *Citrus sinensis*, *Citrus aurantifolia* y *Citrus paradisi* y sus propiedades reductoras en la cáscara, así como el método más verde para la síntesis de nanopartículas de plata y cobre. Se utilizará como fuente de consulta la biblioteca de la Facultad de Ciencias

Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León e información expuesta en diversos artículos científicos en internet.

- Campo: Ciencias
- Área: Procesos sustentables
- Aspecto: Elaboración e implementación en inhibición microbiana de *S. aureus* resistente a diversos medicamentos.

2 Capítulo 2. Marcos de referencia

2.1 Antecedentes

2.1.1 Residuos orgánicos en el mundo

Cerca del 50% de los residuos orgánicos que consisten en frutas, cáscaras y semillas son descartados por las industrias por lo cual se buscan tecnologías eficaces para mejorar el valor de estos subproductos, que hasta ahora se han tratado en su mayoría como residuos, son de importancia directa y significativa para todos los países y regiones productores (Meneguzzo et al, 2019).

El cultivo de cítricos es una actividad importante en los sectores agrícolas de muchos países. Se consumen más frutas cítricas que cualquier otra fruta en todo el mundo y su producción global en 2017-18 fue de aproximadamente 92 millones de toneladas. Las naranjas representaron el 52% de esta producción, seguidas de las mandarinas con un 33%, los limones con 8% y las toronjas con un restante del 7%. Del procesamiento de naranja se obtienen diversos productos, el procesamiento de una tonelada de naranjas puede producir 90 kg

de jugo a 65 °Bx y 5,35 kg de aceite esencial contenido dentro de las cáscaras. Este procesamiento de cítricos genera grandes cantidades de residuos, que ascienden de 8 a 20 millones de toneladas por año en todo el mundo. Procesar una tonelada de naranjas puede producir 0.5-0.6 toneladas de residuos sólidos de cítricos, 0-9% de una tonelada de semillas, 60-75% de una tonelada de cáscaras. Las grandes cantidades de residuos del procesamiento de cítricos que se generan y sus características peculiares crean limitaciones considerables para su manejo debido tanto a factores económicos como ambientales. (Rosas-Mendoza et al., 2020).

2.1.2 Aprovechamiento de los residuos orgánicos

Este estudio, Kalemelawa et al., 2012, Se encontró que la descomposición de la cáscara de plátano y la mineralización de nutrientes fueron más rápidas y elevadas en condiciones aerobias e inoculadas en comparación con las condiciones de composición anaeróbicas y no inoculadas. El alto contenido de potasio y nitrógeno en las compostas presentó un alto potencial para que la composta de cáscara de plátano se utilice como fuente de nutrientes de K y N.

Dhanya et al., 2020; habló sobre la dependencia de los combustibles fósiles como el petróleo, el carbón y el gas natural está aumentando de forma alarmante, lo que provoca que dichos recursos estén en un modo de agotamiento y se demande un nuevo enfoque sostenible para la producción de bioenergía. La producción de bioenergía a partir de residuos orgánicos está asociada con la mitigación de la generación de residuos y su vertido en el suelo, reduciendo

particularmente todos los peligros y negatividades en todos los sectores durante la eliminación de residuos. Por lo tanto, la gestión de residuos es esencial y, teniendo en cuenta su importancia de minimizar el problema y la amenaza de los residuos, se recomienda utilizar una estrategia altamente efectiva de conversión de residuos orgánicos, como por ejemplo en el aprovechamiento de ellos para la obtención de beneficios en el área biomédica y ambiental.

Siles et al., 2016, encontraron que la cáscara de naranja residual (CNR) se valorizó con éxito mediante la combustión. Se obtuvo un alto rendimiento de metano renovable y una enmienda orgánica mediante la biometanización termofílica de la CNR tras la eliminación de valiosos aceites esenciales de la piel. También se demostró que el co-compostaje de la CNR combinado en diferentes proporciones (17-83%) con la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos es adecuado. Además, se observó una reducción del 37% en la generación de olores en el co-compostaje de la CNR en comparación con el compostaje único de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.

Al respecto, Arun et al., 2017, fermentaron residuos de frutas (6 gramos de piña: 4 gramos de cáscaras de cítricos, 20 minutos con ultrasonidos), melaza y agua para producir una solución de enzima de basura. Encontraron que la enzima de basura obtenida tiene una mayor actividad enzimática hidrolítica y se puede utilizar para solubilizar los residuos de lodos activados y que a su vez se utiliza para producir una energía sostenible a través del proceso de digestión anaeróbica.

2.1.3 Flavonoides presentes en los extractos citrícolas

Al respecto Londoño-Londoño et al., 2010; obtuvieron fracciones de flavonoides a partir de cáscaras de cítricos (lima, naranja y mandarina) utilizando un método de extracción asistida por ultrasonido acuoso optimizado con alto rendimiento. La composición de las fracciones de flavonoides se estableció mediante la cromatografía líquida/espectrometría de masas. Además, se utilizó el ensayo de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico en la cual demostró que todas las fracciones de flavonoides eran capaces de inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad inducida por cobre o peroxinitrito.

Anagnostopoulou et al., 2005; analizó las diversas fracciones de piel de naranja dulce mostrando flavanonas y flavonas O-glicosiladas, flavonas C-glicosiladas, flavonas polimetoxiladas, flavonoles, ácidos fenólicos y sus derivados. Las fracciones metanólicas de cáscara de naranja dulce exhibieron una actividad antioxidante significativa. Particularmente, la fracción de acetato de etilo mostró la mejor actividad antioxidante, que se debe a flavonas C-glicosiladas, flavonas O-glicosiladas, flavonas polimetoxiladas, flavanonas O-glicosiladas y ésteres de ácidos fenólicos. Y puede utilizarse como aditivo alimentario de origen natural o suplemento farmacéutico utilizando como fuente de cáscara los subproductos de la industria del jugo de naranja.

2.1.4 Importancia de uso de nanopartículas metálicas

Los materiales nanométricos (1 - 100 nm) tienen una gran mejora en las sus propiedades (físicas y estructurales) en comparación con el material a granel. Estas diferencias se basan en su relación área-volumen.

La nanotecnología abre un nuevo catálogo de nanomateriales con propiedades únicas con nuevas aplicaciones y oportunidades de investigación. Por ende, las nanopartículas de plata han recibido un gran interés por parte de los investigadores ya que cuentan con una extraordinaria defensa contra una amplia gama de microorganismos y también debido al aumento en la resistencia a los medicamentos contra los antibióticos (Sharma et al., 2009).

Las características de las AgNPs se han aprovechado en diversos campos, como la biomedicina (Chaloupka et al., 2010), la administración de fármacos (Prow et al., 2011), el tratamiento de aguas (Dankovich, T. A.; Gray, D. G, 2011), la agricultura (Nair et al., 2010), entre otros. Las AgNps se han utilizado tanto en tintas, adhesivos, dispositivos electrónicos, pastas, etc. debido a su alta conductividad (Park et al., 2008).

Las AgNPs se han sintetizado mediante técnicas fisicoquímicas como la reducción química (Khan et al., 2011), la radiación de rayos gamma (Chen et al., 2007), la microemulsión (Zhang et al., 2006), el método electroquímico (Reicha et al., 2012), la ablación con láser (Abid et al., 2002), autoclave (Yang, J.; Pan, J., 2012), el microondas (Khan et al., 2011) y reducción fotoquímica (Alarcon et al., 2012).

Están surgiendo nuevas metodologías verdes que son una alternativa rentable y energéticamente más eficiente que los métodos convencionales. Se han utilizado para la síntesis microorganismos (Sharma et al., 2009), extractos de plantas (Song, J. Y.; Kim, B. S., 2009) y polímeros naturales (Huang, H.; Yang, X. 2004) como agentes reductores y protectores.

2.1.5 Síntesis de nanopartículas metálicas por medio extractos orgánicos

En el estudio de Chandran et al., 2006, se realizó la síntesis de nano-triángulos de oro y AgNPs por medio del extracto de la hoja de Aloe vera, los resultados de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) indican que el tamaño los nano-triángulos de oro varia de 50 a 350 nm y para las AgNPs 15.2 nm ± 4.2 nm.

En este estudio de Escárcega-González et al., 2018, se sintetizaron AgNPs a partir de extracto de la planta Acacia rigidula además se probó la actividad antimicrobiana de las AgNPs en un modelo in vivo contra 3 cepas bacterianas (E. coli ATCC-11229, Pseudomona aeruginosa ATCC-27853 y Pseudomona aeruginosa resistente a fármacos obtenida del Hospital San José en Monterrey, Nuevo León, México). Con la caracterización de las AgNPs se determinó que el tamaño de estas fue de diámetro que varía de 8 a 66 nm con una media de 22,46 nm y una desviación estándar de 10,83 nm.

En otro estudio, Siddiqi et al., 2016, se realizaron síntesis nanopartículas de paladio y platino a partir de extractos de hierbas, algas y hongos (Catharanthus roseus, Hippophae rhamnoides, Sargassum bovinum, Cacumen

platycladi, Euphorbia condylocarpa, Salvadora pérsica, C. zeylanicum, C. longa, G. jasminoides, G. max, P. glutinosa, Arabidopsis, A. latifolia, Moringa oleífera, Euphorbia granulate y Prunus x yedoensis) con las que se obtuvieron diferentes tamaños y estructuras.

2.1.6 Síntesis de nanopartículas metálicas por medio extractos citrícolas

Existe una creciente demanda comercial de nanopartículas debido a su amplia aplicabilidad en diversas áreas. Por lo cual en el estudio de Najimu et al., 2014, utilizaron cáscara de limón para la síntesis de AgNPs y además se probó su efecto en la actividad antidermatofítica en escamas de piel de pacientes con sospecha de dermatofitosis. Con el análisis FESEM se encontró que el tamaño de las AgNPs ronda entre 17,3 y 61,2 nm con forma esférica.

Shende et al., 2015; presentó un método ecológico para la síntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs) la cual utilizó jugo de limón (*Citrus medica Linn*.). La caracterización dio como resultado que las CuNPs tenían un tamaño de 10 a 60 nm con una concentración de 2.18×10^8 partículas por ml. Además, se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana de las CuNPs en el cual se determinó la sensibilidad de las bacterias mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer contra algunas especies seleccionadas de bacterias y hongos fitopatógenos. Se informó que las CuNPs sintetizadas demostraron una actividad inhibidora significativa contra *Escherichia coli* seguida de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes* y *Salmonella typhi*. Entre los

hongos fitopatógenos probados, *Fusarium culmorum* resultó ser el más sensible, seguido de *F. oxysporum* y *F. graminearum*.

Este estudio Castro et al., 2013; reportó la síntesis de diferentes nanopartículas metálicas (oro, plata y platino) mediante de la reducción de precursores metálicos por el extracto de piel de naranja. También demuestra que el tamaño y la forma de las partículas se pueden controlar mediante parámetros variables como el pH. Las nanopartículas se caracterizaron mediante la espectroscopía de absorción UV-Vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

A mediados de año, Wicaksono et al., 2020; sintetizaron nanopartículas de núcleo y capa de oro-paladio (Au-PdNPs) en la cual utilizaron $HAuCl_4$ y H_2PdCl_4 como precursores, mientras que se utilizó extracto de piel de naranja como agente reductor y estabilizador. Se caracterizaron mediante TEM y se observó una estructura núcleo-capa de las Au-PdNPs con un diámetro de núcleo promedio de 40 nm y un espesor de capa promedio de 7 nm.

Al respecto Alzahrani, et al., 2015; sintetizó AgNPs utilizando el extracto acuoso de cáscara de mandarina en diferentes proporciones (2:1, 1:1, 1:2). Los AgNPs se caracterización y se determinó que el diámetro promedio de las nanopartículas fue de 30.29 ± 5.1 nm, 16.68 ± 5.7 nm y 25.85 ± 8.4 nm, respectivamente. Posteriormente fueron evaluados como catalizadores para la degradación del tinte naranja de metilo, y los resultados confirmaron que las AgNPs pueden acelerar la degradación de este.

En un estudio, Judy Azar et al., 2013; se presenta un enfoque de química verde para la síntesis y formación de AgNPs mediante el uso de extracto de cáscara de mandarina. Este método es eficiente, simple y limpio. Con los resultados de la caracterización de las AgNPs se determinó que tamaño estaba en el rango de 5 y 20 nm.

En este estudio, Jalani et al., 2018; se utilizó el extracto de cáscara de toronja para sintetizar AgNPs. La mayoría de los AgNPs sintetizados se observaron en forma esférica que variaba entre 20 y 30 nm bajo el microscopio electrónico de barrido.

A principios de este año, en el estudio de Faghihi et al., 2020, se evaluó la formación de AgNPs a diferentes temperaturas y concentraciones de $AgNO_3$. Las AgNPs se sintetizaron con éxito mediante la cáscara de toronja a través de una ruta simple y ecológica. El tamaño de la nanopartícula se determinó que ronda de 5-65 nm. Además, se realizaron pruebas de efecto antifúngico en un cultivo de *Botrytis cinerea* in vitro. Los resultados indicaron que las AgNPs redujeron el crecimiento de este.

2.1.7 Aplicaciones de nanopartículas metálicas

En las últimas décadas, las nanopartículas metálicas con un tamaño menor a 100 nm de diámetro han tenido un impacto fundamental en diversas aplicaciones como agentes antimicrobianos, revestimientos de dispositivos biomédicos, portadores de administración de fármacos, sondas de imagen, plataformas de diagnóstico y optoelectrónicas. (Lee et al., 2019).

Basavegowda et al., 2020; presentó que las NPs monometálicas en comparación con las NPs bimetálicas y trimetálicas han atraído una inmensa atención debido a su diversa forma, tamaño, alta relación superficie/volumen, estabilidad química/física, actividad y mayor grado de selectividad. Las NPs de metal y óxido de metal demostraron tener propiedades antimicrobianas y antioxidantes muy potentes, junto con nanobiosensores para rastrear y monitorear el estado de los alimentos. Además, se proporcionaron diferentes métodos sintéticos y la importancia de las NPs bimetálicas y trimetálicas en relación con el envasado de alimentos para mejorar la vida útil de los alimentos.

Siddiqi et al., 2020 revisaron diferentes especies de plantas para fabricar nanopartículas de cobre y óxido de cobre (Cu/CuO-NPs), su aplicación en biomedicina, remediación ambiental y prácticas agrícolas. Su amplia aplicación se debe a que estas NPs son muy estables; Por lo que se utilizan en la degradación de colorantes orgánicos como el azul de metileno y la reducción de compuestos orgánicos como los fenoles. Además, se utiliza como agente antibacteriano, antioxidante y antifúngico debido a su citotoxicidad. Asimismo, se utilizan para determinar el crecimiento y la productividad de los cultivos agrícolas. Por último, se realizó una comparación del método tradicional/convencional de fabricación de NPs con los de los protocolos ecológicos.

Satyavani et al., 2011, encontró que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de células de callos *de Citrullus colocynthis* (L.) Schrad generalmente tenían forma esférica con un tamaño de 31 nm. Los resultados muestran que las nanopartículas de plata eliminarían por completo el uso de

medicamentos costosos para el tratamiento del cáncer de carcinoma epidermoide de laringe humano (HEp -2).

2.1.8 Mecanismo de síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas metálicas por vía verde se debe a la utilización de extractos de hojas, cortezas, raíces, tallos y frutos; que contienen un gran número de sustancias como carbohidratos, grasas, proteínas, enzimas y coenzimas, fenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides, etc. que son capaces de donar electrones para la reducción de iones Ag^+ a Ag^0. El agente reductor de la Ag^+ varía según el extracto utilizado (Jha et al., 2009).

2.1.9 Propiedades de las nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas son sensibles al ultravioleta-visible, eléctrica, catalítica, propiedades térmicas y antibacterianas debido a los efectos cuánticos y la gran relación superficie-volumen, esta relación varía dependiendo de la forma y el tamaño de las nanopartículas y la conductividad. (Wang 2000).

Las propiedades características de las nanopartículas metálicas son modificadas por el cambio en el área superficial, que van desde los niveles de energía, afinidad electrónica, transiciones electrónicas, propiedades magnéticas, temperatura de cambio de fase, punto de fusión y afinidad a polímeros, moléculas biológicas y orgánicas (Volokitin et al. 1996).

2.1.10 Caracterización de nanopartículas metálicas

A causa de la variación de propiedades físicas (tamaño y forma) y químicas (concentración) que suele haber en las nanopartículas metálicas por síntesis verde, es necesario llevar a cabo diversas técnicas específicas que faciliten la determinación de estas características. Las cuales se mencionan a continuación: Espectroscopía de absorción UV-Vis para observar la presencia de las NPs Metálicas, Espectroscopía Infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) para observar grupos funcionales involucrados en la síntesis y estabilización de las NPs-Metálicas, Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM) para observar características morfológicas y tamaño de dichas nanopartículas (Escárcega-González et al., 2018).

2.1.11 Dispersión de nanopartículas metálicas en caolín

Patakfalvi et al., 2004 prepararon nanopartículas de plata sobre soportes de caolinita desagregados con reducción por $NaBH_4$ y fotoquímica; En el cual se comparó el efecto del contenido de plata y el método de reducción sobre el tamaño de las AgNPs y la estructura del soporte. Se observó que en el espaciamiento basal de la caolinita se encuentra la formación de una fracción de nanopartículas dentro del espacio entre capas. Las AgNPs formadas se caracterizaron y se determinó que el tamaño de las AgNPs depende tanto del contenido de plata como del método de reducción. La fotorreducción de la plata

dio lugar a la formación de AgNPs relativamente grandes con diámetro de 8 a 14 nm.

Burridge et al., 2011 sintetizaron AgNPs en minerales de aluminosilicato, caolinita y halloysita. Estos materiales tienen el potencial de ser añadidos en productos de consumo como papel, plásticos y pinturas, teniendo así las propiedades de las AgNPs. El mecanismo por el cual se sintetizaron las NPs no afectó la forma en que se unieron a las arcillas. Las AgNPs unidas a las arcillas impartieron propiedades antimicrobianas a los compuestos resultantes, y los que incorporaron una carga de plata más alta, en particular la caolinita y la haloisita. Las NPs producidas mediante el método de reducción fotoinducida, presentaron mayores propiedades antimicrobianas en comparación a otras metodologías que incorporan NPs preparadas por reducción con $NaBH_4$. La caracterización de las AgNPs en los compuestos resultantes era mayoritariamente esférica en morfología, con un tamaño que iba desde 5 a 40 nm de diámetro, dependiendo el método de producción de NPs.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Citrus sinensis*

Anatómicamente, el fruto consta de dos regiones distintas (Fig. 1): el pericarpio también llamado cáscara, piel o corteza, y el endocarpio, o sacos de pulpa y jugo. La piel consiste en una epidermis de cera epicuticular con numerosas glándulas sebáceas aromáticas pequeñas que le da su olor particular.

La naranja contiene grandes cantidades de componentes, uno de ellos son los compuestos flavonoides que le dan su potencial antioxidante, incluyendo las actividades de quelación de metales (Bombardelli y Morazzoni, 1993). Anteriores investigaciones resaltan que los flavonoides tienen una alta capacidad para inhibir el radical hidroxilo y donar átomos de hidrógeno (Cillard y Cillard, 1988; Darmon et al., 1990).

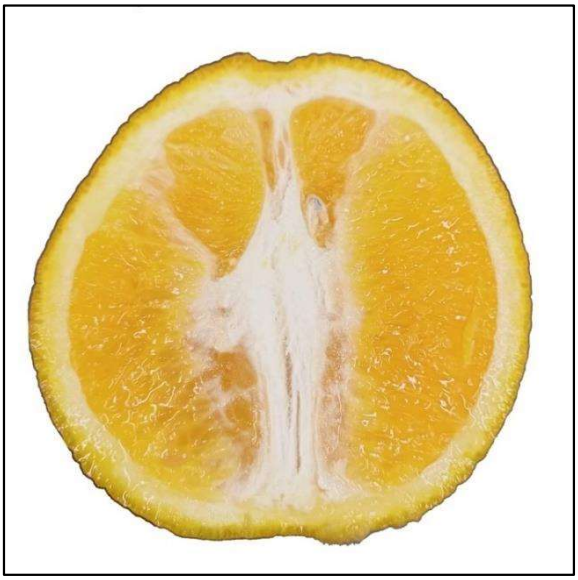

Figura 1. Fruta Naranja tipo valencia

2.2.2 Flavonoides en la cascara de naranja valencia

Los flavonoides que se han investigado en la piel o cáscara de la naranja han sido identificados mediante un análisis cromatográfico tipo HPLC y UV-vis de onda variable, los cuales se muestran en la siguiente tabla los componentes más importantes (Manthey 1996).

Tabla 1. Flavonoides identificados en la cáscara de la naranja valencia

Flavonoide	**Fórmula**
Narirutina 4′-O-glucósido	$C_{33}H_{42}O_{19}$
Eriocitrina	$C_{27}H_{32}O_{15}$
Narirutina	$C_{27}H_{32}O_{14}$
Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$
Rutinósido de isosakuranetina	$C_{28}H_{34}O_{14}$
Sinensetina	$C_{20}H_{20}O_{7}$

Fuente: Manthey 1996

2.2.3 *Citrus aurantifolia*

El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) es un fruto de un árbol de baja estatura que ronda de 4 a 5 m de altura, que cuenta con flores de color blanco de 1.5-2.5 cm de diámetro. El limón (Fig. 2) es un fruto ovalado con un color verde oscuro característico este color se da al principio, pero conforme llega a su madurez se torna de un color verde amarillento o amarillo. Este fruto mide aproximadamente de 3-5 cm de diámetro y su cáscara es muy fina y se rompe con facilidad. En su interior contiene una pulpa verdosa, jugosa, muy ácida. Semillas pequeñas y ovaladas, sus semillas son altamente poliembriónicas (generan 2 o más plantas por semilla) (Sánchez (2004)).

En una investigación realizada por Boshtam y colaboradores en el 2011 se encontró que en cáscara y el jugo fresco del limón (*Citrus aurantifolia*) tienen diferentes efectos sobre la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL). En

otra investigación se identificaron 60 compuestos volátiles del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) este estudio también exploró los efectos protectores de este aceite contra la inducción de lípidos en el cual grupos de ratas recibieron aceite esencial de limón en sus dietas. Ocho semanas después, se encontró que la ingesta de este aceite mejoró el colesterol total sérico, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de baja densidad, alanina aminotransferasa y niveles de aspartato transaminasa en las ratas hiperlipidémicas (Lin et al., 2019).

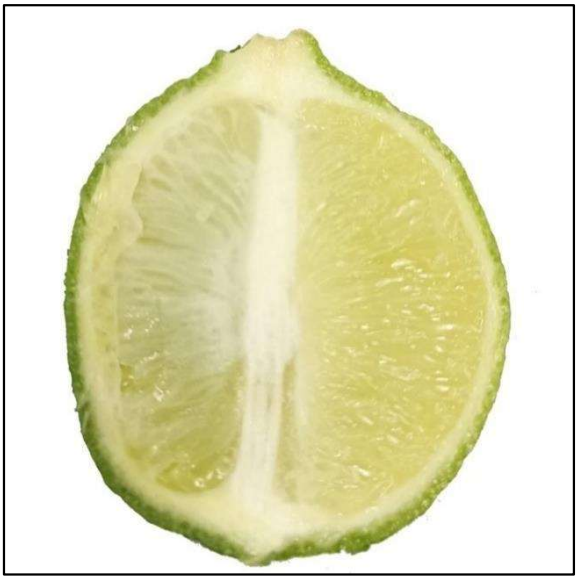

Figura 2. Fruta Limón tipo mexicano

2.2.4 Flavonoides en la cascara del limón mexicano

Se realizó la identificación de 8 flavanonas y 9 flavonas/flavonoides en 42 especies diferentes de limones, tan solo 11 tipos de flavonoides están contenidos en la cáscara del limón mexicano, la determinación de los flavonoides se realizó

por medio de un análisis HPLC, los cuales se pueden visualizar en la siguiente tabla.

Tabla 2. Flavonoides identificados en la cáscara de limón mexicano

Flavonoide	**Fórmula**
Eriocitrina	$C_{27}H_{32}O_{15}$
Narirutina	$C_{27}H_{32}O_{14}$
Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$
Neohesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$
Neoponcirina	$C_{28}H_{34}O_{14}$
Poncirina	$C_{28}H_{34}O_{14}$
Isorhoifolina	$C_{27}H_{30}O_{14}$
Diosmina	$C_{28}H_{32}O_{15}$
Neodiosmina	$C_{28}H_{32}O_{15}$
Nobiletina	$C_{21}H_{22}O_{8}$
Tangeretina	$C_{20}H_{20}O_{7}$

Fuente: Nogata 2006

2.2.5 *Citrus paradisi*

La toronja sangría (*Citrus paradisi*) es un fruto de un árbol pequeño que alcanza de 4.5 a 6 m de altura llegando en ciertas ocasiones a 13m, con hojas en forma de óvalo que van dese los 7-15 cm de longitud y un ancho de 4 a 8 cm. Las partes que conforman la toronja son primeramente los septos divisores que comúnmente son llamados gajos, la cáscara puede ser desde color naranja, rosa,

amarillo, verde, blanco y rojo; los aceites esenciales se encuentran en los gajos y el mesocarpio es de color blanco (Agustí et al, 2003).

Un estudio realizado por la Universidad de Urbino en el 2004 en el cual realizaron pruebas de la actividad antioxidante del extracto glicérico de semillas de toronja (*Citrus paradisi*) que se disolvieron en etanol y en medio acuoso, en la cual se evaluó por medio del ensayo de DPPH, el de 5-lipoxigenasa y el ensayo de quimioluminiscencia de luminoly/xantina/xantina oxidasa. Se encontró que los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que las semillas de pomelo contienen una buena actividad antioxidante (Giamperi et al., 2004).

En otro estudio se determinó la capacidad antioxidante de la toronja (Citrus paradisi L.) y la composición química de los aceites esenciales. Los actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales se estudiaron por el ensayo de eliminación de radicales DPPH y el método de difusión en disco, se encontró que los aceites esenciales tenían actividad antimicrobiana contra saprofitos (Bacillus subtilis, Saccharo myces cerevisiae, Fusarium mon iliforme, Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Penicillium chrysogenum) y microorganismos patógenos (*Pseudomonas aeruginosa, Salmonella abony, Staphylococcus aureus, Candida albicans E. Coli*), la concentración mínima inhibitoria oscila entre 6 y 60 ppm (Denkova-kostova et al., 2021).

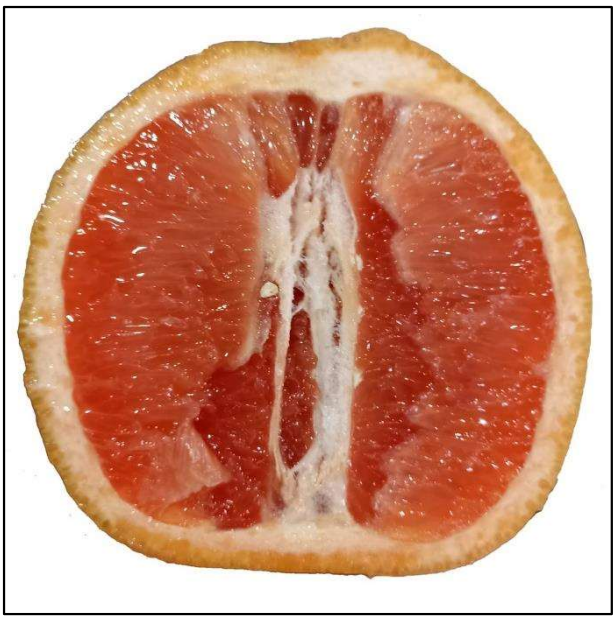

Figura 3. Fruta Toronja tipo sangría

2.2.6 Flavonoides en la cascara de toronja sangría

Se determinaron 13 flavonoides provenientes de la cáscara de toronja por medio de un análisis HPLC-MS/MS. Se identificaron 10 flavonoides, los otros 3 son equivalentes de la naringina. Los flavonoides encontrados se reportan en la siguiente tabla (Castro-vazquez 2016).

Tabla 3. Flavonoides presentes en la cáscara de la toronja sangría

Flavonoide	**Fórmula**
Isonaringina	$C_{27}H_{32}O_{14}$
Naringina	$C_{27}H_{32}O_{14}$
Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$

Tabla 3. (Continúa)

Flavonoide	Fórmula
Neohesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$
Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$
Isosinensetina	$C_{20}H_{20}O_7$
Sinensetina	$C_{20}H_{20}O_7$
Nobiletina	$C_{21}H_{22}O_8$
Tangeretina	$C_{20}H_{20}O_7$

Fuente: Castro-vazquez 2016

2.2.7 Polifenoles

Se puede denominar polifenoles a un grupo de compuestos químicos en la cual se tiene la presencia de uno o varios anillos fenólicos. En la naturaleza se encuentran una gran variedad de polifenoles provenientes principalmente de plantas, que son sintetizados en grandes cantidades y son un subproducto. Se clasifican en distintos grupos: los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides, siento este último el subgrupo más amplio de polifenoles (Quiñones 2016).

2.2.8 Flavonoides

La palabra flavonoides proviene del latín “flavus” que significa amarillo, esto hace referencia al color amarillo proveniente de los pigmentos naturales pertenecientes a las plantas, verduras y frutas. Los flavonoides son el subgrupo más grande de polifenoles y además son solubles en agua (Flores Palomino 2019).

Los flavonoides existen tres características principales de donde obtienen sus propiedades antioxidantes. La primera es debido a sus grupos hidroxilo que están unidos de los anillos aromáticos de los flavonoides, estos eliminan fácilmente a los radicales libres. La segunda característica es que consta con un sistema de deslocalización estable esto debido a que tiene anillos heterocíclicos y aromáticos, además de tener enlaces insaturados que ayuda a deslocalizar los radicales libres. Por último, de acuerdo a su estructura pueden formar complejos quelantes de diversos materiales de transición y estos pueden regular la producción de hidróxilo y superóxido (Rice-Evans 1997).

2.2.9 Narirutina

La narirutina o isonaringenina, con fórmula química de C27H32O14 y nombre de IUPAC de (2S)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-one es un flavonoide que se presenta de manera abundante en frutas cítricas como la toronja, la naranja y el limón (Peterson 2006).

Se ha reportado que tiene propiedades antinflamatorias eficaces y a la vez tiene potencial para utilizarse como suplemento dietético funcional (Ha 2012). Un estudio que se realizó en el año 1996, realizó un estudio de las concentraciones de flavonoides en la cáscara de naranja (*Citrus Sinensis L.*) mediante un análisis de cromatografía líquida HPLC y el resultado de Narirutina tuvo un valor de 1998 ±41 ppm del peso seco (Manthey 1996).

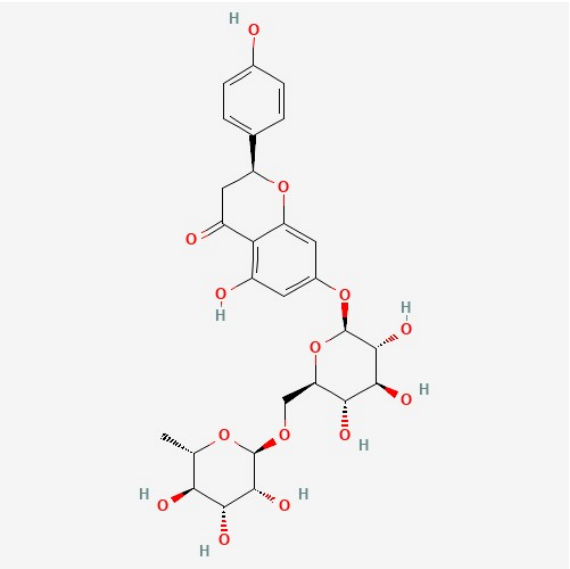

Figura 4. Estructura química de la narirutina

2.2.10 Hesperidina

La hesperidina o cirantina con formula química C28H34O15 y de nombre IUPAC (2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-one, es un flavonoide importante en la naranja dulce y el limón (Wilmsen et al., en el 2005)

En un ensayo químico realizado por Wilmsen et al., en el 2005 evaluó la capacidad de la hesperidina para secuestrar 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH,) en la cual se encontró que la hesperidina fue capaz de reducir significativamente el nivel de radicales libres DPPH, teniendo una eficacia similar a trolox.

Debido a que la cáscara de naranja es uno de los principales residuos de la naranja se puede considerar a esta como una fuente barata de hesperidina la cual podría revalorizarse para utilizarse en la industria farmacéutica, ya que

posee propiedades antioxidantes con potenciales aplicaciones antiinflamatorias, antimicrobianas y antivirales (Al-Ashaal, H. A., & El-Sheltawy, S. T. (2011)).

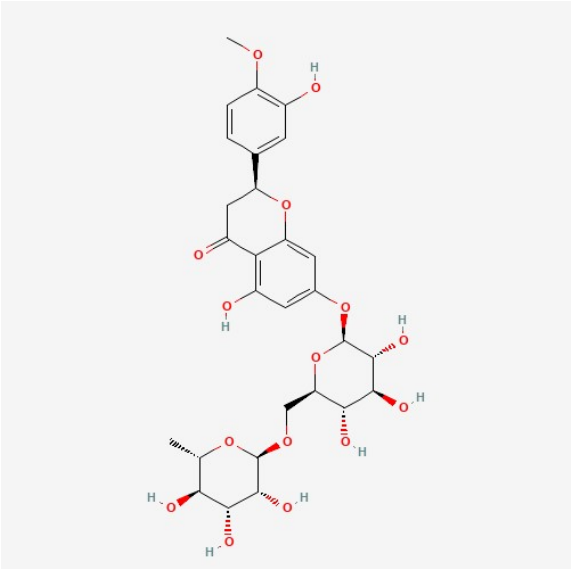

Figura 5. Estructura química de la hesperidina

2.2.11 Eriocitrina

La hesperidina o cirantina con formula química C27H32O15 y de nombre IUPAC (2S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl 6-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranoside, es un ingrediente derivado de productos naturales, y está contenido en el jugo de frutas cítricas (Hajimahmoodi et al., en el 2014).

En un estudio realizado por Hajimahmoodi et al., en el 2014 evaluó sus actividades antioxidantes totales y el contenido de flavonoides en 38 juegos de limones naturales y 62 jugos de marca. Se evaluó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se encontró que los limones naturales tuvieron una

mayor capacidad antioxidante y de flavonoides en comparación con los de la industria.

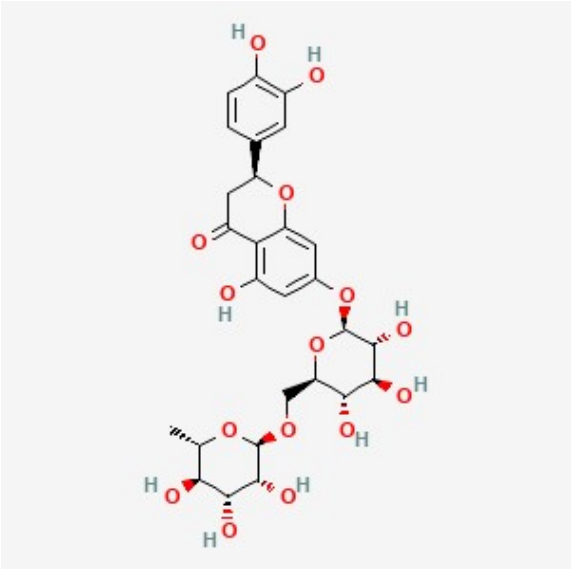

Figura 6. Estructura química de la eriocitrina

2.2.12 Naringina

La hesperidina o cirantina con formula química C27H32O14 y de nombre IUPAC (2S)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl 2-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranoside, la naringina es uno de los fenoles más populares que se encuentran en los cítricos (Bacanli et al., 2015).

En el 2015 Bacanli y colaboradores investigaron las capacidades antioxidantes de limoneno y naringina por ensayo de capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) y los efectos citotóxicos del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en células de fibroblastos de hámster chino. El limoneno y la naringina en todas las concentraciones revelaron una reducción en la frecuencia de micronúcleos y ADN daños inducidos por H2O2.

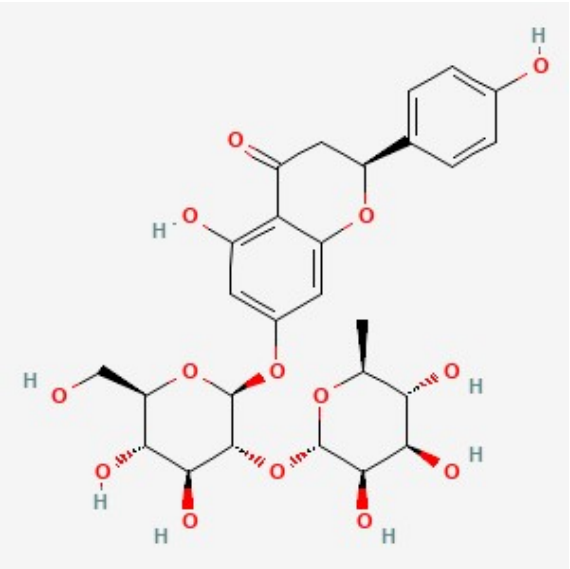

Figura 7. Estructura química de la naringina

2.2.13 Tangeretina

La tangeretina con formula química C20H20O7 y de nombre IUPAC 5,6,7,8-tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl) chromen-4-one, La tangeretina es un flavonoide de suma importancia que se encuentra ampliamente en las cáscaras de los cítricos (Ashrafizadeh et al., 2020).

En este estudio se investigó el efecto antiinflamatorio de la tangeretina en la microglía estimulada por lipopolisacáridos. Se encontró que la tangeretina posee un potente efecto antiinflamatorio y antioxidante en la microglía (Lee et al., 2016).

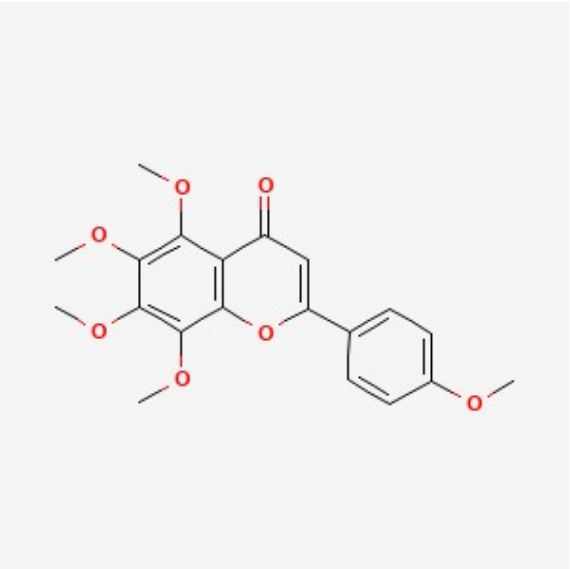

Figura 8. Estructura química de la tangeretina

2.2.14 Método verde

Las investigaciones sobre la síntesis por vía de metodologías verdes resultan ser más efectivas para la generación de las nanopartículas, ya que se tiene una menor posibilidad de falla, un costo reducido y facilidad de caracterización. La estrategia de utilizar plantas no es un procedimiento complicado, solamente se obtiene un extracto de la planta y se sintetiza junto con la sal metálica durante unos minutos o incluso horas a temperatura ambiente. Este tipo de síntesis se ha incrementado y se ha utilizado mucho en nanopartículas de plata y de oro (Gour, A.; Jain, N. K, 2019).

Las nanopartículas sintetizadas por una metodología verde se ven favorecidas ecológicamente ya que la síntesis convencional atrae un uso mayor de productos químicos y un mayor riesgo de toxicidad para la salud humana y el medio ambiente (Gour, A.; Jain, N. K, 2019).

2.2.15 Caracterización de nanopartículas mediante espectrofotometría UV-Vis

Con ayuda de la espectroscopia UV-visible se puede estudiar la banda de asimilación de reverberación del plasmón superficial debido a la vacilación consolidada de los electrones de la banda de conducción en la superficie de las nanopartículas metálicas en reverberación con la onda de luz (Subhapriya, S.; Gomathipriya, P., 2017).

Ibrahim en el 2015 informó la bio-reducción por medio de extracto de cáscara de plátano, reduciendo el nitrato de plata a nanopartículas de plata y estimando con la espectroscopia UV-visible el pico de absorbancia de la plata en 433nm.

En el 2021 Ghaffar y colaboradores utilizaron cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) para síntesis de nanopartículas de cobre reportando un pico de absorbancia en 525nm.

2.2.16 Staphyloccocus aureus

En 1880 el cirujano escocés Alexander Ogston descubrió el *Staphylococcus aureus* en el pus producido por las heridas quirúrgicas. Alexander le dio el nombre de *"Staphylococcus",* del griego "Staphylo" que significa "racimo de uvas". Unos años después en 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach identificó dos cepas de *Staphylococcus* y las nombró de acuerdo

a las pigmentaciones que producían: *S. aureus,* del latín "aurum" para el pigmento color oro, y *S. albus* para el pigmento blanco (Pasachova et al., 2019).

Esta bacteria está clasificada como un coco Gram positivo que se agrupa en racimos, β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Este patógeno se caracteriza por generar infecciones en piel y tejidos blandos, invasión a dispositivos médicos y también ha sido relevante en las enfermedades transmitidas por alimentos (Pasachova et al., 2019).

El cultivo más común para identificar y crecer el S. aureus es el agar Baird Parker, en el cual las colonias de S aureus se tornan de un color negro y un halo transparente. Otro agar comúnmente utilizado es el salado manitol este posee agentes para que solamente exista crecimiento de las diferentes especies de *Staphylococcus,* las colonias de *S. aureus* son de color amarillo, mientras que las especies de *S.* coagulasa negativa producen colonias de color rojo. Para la identificación de cepas patógenas se utiliza el agar DNAs; en este agar se utiliza para medir la capacidad del patógeno para hidrolizar el ADN, este se puede observar debido a que forma halos transparentes en el medio (Pasachova et al., 2019).

2.2.17 Medio de cultivo microbiano

Se le denomina medio de cultivo a un gel o una solución que contiene los compuestos y nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de un microorganismo. Estos pueden contener nutrientes determinados para el crecimiento de cierta cepa dándole las condiciones óptimas para su crecimiento

y/o identificación. Estas condiciones pueden ser la consistencia adecuada del medio (semisólido o sólido), pH, esterilidad, concentración de monosacáridos o algún metabolito en específico, también que sea orgánico o inorgánico (Medina 2012).

2.2.17.1 Caldo LB Broth (Miller)

El caldo Luria Broth (Miller) es un medio para el crecimiento y mantenimiento de cepas recombinantes de *E. coli* y también está formulado para promover el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes. Este tiene un color beige en polvo y una vez se prepara en medio se torna de un color ámbar teniendo un pH de 7, las condiciones para la incubación son de 35+-2°C durante 18-24 horas. El caldo LB (Miller) contiene veinte veces el nivel de cloruro de sodio de Luria Broth base y el doble del nivel en LB Broth Lennox (Condalab 2019).

3 Capítulo 3. Metodología

3.1 Tipo de investigación

Esta investigación se desenvuelve principalmente con un carácter exploratorio y cualitativo. Para concluir los objetivos planteados anteriormente, se requiere una revisión de exhaustiva de la síntesis verde de nanopartículas metálicas y la dispersión de estas en caolín, tomando como referencia la literatura investigada hasta la fecha.

3.2 Técnicas de recolección de información

Para este estudio se utilizaron diversas fuentes como la principal fuente de información, como las revistas y una gran variedad de artículos científicos de distintas revistas pertenecientes al Journal Citation Reports (Factor de Impacto), como lo son: International Journal of Nanomedicine, Heliyon, Elsevier, MDPI, entre muchas otras. Como fuentes secundarias, que sirven como información conceptual de la fundamentación teórica para la comprensión y realización de esta investigación.

3.3 Variables

El proyecto se dividió en cinco etapas (síntesis de AgNPs, síntesis de CuNPs, dispersión de AgNPs en caolín, dispersión de CuNPs en caolín y la actividad antimicrobiana). Siendo las principales variables independientes el volumen del extracto, tiempo y temperatura de reacción en la etapa de síntesis. Para la actividad antimicrobiana las variables independientes fueron las concentraciones de las nanopartículas metálicas y el color de la solución de cada una de estas. Las variables dependientes de la etsapa de síntesis son la longitud de onda de las nanopartículas metálicas sintetizadas, la forma y tamaño aproximado. Para la etapa antimicrobiana es la concentración mínima inhibitoria.

3.4 Materiales y equipos

En la siguiente tabla se representan todos los instrumentos de laboratorio y equipos que se utilizaron para el desarrollo de esta investigación, los cuales se

encuentran en su mayoría en el Laboratorio de Biología Sintética y Sistemas, otros equipos se encuentran en el Laboratorio de Materiales Optoelectrónicos y en el Laboratorio de Desarrollo y Escalamiento de Bioprocesos en el Centro de Investigación de Biotecnología y Nanotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Tabla 4. Materiales y equipos utilizados

Instrumentos y equipo de laboratorio	**Marca/Modelo**	**Uso**
Placa calefactora con agitación	SH-2	Síntesis de nanopartículas de cobre
Centrífuga	Thermo Scientific Sorvail Legend XFR	Purificación de las nanopartículas sintetizadas
Balanza digital	CHAUS Traveler	Pesado de las cáscaras cítricas
Balanza analítica	AND GR-200	Preparación de soluciones de $AgNO_3$, $Cu(NO_3)_2$ y Caolín
Baño de ultrasonido	VWR 97043-996	Dispersar / sintetizar caolín y AgNPs

Tabla 4 (Continúa)

Instrumentos y equipo de laboratorio	Marca/Modelo	Uso
Incubadora	Lab Companion IS-971	Crecimiento y mantenimiento del cultivo microbiano
Lector de placas	Thermo Scientific Multiskan GO	Crecimiento y medición de la actividad antimicrobiana. Determinación de AgNPs y CuNPs
Espectrofotómetro UV-Vis	Espectrofotómetro UV-Vis	Espectrofotómetro UV-Vis
Optizen	Optizen	Optizen
Refrigerador	Thermo Scientific MH45PA-GAEE-TS GRP series	Conservación en frío del extracto, caldos LB preparados, muestras de AgNPs, CuNPs
Autoclave	Lab Companion ST-85G	Esterilización de material y caldo LB
Liofilizadora	Labconco Freezone 6	Deshidratación de las nanopartículas sintetizadas
Bomba de vacío	Rocker 400	Filtración de la solución de cáscaras

Tabla 4 (Continúa)

Instrumentos y equipo de laboratorio	Marca/Modelo	Uso
Horno	HS-46	Secado del exceso de etanol en la purificación de las nanopartículas metálicas
Agitador	Scientific Industries G650	Agitación de muestras

3.5 Origen de los reactivos

Se utilizó la sal de nitrato de plata en polvo con una pureza del 99.98% marca Jalmek, nitrato de cobre hidratado de la marca Sigma-Aldrich y caolín de la marca Sigma-Aldrich.

Se utilizaron las cáscaras de aproximadamente 100 limones del tipo limón agrio (limón mexicano), 20 naranjas del tipo naranja valencia y 10 toronjas de la variedad sangría, todos estos residuos de cáscara fueron adquiridas del consumo propio y de compañeros del mismo centro de investigación.

Para la medición de la concentración mínima inhibitoria se utilizaron 8 placas de 96 pocillos de la marca Corning. Se utilizó caldo Luria Broth (Miller) de la marca BD Difco. Se utilizó un cultivo de S. aureus resistente a Kanamicina, clorafenicol, ciprofloxacina y a la ampicilina.

3.6 Preparación de las cáscaras cítricas

Las cascarás de naranja, limón y toronja recolectadas se lavaron con agua destilada hasta que quedaron completamente limpias, se secaron con papel absorbente y se posteriormente se cortaron en partes pequeñas con un tamaño uniforme (≈1cm^2), una vez cortadas se pesaron para su posterior uso en la preparación de los agentes reductores y estabilizadores.

3.7 Preparación del agente reductor y estabilizador a partir de la cáscara de cítricos

Debido a que la materia de prima es un residuo no se tiene una limitación de la cantidad a utilizar, pero con base a la literatura se utilizan entre 5 g y 20 g las cáscaras. Se prepararon soluciones de 20 g de cáscaras y 100 ml de agua. Estas se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas (Escárcega-González et al., 2018).

Se prepararon un total de cuatro tipos de soluciones una para cada cáscara (limón, naranja y toronja) y la combinación de las tres cáscaras juntas.

Luego cada solución se filtró a través de un papel filtro por medio de un equipo de filtración que consta principalmente de bomba de vacío, matraz Kitasato y un embudo Büchner y se mantiene en refrigeración como método de conservación (Escárcega-González et al., 2018).

3.8 Preparación del nitrato de plata acuoso

Para la preparación de la solución de sal de plata se tomará en cuenta el peso molecular del nitrato de plata ($AgNO_3$) 169.87 g/mol; para una solución de $AgNO_3$ 0.1M se pesarán 1.6987g de la sal y se aforará a 100 ml de agua destilada en un frasco de vidrio ámbar el cual estará sellado herméticamente y conservado a temperatura ambiente (Escárcega-González et al., 2018).

3.9 Preparación del nitrato de cobre acuoso

La solución de sal de cobre se preparará tomando en cuenta el peso molecular del nitrato de cobre hidratado ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$) 241.56 g/mol; para una solución de $Cu(NO_3)_2$ 0.2M se pesarán 4.8312g de la sal y se aforará a 100 ml de agua destilada en un frasco de vidrio el cual estará sellado herméticamente y conservado a temperatura ambiente (Sumitha 2016).

3.10 Síntesis de nanopartículas de plata

Para la síntesis de AgNps, permanecerán constantes la mezcla de los volúmenes y las concentraciones del extracto reductor y de la sal de plata, se realizarán tres metodologías de síntesis que se describen a continuación:

3.10.1 Síntesis de AgNPs por ultrasonido

En un tubo Corning de 50 ml se adicionarán 20ml de $AgNO_3$ 0.1M en 20ml de extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) a temperatura de 60°C y ultrasonido durante 60 minutos o hasta que la solución cambiara de un color

transparente-amarillo a un color café-negro. Una vez finalizado se deja enfriar a temperatura ambiente. (Azizi-Toupkanloo et al., 2014)

3.10.2 Síntesis de AgNPs por baño de agua

En un tubo Corning de 50 ml se adicionarán 20ml de $AgNO_3$ 0.1M en 20ml de extracto (limón, naranja, toronja o su combinación), el tubo se coloca en un baño de agua a temperatura de 60°C durante 60 minutos o hasta que la solución cambiara de un color transparente-amarillo a un color café-negro. Una vez finalizado se deja enfriar a temperatura ambiente. (Escárcega-González et al., 2018).

3.10.3 Síntesis de AgNPs sin energía

En un tubo Corning de 50 ml se adicionarán 20ml de AgNO3 0.1M en 20ml de extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) a temperatura de ambiente durante 24 horas con agitación ocasional hasta que la solución cambiara de un color transparente-amarillo a un color café-negro.

3.11 Síntesis de nanopartículas de cobre

Para la síntesis de CuNps se realizarán tres metodologías de síntesis que se describen a continuación:

3.11.1 Síntesis de CuNPs por ultrasonido

En un tubo Corning de 50 ml se adicionarán 20ml de $Cu(NO_3)_2$ 0.2M en 20ml de extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) a temperatura de

80°C y ultrasonido durante 60 minutos o hasta que la solución cambiara de un color verde brillante a un color verde oscuro. Una vez finalizado se deja enfriar a temperatura ambiente.

3.11.2 Síntesis de CuNPs por calentamiento

En un matraz de 250 ml se adicionarán 50ml de $Cu(NO_3)_2$ 0.2M en 50ml de extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) se lleva a una temperatura de 90°C con agitación durante 60 minutos o hasta que la solución cambiara de un color verde brillante a un color verde oscuro. Una vez finalizado el tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se transfiere a tubos Corning de 50 ml. La reacción se deja continuar en el tubo Corning durante 3 días.

3.11.3 Síntesis de CuNPs extracto en exceso

En un tubo matraz de 500ml se adicionarán 40ml de $Cu(NO_3)_2$ 0.2M en 360ml de extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) se lleva a una temperatura de 100°C con agitación durante 60 minutos o hasta que la solución cambiara de un color verde brillante a un color verde oscuro. Una vez finalizado se deja enfriar a temperatura ambiente y se transfiere a tubos Corning de 50 ml.

3.12 Purificación de nanopartículas de plata y cobre

Para eliminar residuos orgánicos y purificar las nanopartículas metálicas sintetizadas, se centrifugan a 9000 rpm durante 15 min, el sobrenadante es extraído y eliminado; en seguida se agregan 20ml etanol al 96 % para lavar el producto y se repetirá la centrifugación dos veces más.

3.13 Secado de nanopartículas de plata y cobre

Después de la purificación los tubos Corning se dejaron expuestos al ambiente para secar los residuos de etanol restantes, si el etanol no se secó en uno o dos días se ingresa al horno por una a dos horas antes de introducirse a la liofilizadora.

Las AgNPs y CuNPs se deshidratan en la liofilizadora a -52°C y 0.310 mBar durante 24 horas. Pasado este tiempo se procederán a pesarse y posteriormente se realizará una solución de 1mg/ml en agua destilada como diluyente, después se almacenará el producto a temperatura ambiente y protegido.

3.14 Dispersión de AgNPs en caolín

En un vaso de precipitado de 250ml se adicionarán 2g de caolín con 200ml de agua destilada y se llevará a cabo la dispersión del caolín en un baño de ultrasonido por 60 minutos. Una vez pasado este tiempo se añadirán 20ml del extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) y 0.339g de $AgNO_3$, se volverá a someter a ultrasonido por 60 minutos o hasta que la solución cambie de un color blanco a un color café-negro.

Una vez realizada la dispersión y la síntesis se deja reposar durante la noche, al día siguiente se remueve el excedente de la solución por medio de decantación o pipeteo para dejar solamente el caolín y las AgNPs que se transferirán a un tubo Corning de 50 ml.

3.15 Dispersión de CuNPs en caolín

En un matraz Erlenmeyer de 500ml se adicionarán 2g de caolín con 200ml de agua destilada y se llevará a cabo la dispersión del caolín en una plancha de calentamiento agitándose por 60 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo se añadirán 360ml del extracto (limón, naranja, toronja o su combinación) y 0.966g de $Cu(NO_3)_2$, se llevará hasta 100°C con agitación constante por 60 minutos o hasta que la solución cambie de un verde brilloso a un verde-marrón.

Una vez realizada la dispersión y la síntesis se deja reposar durante la noche, al día siguiente se remueve el excedente de la solución por medio de decantación o pipeteo para dejar solamente el caolín y las CuNPs que se transferirán a un tubo Corning de 50 ml.

3.16 Purificación de nanopartículas de plata y cobre dispersas en caolín

Para eliminar residuos orgánicos y purificar las nanopartículas metálicas sintetizadas y dispersas, se centrifugan a 9000 rpm durante 20 min, el sobrenadante es extraído y eliminado; en seguida se agregan 20ml etanol al 96 % para lavar el producto y se repetirá la centrifugación dos veces más.

3.17 Secado de nanopartículas de plata y cobre dispersas en caolín

Después de la purificación los tubos Corning se dejaron expuestos al ambiente para secar los residuos de etanol restantes, si el etanol no se secó en

uno o dos días se ingresa al horno por una a dos horas antes de introducirse a la liofilizadora.

Las AgNPs y CuNPs dispersas en caolín se deshidratan en la liofilizadora a -52°C y 0.310 mBar durante 24 horas. Pasado este tiempo se procederán a pesarse y posteriormente se realizará una solución de 1mg/ml en agua destilada como diluyente, después se almacenará el producto a temperatura ambiente y protegido.

3.18 Caracterización de nanopartículas

Se emplearon técnicas microscópicas especializadas como microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de alta resolución (HRTEM). Estas técnicas ayudan a dar imágenes directas de las nanopartículas sintetizadas.

Además, se emplearon técnicas convencionales como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia ultravioleta y visible (UV-Vis). Este conjunto de técnicas permitió una caracterización cualitativa y cuantitativa de las nanopartículas sintetizadas.

3.18.1 Espectrofotometría UV-Vis

Para determinar cualitativamente las nanopartículas de plata y cobre se realiza mediante el Espectrofotómetro Multiskan G0 UV-Vis del Laboratorio de Biología Sintética y Sistemas del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para caracterizar las nanopartículas sintetizadas mediante la técnica de UV-Vis se correrá una muestra de Ag-CuNPs (solución 1mg/ml en agua destilada como diluyente) y su blanco correspondiente utilizando un Espectrofotómetro Multiskan G0 UV-Vis. Esta técnica utiliza un rango dinámico de 200 a 1000 nm por lo que este análisis nos dió un espectro con una banda característica de las AgNPs entre 400 y 500 nm (Escárcega-González et al., 2018) y para las CuNps una banda característica en 580nm (Ramyadevi et al., 2012).

3.18.2 Técnicas microscópicas (TEM y HRTEM)

Para conocer las características morfológicas de las AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNps, se utilizará la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM), la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y difracción electrónica de área seleccionada (SAED), para este análisis se utilizó un microscopio FEI-TITAN del Centro de Investigación en Química Aplicada, en el cual se colocó una muestra de AgNPs y CuNPs (solución 1mg/ml en agua destilada como diluyente) la cual se dispersó previamente por medio de un baño de ultrasonido y se colocó sobre una malla de cobre para las AgNPs y Caolín-AgNPs y se utilizó una malla de oro para las CuNPs y Caolín-CuNPs, estas mallas están recubiertas de carbono para determinar los elementos presentes en las muestras.

3.19 Prueba antibacteriana in vitro

Para el desarrollo de las pruebas antimicrobianas, se necesita realizar cultivos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente que fueron

proporcionadas por el Laboratorio de Biología Sintética y Sistemas del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León.

La cepa de *Staphylococcus aureus* resistente se encontraba en un caldo en refrigeración. Se utilizaron 200 microlitros de la solución *S. aureus* resistente para la siembra. Se colocaron en un tubo Corning estéril de 15ml junto con 5ml de caldo LB.

El cultivo de *S. aureus* resistente se cultivará a 37 °C durante 20 h en agitación a 100 rpm, al término de este tiempo, los cultivos de diluirán 1:250 en medio LB hasta alcanzar una densidad óptica OD_{600} de 0.2 ± 0.02 ajustando con medio fresco que indica una concentración celular entre 10^7 y 10^8 células/ml; luego esta suspensión se diluirá nuevamente 1:100 en caldo LB fresco, resultando la suspensión bacteriana de trabajo. (Andrews, 2001 y Escárcega-González et al., 2018).

3.20 Concentración Mínima Inhibitoria

Se utilizaron placas de 96 pocillos; primero se tomaron la solución madre AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNPs (solución 1mg/ml de caldo LB como diluyente) previamente preparadas y se diluyó hasta obtener AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNPs (solución 0.5 mg/ml de caldo LB como diluyente) a un volumen final de 200 µl; ahora mediante diluciones en serie, se tomarán 100 µl de la solución anterior a cada una de los siguientes pocillos con 100 µl de medio de cultivo y se descartaron los últimos 100 µl.

A cada pocillo se agregó 100 µl de la suspensión bacteriana de trabajo para lograr una concentración de 10^5 células/ml; las condiciones de incubación fueron a 37 °C durante 22 horas, en el cual se midió su cinética de crecimiento en cada hora para observar su crecimiento y medir con más exactitud su concentración mínima inhibitoria MICs para las AgNps, CuNPs, Caolín-AgNps y Caolín-CuNps. Todas las pruebas y sus respectivas muestras de control de crecimiento, esterilidad y de color se realizaron por triplicado (Andrews, 2001, Cavaleri, 2005, y Escárcega-González et al., 2018).

3.21 Concentración bactericida mínima (MBC)

Se evaluó la actividad bactericida de las AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNPs sintetizadas, utilizando 1, 2 y 4 veces la MIC determinada anteriormente por parte de las Ag-CuNPs contra las cepas bacterianas. Para llevar a cabo esta evaluación, se diluyeron los cultivos de bacterias 1:250 en caldo Luria fresco (LB) para después incubarse a 37 °C a 150 rpm durante 20 h.

Se debe dar seguimiento cada hora el cultivo hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial a una densidad óptica de OD_{600} de 0.2 ± 0.02. Posteriormente, se tomaron de los cultivos 20 µl y se colocaron en las placas de 96 pocillos con solución de AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNPs; los cultivos serán incubados a 37 °C a 100 rpm durante 20 h; luego, con el método de cuenta en placa, se realizaron alícuotas diluidas y se colocaron en cada placa 3 gotas de 10 µl de cada alícuota con agar LB, se cultivarán a 37 °C durante 24 h y se contarán las colonias de cada muestra. Todas las pruebas y sus

respectivas muestras de control de crecimiento, esterilidad y de color se realizarán por triplicado (Andrews, 2001, Cavaleri, 2005, y Escárcega-González et al., 2018).

4 Capítulo 4. Análisis de resultados

4.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Las soluciones de nanopartículas de plata elaboradas en el punto 3.10.1 y 3.10.2 se sintetizaron exitosamente debido a que se observó un cambio de color de amarillo claro (por parte del extracto) a un color marrón-negro oscuro (figura 9), surgiendo la formación de AgNPs según los reportes (Escárcega-González et al., 2018 y Faghihi et al., 2020). En distintas investigaciones hacen mención que el cambio de coloración a marrón se da por el desarrollo de nanopartículas de plata utilizando solventes orgánicos.

Debido a que le proyecto busca la ruta de síntesis más verde se optó por elegir la metodología descrita en el punto 3.10.3, la cual al igual que las anteriores se observó un cambio de color de amarillo claro a un color marrón-negro.

Al finalizar el proceso la mezcla resultante se procedió a purificar de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.12 y secado del punto 3.13. Las AgNPs secas se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seguro, dejándolas reposar por 7-10 días para realizar las pruebas antimicrobianas. Las AgNPs sintetizadas se pueden observar en la figura 9.

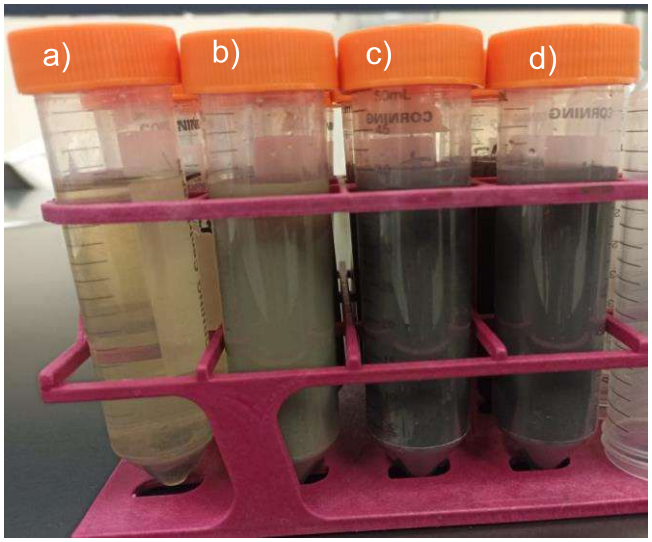

Figura 9. Solución de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de cáscara de a) limón, b) naranja, c) toronja y su d) combinación

4.2 Síntesis de nanopartículas de cobre

Las soluciones de nanopartículas de cobre elaboradas en el punto 3.11.3 se sintetizaron exitosamente debido a que se observó un cambio de color de verde brillante (por parte del extracto y la sal de cobre) a un color verde oscuro (figura 10), surgiendo la formación de CuNPs según los reportes (Sumitha 2016). En distintas investigaciones hacen mención que el cambio de coloración a verde oscuro se da por el desarrollo de nanopartículas de plata utilizando solventes orgánicos.

Debido a que la producción de CuNPs en los puntos 3.11.1 y 3.11.2 fue mínima o nula se descartaron por su bajo rendimiento.

Al finalizar el proceso la mezcla resultante se procedió a purificar de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.12 y secado del punto 3.13. Las CuNPs secas se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seguro, dejándolas

reposar por 7-10 días para realizar las pruebas antimicrobianas. Las CuNPs sintetizadas se pueden observar en la figura 10.

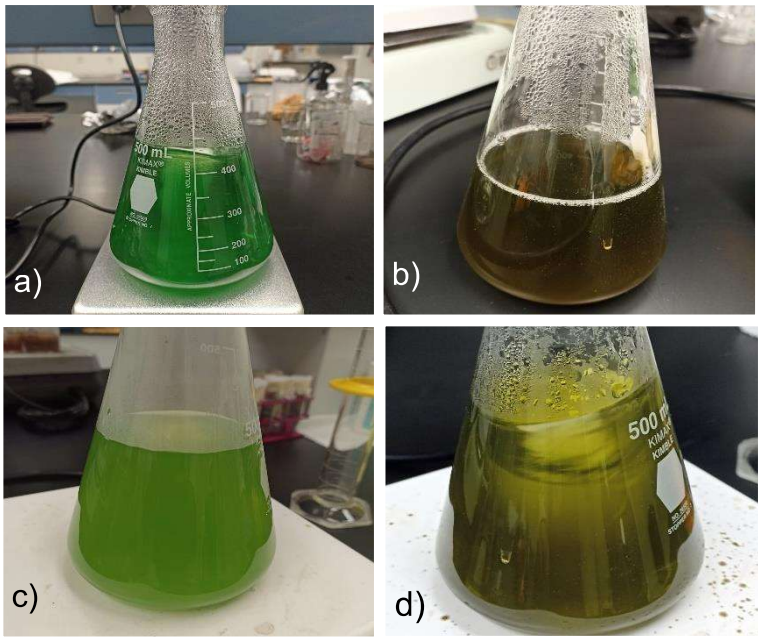

Figura 10. Solución de nanopartículas de cobre sintetizadas a partir de extracto de cáscara de a) limón, b) naranja, c) toronja y su d) combinación

4.3 Dispersión de AgNPs en caolín

Las dispersiones de nanopartículas de plata elaboradas en el punto 3.14 se sintetizaron exitosamente debido a que se observó un cambio de color de blanco (por parte del caolín) a un color marrón (figura 11), surgiendo la formación de AgNPs dispersas en caolín según la investigación publicada por la Australian Ceramic Society en 2021(Hariram et al., 2021).

Al finalizar el proceso la mezcla resultante se procedió a purificar de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.16 y secado del punto 3.17. Las Caoín-AgNPs secas se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seguro,

dejándolas reposar por 7-10 días para realizar las pruebas antimicrobianas. Las Caolín-AgNPs sintetizadas se pueden observar en la figura 11.

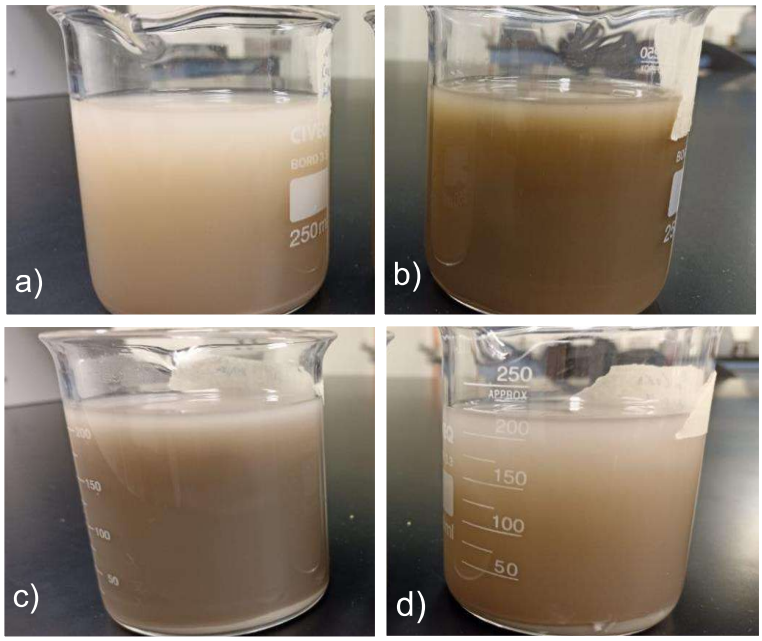

Figura 11. Solución de Caolín-AgNps después de 24 horas a partir de extracto de cáscara de a) limón, b) naranja, c) toronja y su d) combinación

4.4 Dispersión de CuNPs en caolín

Las dispersiones de nanopartículas de sobre caolín elaboradas en el punto 3.15 se sintetizaron exitosamente debido a que se observó un cambio de color de verde brillante (por parte del caolín) a un color verde oscuro-café (figura 12), surgiendo la formación de AgNPs dispersas en caolín según la investigación publicada por la Australian Ceramic Society en 2021(Hariram et al., 2021). Al finalizar el proceso la mezcla resultante se procedió a purificar de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.16 y secado del punto 3.17. Las Caolín-AgNPs secas se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seguro,

dejándolas reposar por 7-10 días para realizar las pruebas antimicrobianas. Las Caolín-AgNPs sintetizadas se pueden observar en la figura 12.

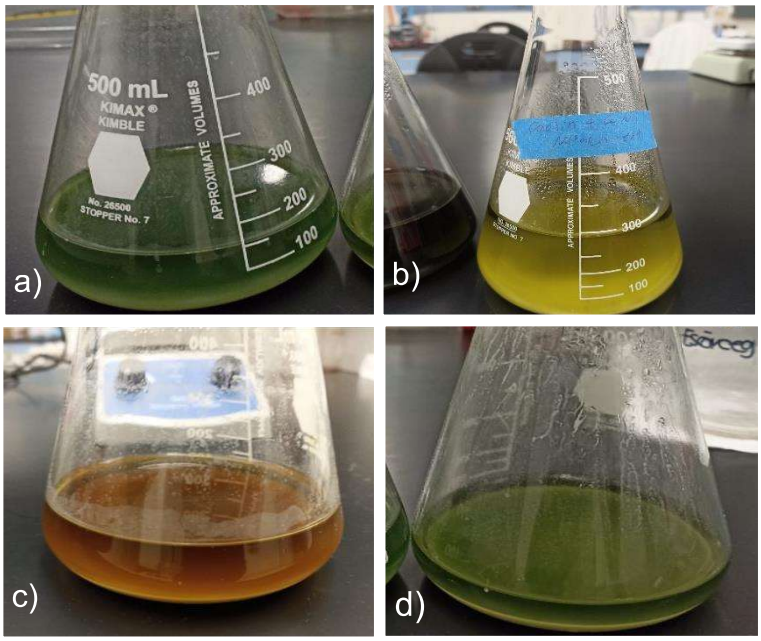

Figura 12. Solución de Caolín-CuNps después de 24 horas a partir de extracto de cáscara de a) limón, b) naranja, c) toronja y su d) combinación

4.5 Caracterización de nanopartículas por espectrofotometría UV-Vis

Se utilizó el espectrofotómetro Multiskan GO con las muestras de AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNps se realizó una dilución de 1 mg de nanopartículas en 1 mL de agua destilada para poder leer en los pocillos. El blanco fue agua destilada para AgNPs y CuNPs en el caso de las caolín-AgNPs y caolín-CuNPs se utilizó como blanco una disolución de 1 mg de caolín en 1 mL de agua destilada.

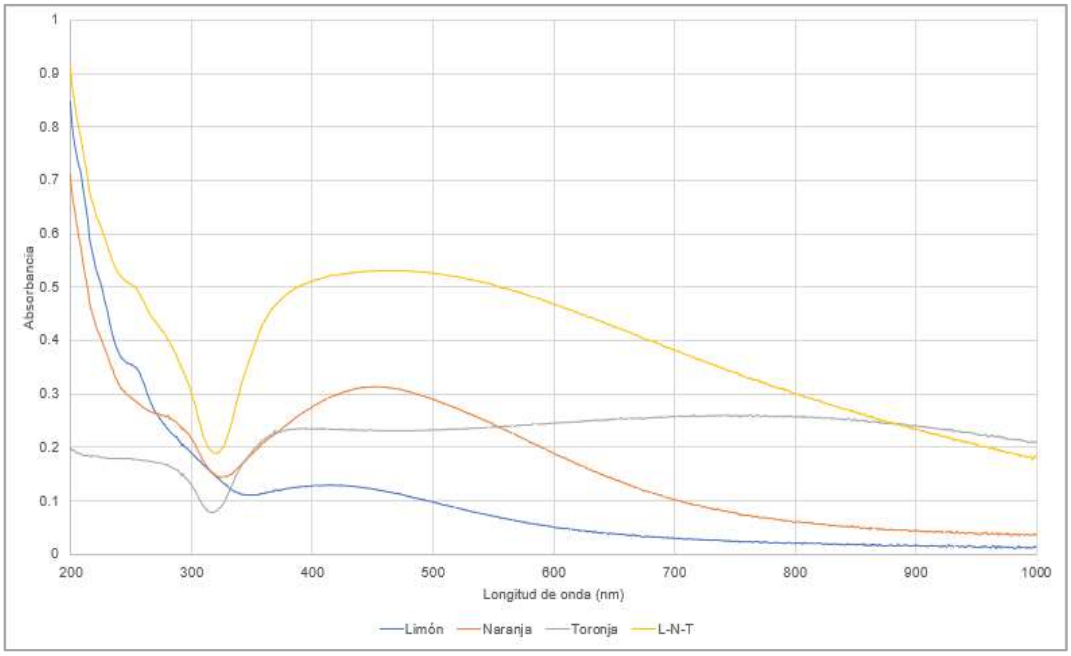

Figura 13. Análisis de AgNPs por espectroscopía UV-Vis

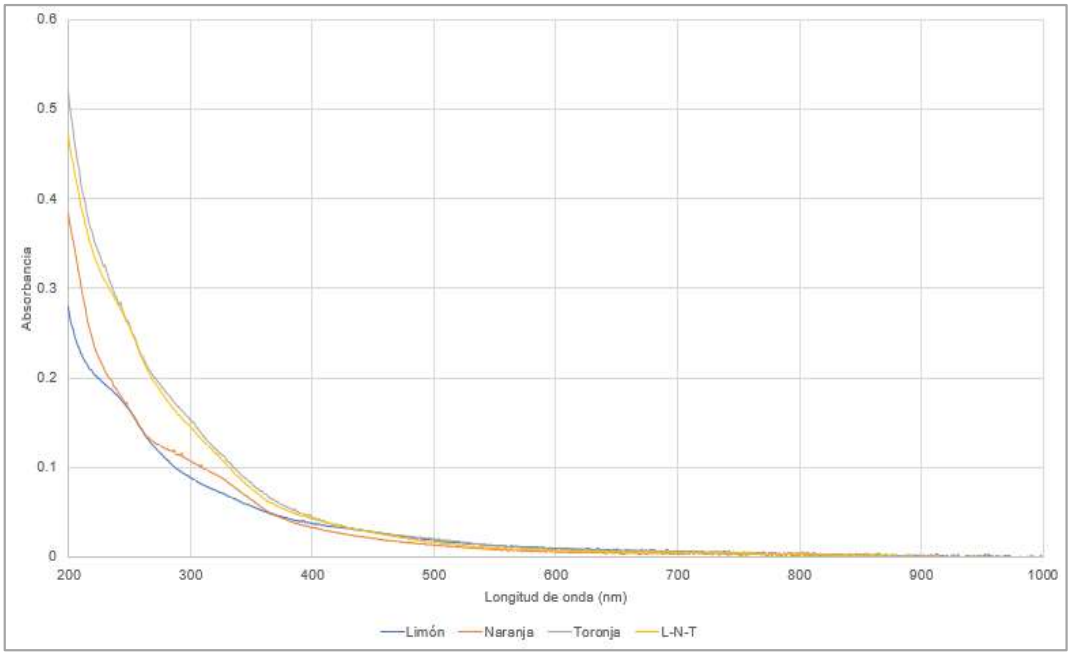

Figura 14. Análisis de CuNPs por espectroscopía UV-Vis

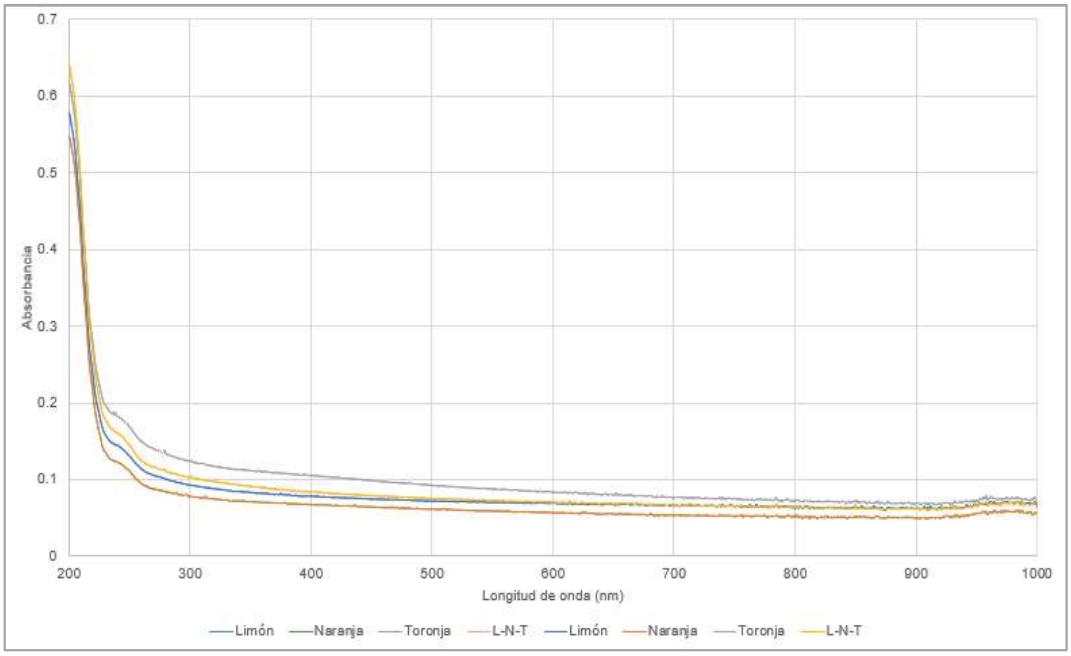

Figura 15. Análisis de Caolín-AgNPs por espectroscopía UV-Vis

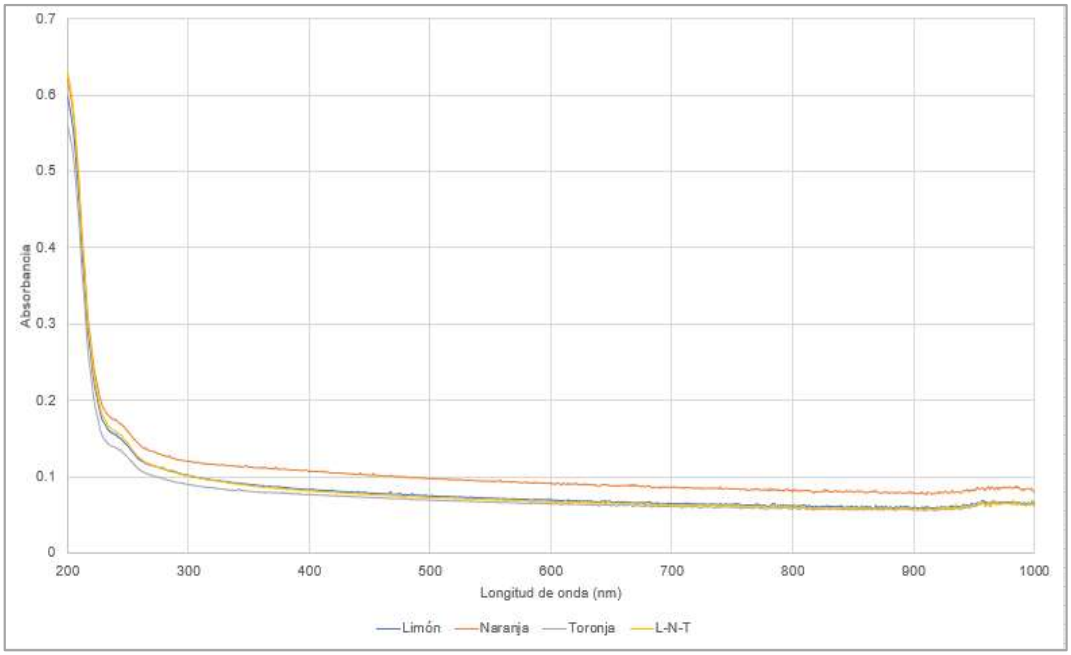

Figura 16. Análisis de Caolín-CuNPs por espectroscopía UV-Vis

En la figura 13 se omite el criterio de presencia de AgNPs de 200-300 nm debido a que longitudes de las nanopartículas absorben la luz visible de 300-700

nm y, según el espectro de absorbancia los picos más altos de la gráfica muestran la mayor cantidad de ondas de color que absorben, por lo tanto, se confirma la presencia de AgNPs con todos los extractos debido a que existe un pico de absorbancia de 350 a 500 nm, para el caso de las AgNPs sintetizadas con el extracto de cáscara de toronja el comportamiento de la curva se debe probablemente a su morfología y el color de la solución (café-negro). Para las AgNPs sintetizadas con el extracto de cáscara de limón a pesar de que el pico es bajo está en la región de las AgNPs por lo cual se confirma la presencia de plata.

Para las CuNPs no se observó un pico de absorbancia por lo cual esto de primera instancia podría significar que no se sintetizó cobre elemental, pero para verificar si es algún tipo de óxido de cobre, cobre u otro material se realizarán otras técnicas de caracterización, por el momento no se descarta por completo la presencia de cobre.

Para las Caolín-AgNPs y Caolín-CuNPs no se observó un pico de absorbancia esto se puede deber a diversos factores, el primero es debido a la cantidad de caolín presente en la síntesis, debido a que el caolín se presenta en mayor cantidad que las nanopartículas metálicas este podría enmascarar a las nanopartículas. Otro caso es que las nanopartículas de plata y cobre no se depositaran en el caolín y en los lavados que se realizan se eliminaran junto con el material orgánico residual.

4.6 Caracterización de nanopartículas por difracción de rayos X

Para el estudio de difracción de rayos X (XRD) se utilizó el difractómetro de rayos X PANalytical X'Pert Pro el cual está equipado con una fuente Cu-Kα; para el análisis de las muestras se realizó por medio de polvos de las nanopartículas sintetizadas.

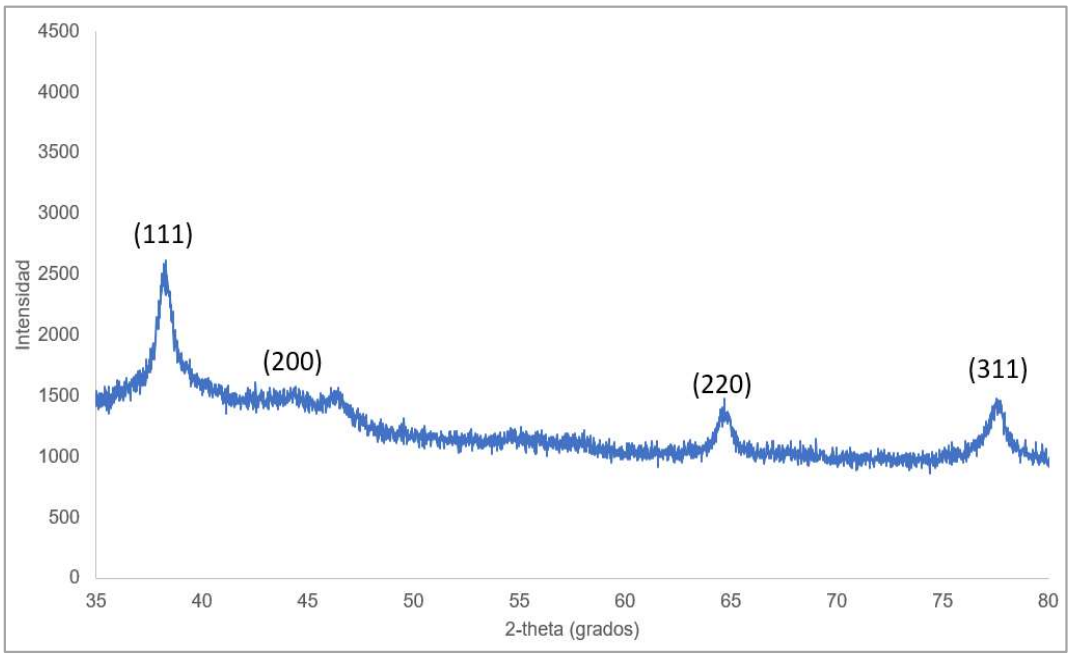

Figura 17. Patrones de difracción de rayos X de AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja)

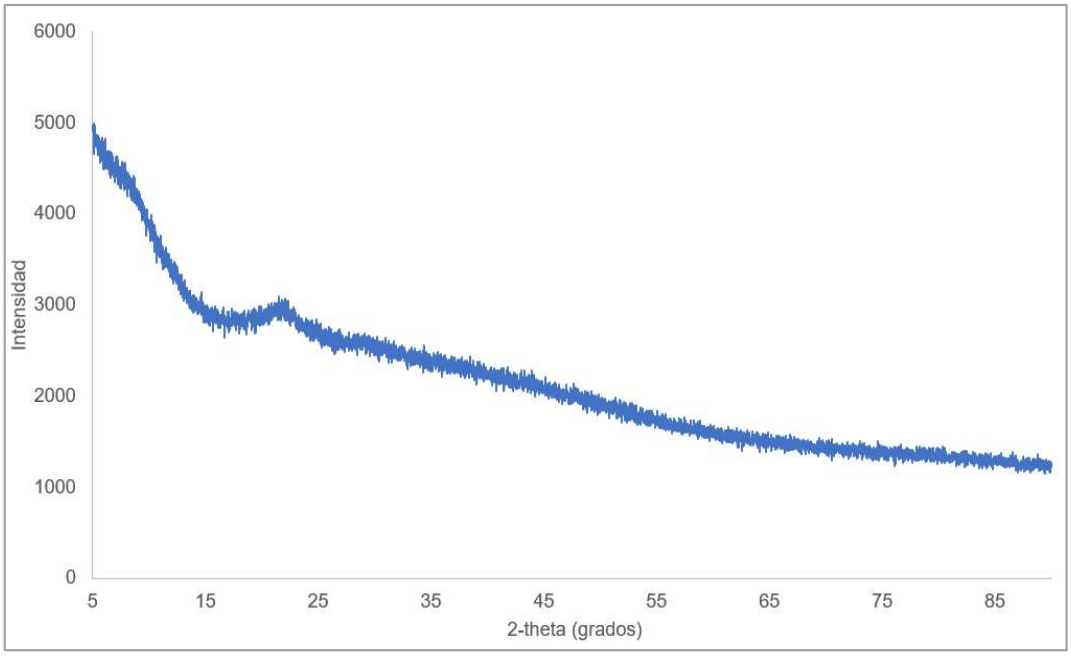

Figura 18. Patrones de difracción de rayos X de CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja)

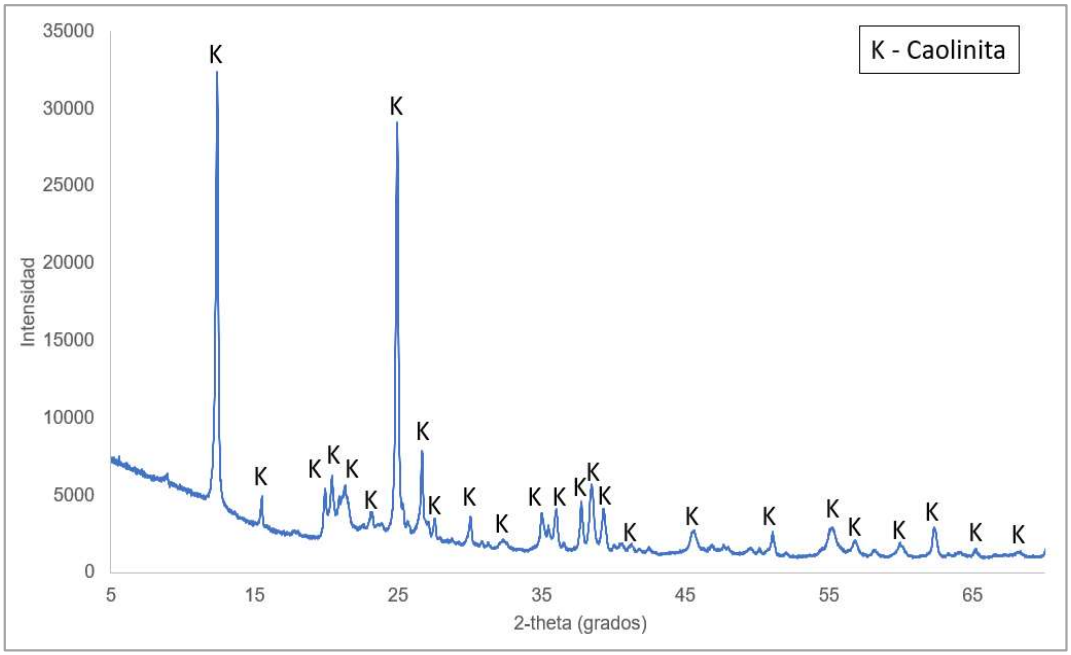

Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de Caolín-AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja)

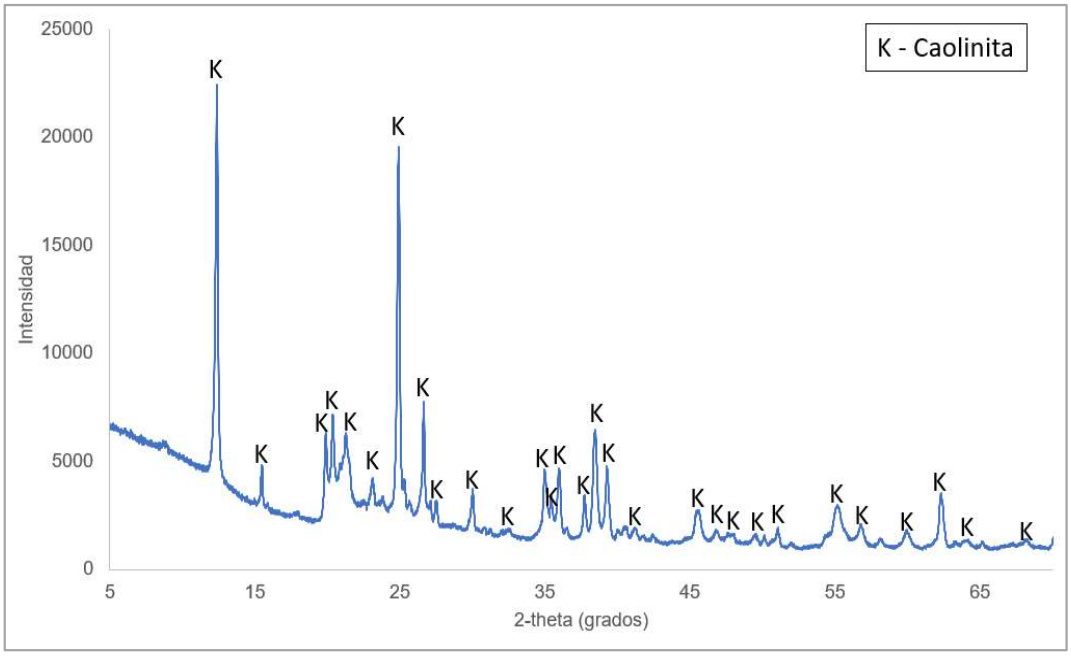

Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de Caolín-CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja)

El patrón XRD de las AgNPs se representan en la figura 17. Los picos 38.2, 44.44, 64.66 y 77.55 corresponden a (111), (200), (220) y (311) planos cristalinos de la estructura cúbica centrada en las caras de plata metálica. Los picos anchos de las AgNPs son un indicio que estas nanopartículas tienen un tamaño muy pequeño.

El patrón de las CuNPs está representado en la figura 18. No se mostraron picos coincidentes con los planos cristalinos del cobre metálico, el patrón coincide con una morfología amorfa la cual se puede deber a la presencia de material orgánico y también a que posiblemente las nanopartículas son muy pequeñas.

Para las AgNPs y CuNPs dispersas en caolín el patrón de XRD no detectó ninguno de los dos metales debido a que el caolín se encuentra en mayor proporción a las nanopartículas.

4.7 Caracterización de nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión

Se utilizó el microscopio FEI-TITAN con las muestras de AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y Caolín-CuNps, todas las muestras fueron sintetizadas con la combinación de los extractos limón, naranja y toronja; primeramente, las muestras se molieron en un mortero para homogeneizar el tamaño del polvo y posterior a esto se realizó una dilución del polvo en isopropanol. Una vez, dispersas en isopropanol se llevaron a un baño de ultrasonido durante 30 min para dispersarlas completamente. Una vez dispersas se colocaron las muestras de AgNPs y Caolín-AgNPs sobre una malla lacey la cual está fabricada en carbón y cobre, para las CuNPs y Caolín-CuNps se utilizó una malla lacey de carbón y oro para evitar que interfiera el cobre de la malla con las nanopartículas de cobre.

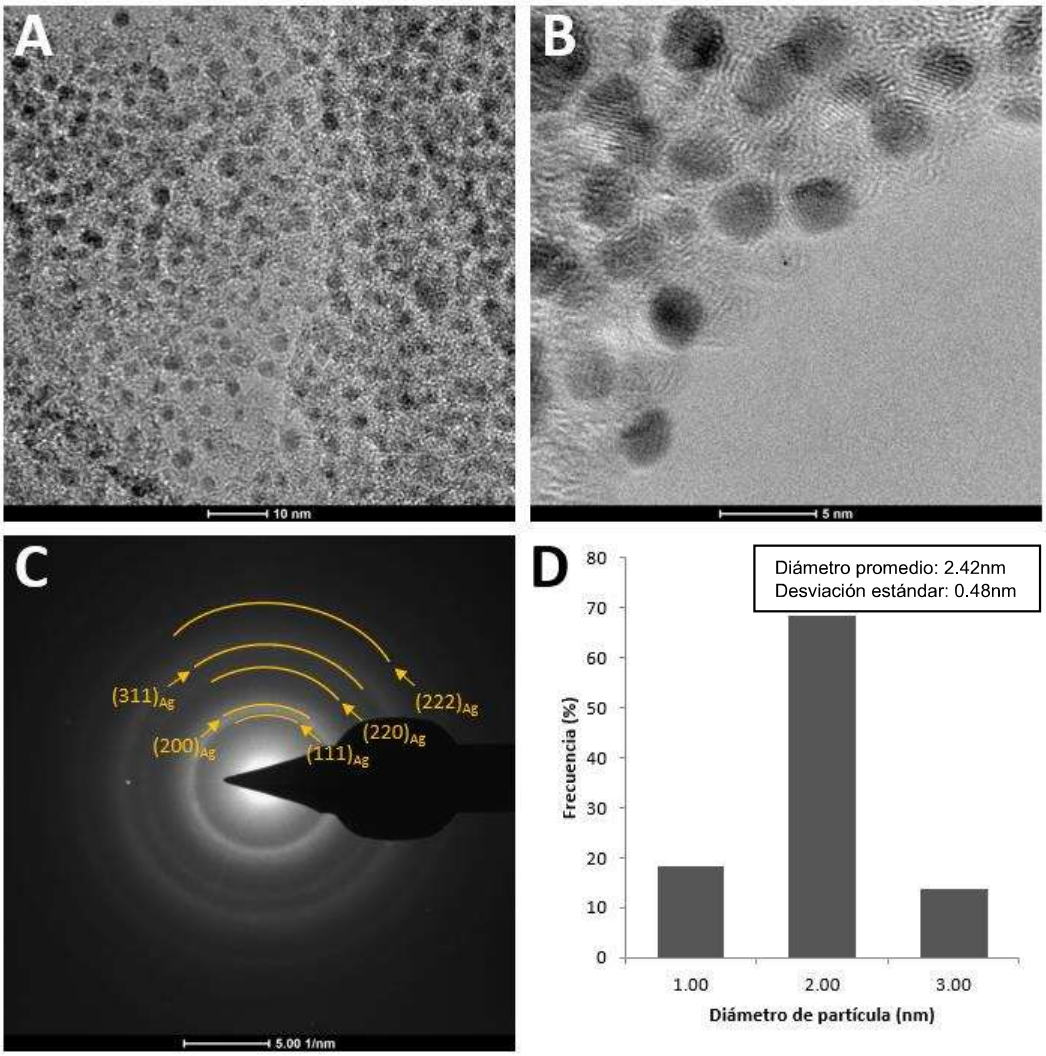

Figura 20. (A) Micrografía TEM de baja resolución de las AgNPs. (B) Micrografía TEM de alta resolución de las AgNPs. (C) Patrón SAED de las AgNPs con los anillos marcados. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las AgNPs.

Como se puede observar en las micrografías TEM y HRTEM (figura 20A y 20B), las AgNPs muestran formas cuasi esféricas y el material orgánico residual de la síntesis. El patrón SAED (figura 20C) de AgNPs mostró anillos que pueden atribuirse a los planos (111), (200), (220), (311) y (222) de la plata metálica cúbica centrada en la cara. Las AgNPs exhiben una distribución de tamaño de diámetro que varía de 1 a 4 nm con una media de 2.42 nm y una desviación estándar de

0.48 nm (figura 20D). El histograma de la figura 20D muestra que la mayoría de las AgNPs tienen un diámetro de entre 2 y 3 nm, lo que corresponde a una distribución normal homogénea.

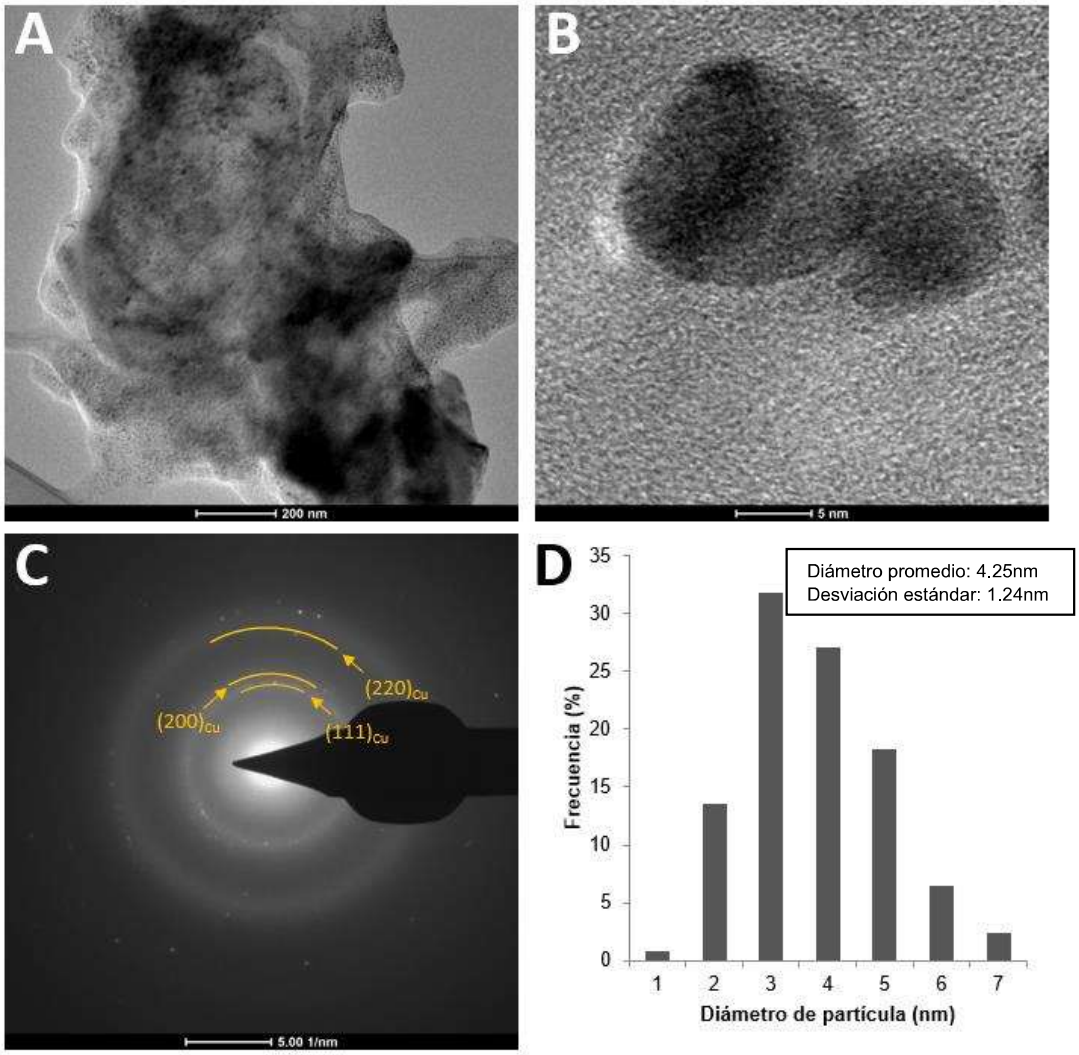

Figura 21. (A) Micrografía TEM de baja resolución de las CuNPs. (B) Micrografía TEM de alta resolución de las CuNPs. (C) Patrón SAED de las CuNPs con los anillos marcados. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las CuNPs

Como se puede observar en las micrografías HRTEM (figura 21B), las CuNPs muestran una forma cuasi esférica y en la figura 21A se puede observar la gran cantidad de material orgánico residual de la síntesis, este material

orgánico interfería en el patrón de difracción de rayos X de la figura 18. El patrón SAED (figura 21C) de CuNPs mostró anillos que pueden atribuirse a los planos (111), (200) y (220) del cobre metálico cúbico centrado en la cara. Las CuNPs exhiben una distribución de tamaño de diámetro que varía de 1 a 7 nm con una media de 4.25 nm y una desviación estándar de 1.24 nm (figura 21D). El histograma de la figura 21D muestra que la mayoría de las AgNPs tienen un diámetro de entre 2 y 5 nm, lo que corresponde a una distribución sesgada a la derecha.

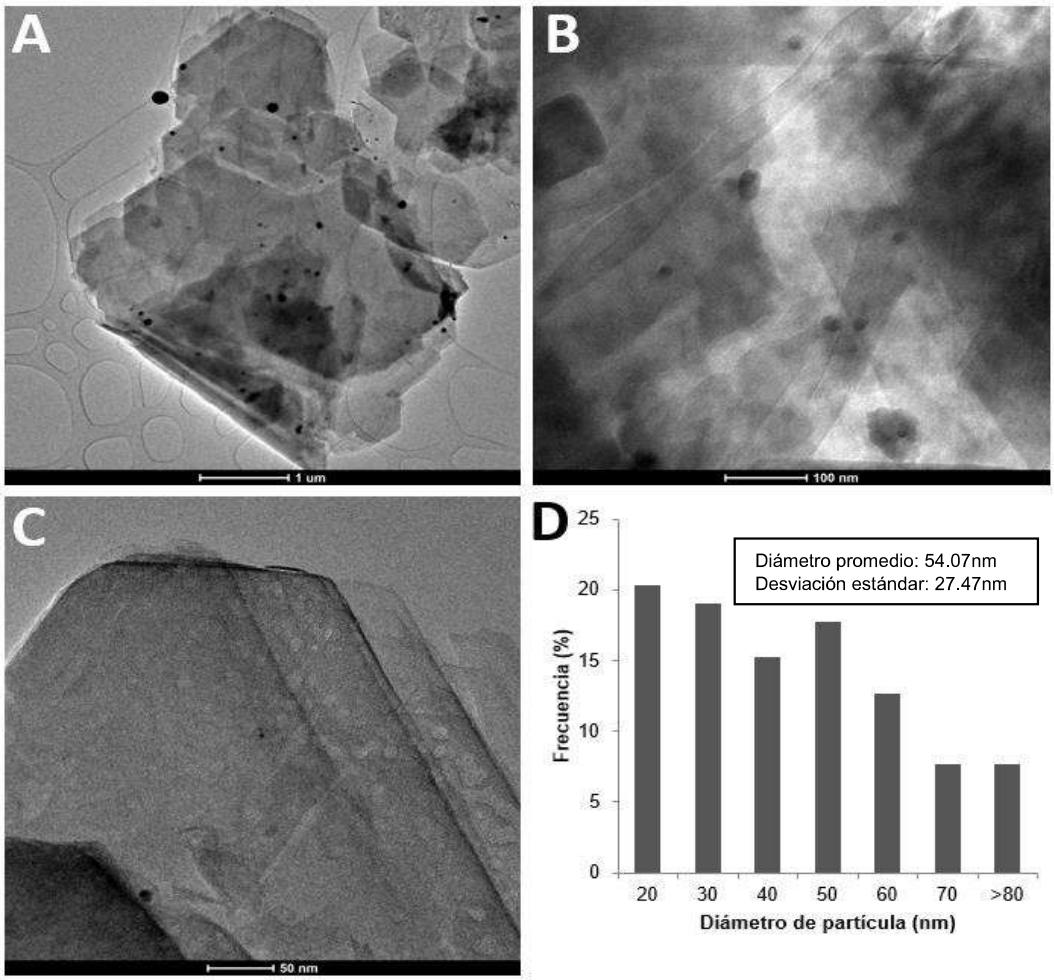

Figura 22. (A) (B) (C) Micrografía TEM de baja resolución de las Caolín-AgNPs. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las Caolín-AgNPs

Como se puede observar en las micrografías TEM (figura 22A, B y C), las Caolín-AgNPs muestran una forma cuasi esférica y también se puede observar el gran tamaño de la molécula de caolín, el cual es poco beneficioso en la dispersión de las AgNPs y posteriormente el gran tamaño del caolín disminuirá la efectividad antimicrobiana. Las AgNPs dispersas en caolín aumentaron considerablemente su tamaño exhibiendo una distribución de tamaño de diámetro que varía de 20 a 120 nm con una media de 54.07 nm y una desviación estándar de 27.47 nm (figura 22D). El histograma de la figura 21D muestra que la mayoría de las AgNPs tienen un diámetro de entre 2 y 5 nm, lo que corresponde a una distribución bimodal y sesgada a la derecha.

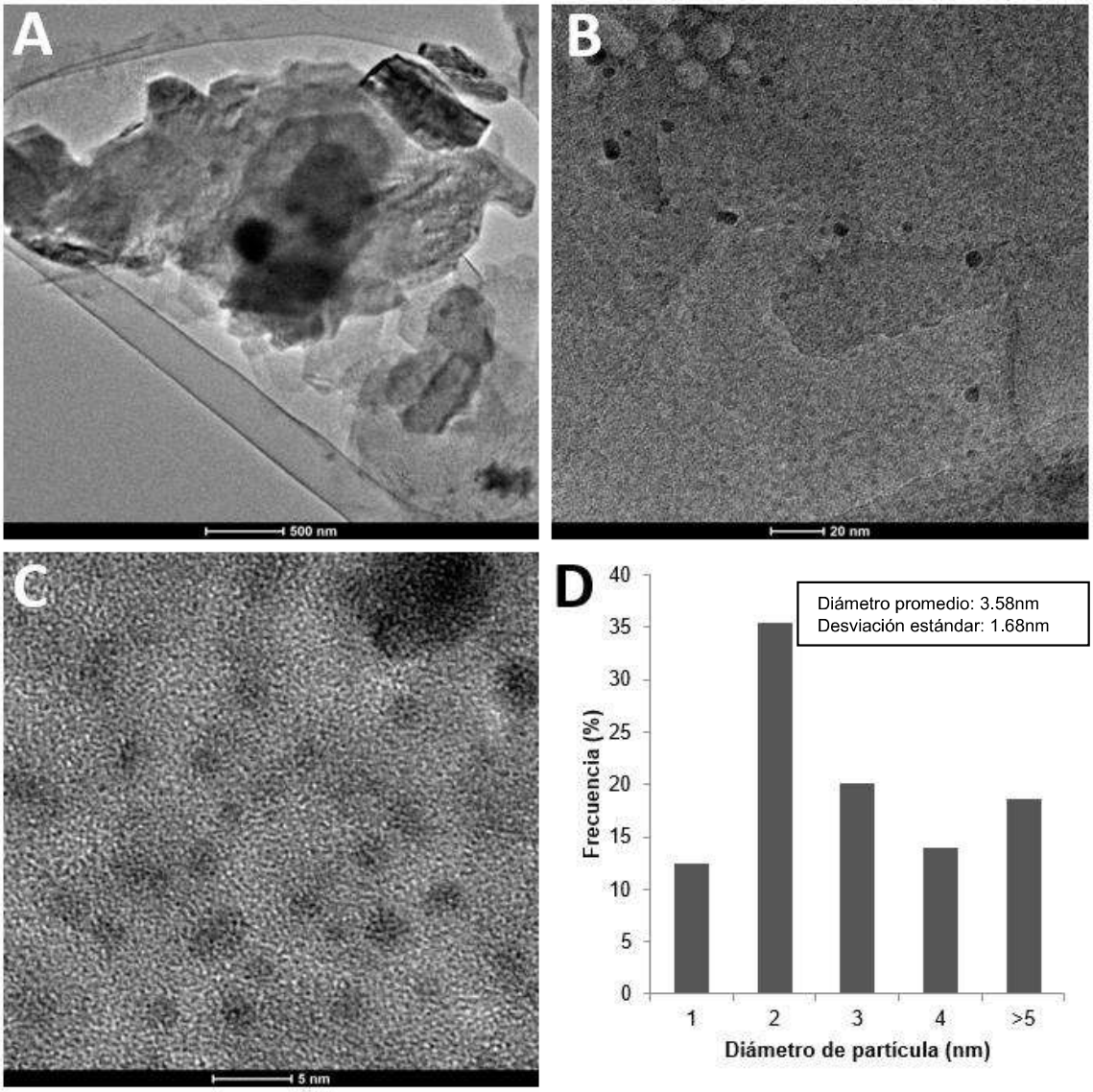

Figura 23. (A) (B) (C) Micrografía TEM de baja resolución de las Caolín-AgNPs. (D) Histograma de la distribución de tamaño de las Caolín-AgNPs

Como se puede observar en las micrografías TEM (figura 23A, B y C), las Caolín-CuNPs muestran una forma cuasi esférica y también se puede observar unas cuantas CuNPs dispersas pero el tamaño de caolín es poco beneficioso para la efectividad antimicrobiana. Las CuNPs dispersas en caolín mantuvieron parcialmente su tamaño, estas exhiben una distribución de tamaño de diámetro que varía de 1 a 8 nm con una media de 3.58 nm y una desviación estándar de

1.68 nm (figura 22D). El histograma de la figura 21D muestra que la mayoría de las AgNPs tienen un diámetro de entre 2 y 3 nm, lo que corresponde a una distribución bimodal.

4.8 Caracterización de nanopartículas por espectroscopía de rayos X por energía dispersiva

Para realizar el análisis elemental de las nanopartículas sintetizadas por medio de espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS) se utilizó un dispositivo adicional equipado en el microscopio FEI-TITAN; se utilizaron las mismas muestras utilizadas en el apartado 4.7.

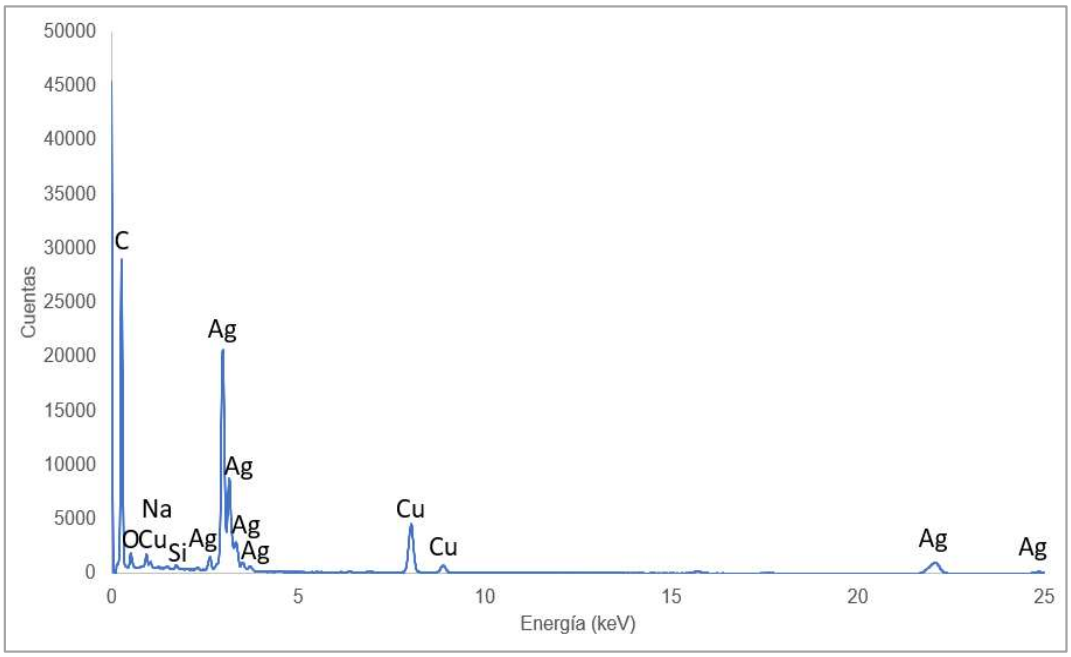

Figura 24. Espectro EDS de las AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados

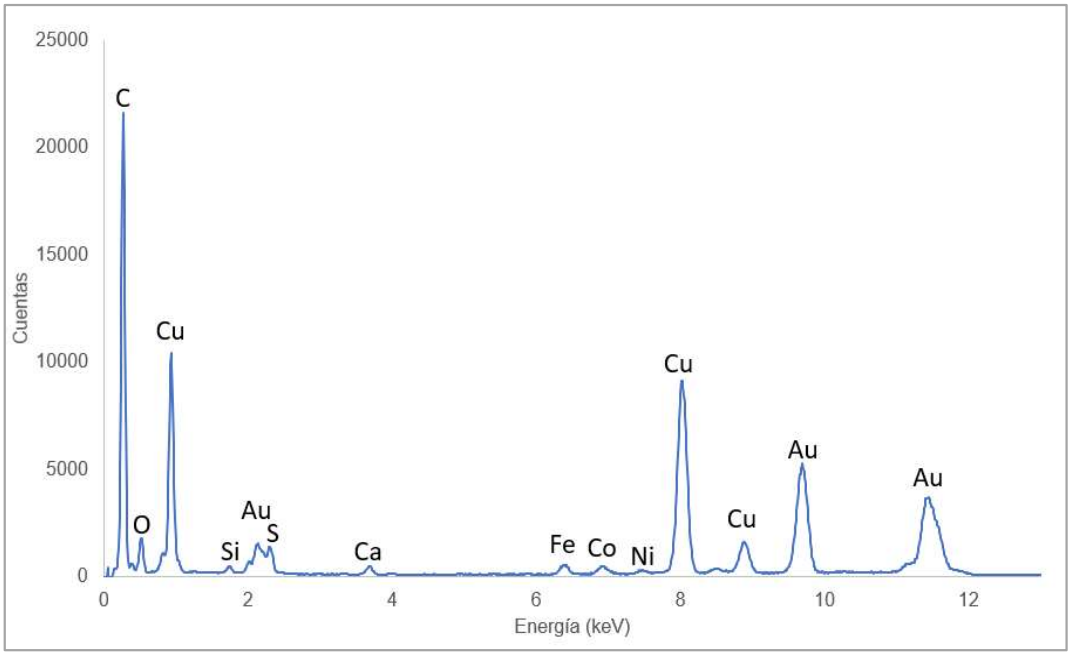

Figura 25. Espectro EDS de las CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados

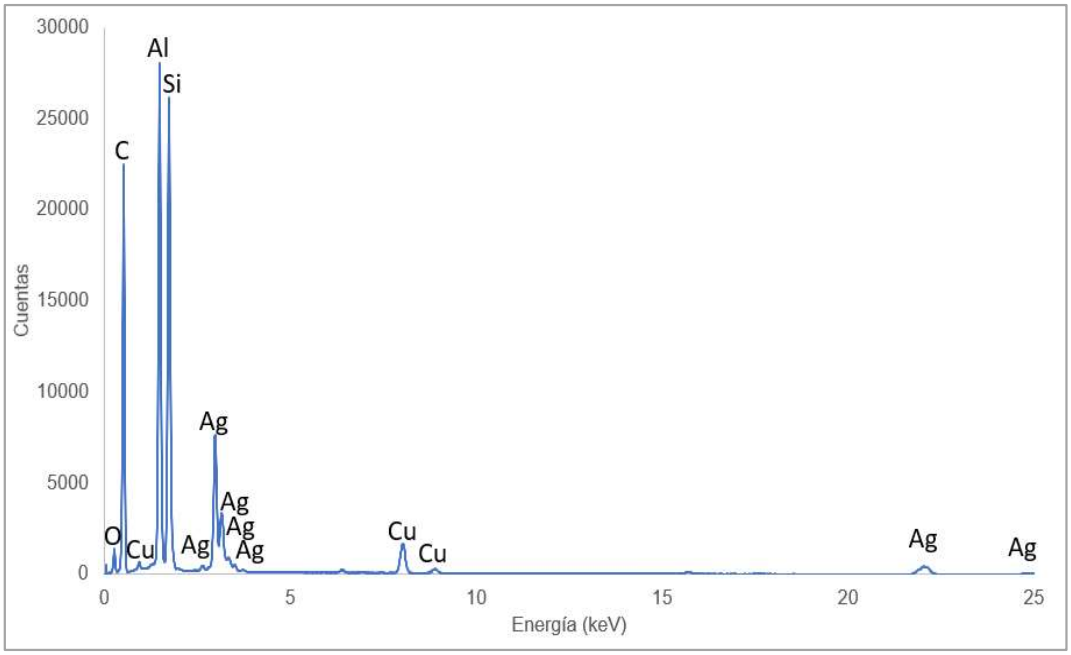

Figura 26. Espectro EDS de las Caolín-AgNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados

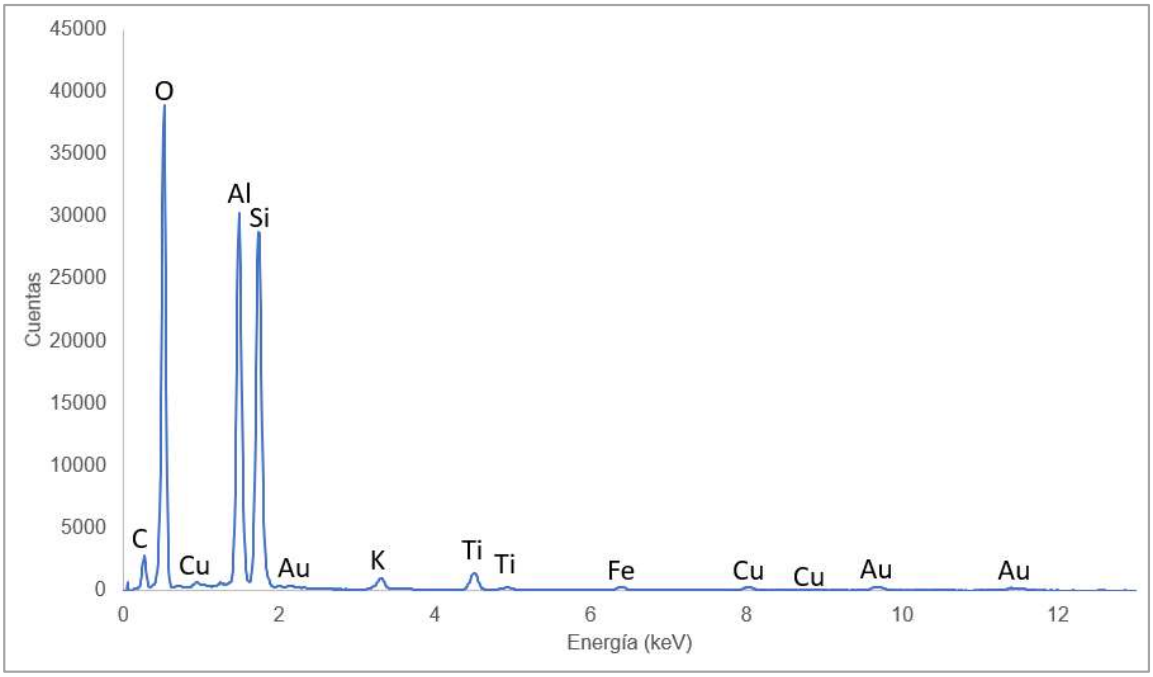

Figura 27. Espectro EDS de las Caolín-CuNPs sintetizadas con la combinación de extractos (limón, naranja y toronja) con los picos etiquetados

Esta caracterización adicional de las nanopartículas por análisis EDS muestra en la figura 24 la presencia de Ag, lo que confirma la presencia de AgNPs. En el análisis EDS se detectaron otros elementos como C y Cu, donde C corresponde a la matriz orgánica y carbono lacey de la malla TEM y se observa Cu ya que la malla utilizada para el análisis TEM está conformada por Cu. Además, se detectaron elementos como Si, O y Na, los cuales corresponden al material orgánico residual de la síntesis de las nanopartículas.

En la figura 25 se muestra el análisis EDS para las CuNPs, en el cual se detecta la presencia de Cu, lo que confirma la presencia de CuNPs. Se detectaron otros elementos como lo son O, Si, S, Ca, Ni, Co y Fe los cuales algunos corresponden al material orgánico de la síntesis y otros quizás a la

impureza del nitrato de cobre que se utilizó. Los elementos como C y Au corresponden a la malla utilizada para el análisis TEM.

Las AgNPs dispersas en caolín se confirmaron por medio del análisis elemental EDS (figura 26) ya que se existen picos de Ag. Los elementos de Al y Si corresponden al caolín ya que es un aluminosilicato, los demás elementos C y Cu se deben a la malla utilizada y los elementos restantes provienen de la síntesis.

Para las CuNPs dispersas en caolín se confirman ya que se detectaron picos ligeros de Cu (figura 27), estos picos son tan ligeros como las trazas de los demás elementos (K, Ti, Fe, Au) se debe a que estas CuNPs tienen un tamaño tan pequeño (figura 23) y se difunden en el caolín. El Al y Si se deben al caolín, el Au y C a la malla utilizada y el O se debe al material orgánico residual.

4.9 Actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas

Se realizó la evaluación de las propiedades antimicrobianas de las AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y las Caolín-CuNPs sintetizadas frente a *S. aureus* resistente a Kanamicina, clorafenicol, ciprofloxacina y a la ampicilina. La determinación del efecto antimicrobiano se llevó a cabo mediante el método de microdilución en caldo descrita en el punto 3.20 y posteriormente midiendo su cinética de crecimiento por 22 horas para calcular las concentraciones mínimas inhibitorias y las concentraciones mínimas bactericidas.

4.9.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las figuras 28 a 43 muestran el crecimiento de a *S. aureus* resistente (SaR) junto con los tratamientos de AgNPs, CuNPs, Caolín-AgNPs y las Caolín-CuNPs, la curva de crecimiento se realizó midiendo la densidad óptica a 600nm cada hora, durante un total de 22 horas a una temperatura de 37°C sin agitación.

Para la medición de la concentración mínima inhibitoria se realizaron todos los experimentos por triplicado y para medir la desviación estándar de los datos se realizó por medio del error estándar.

4.9.1.1 AgNps vs SaR

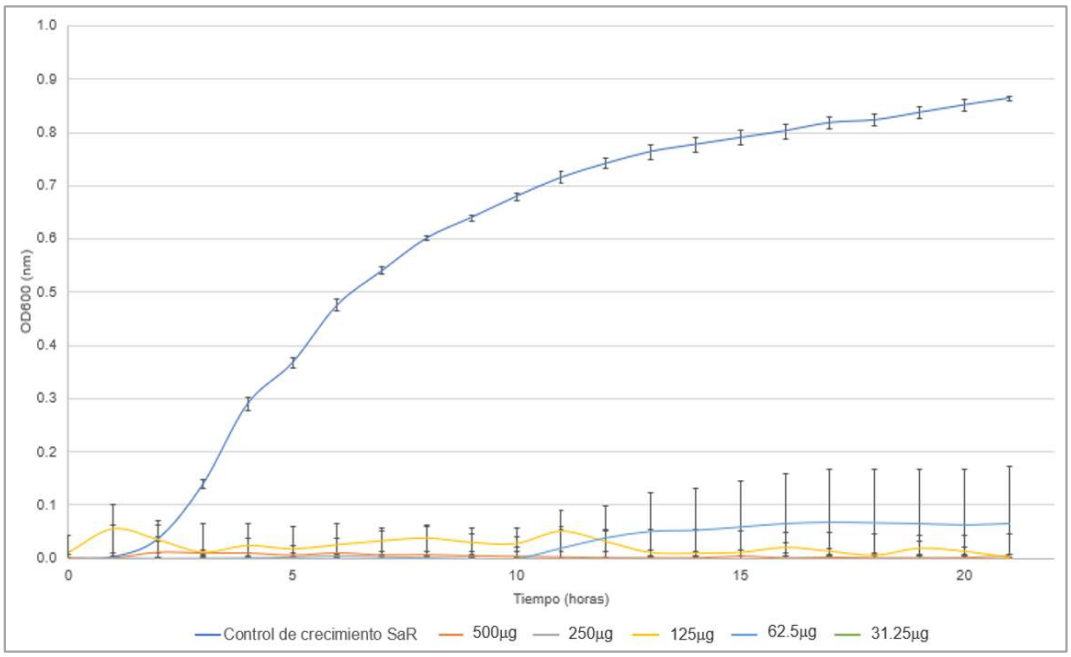

Figura 28. Actividad antimicrobiana de AgNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos

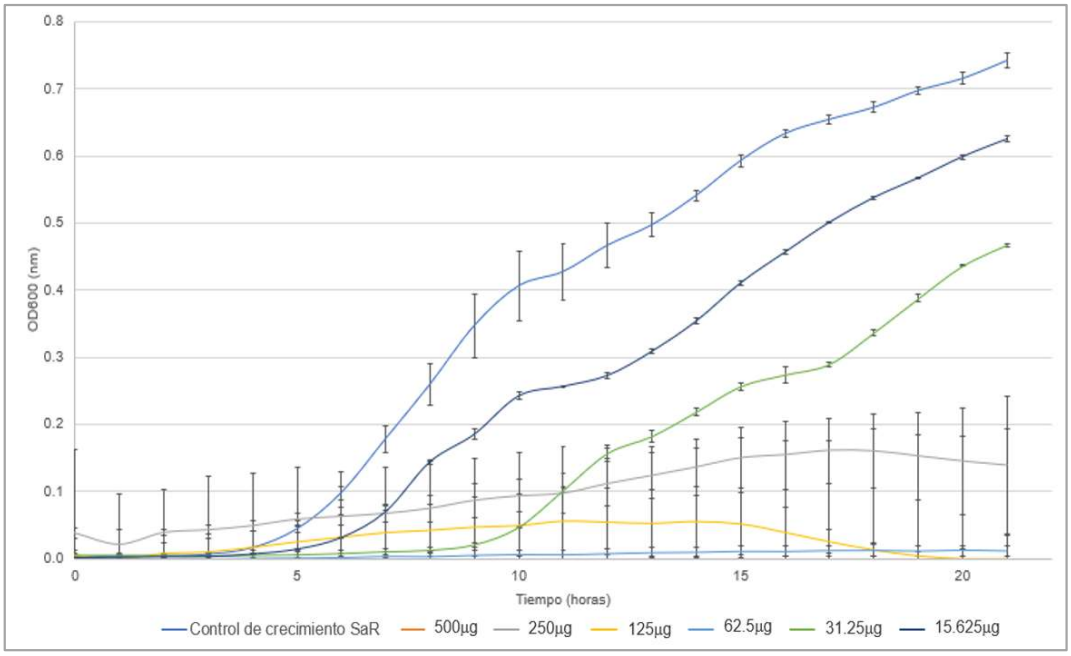

Figura 29. Actividad antimicrobiana de AgNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos

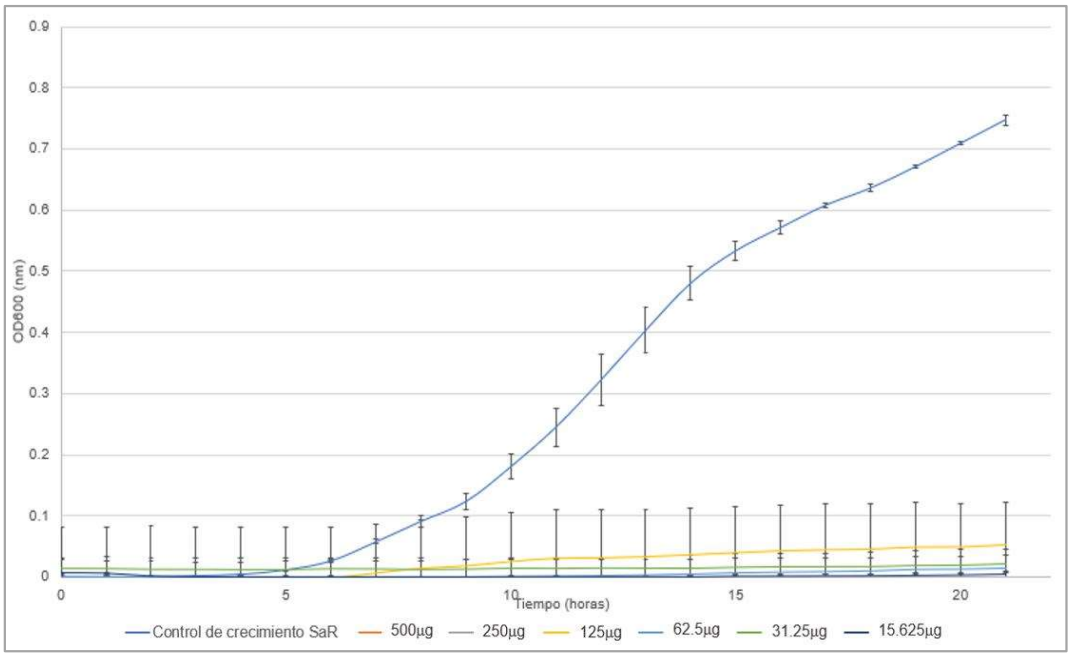

Figura 30. Actividad antimicrobiana de AgNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos

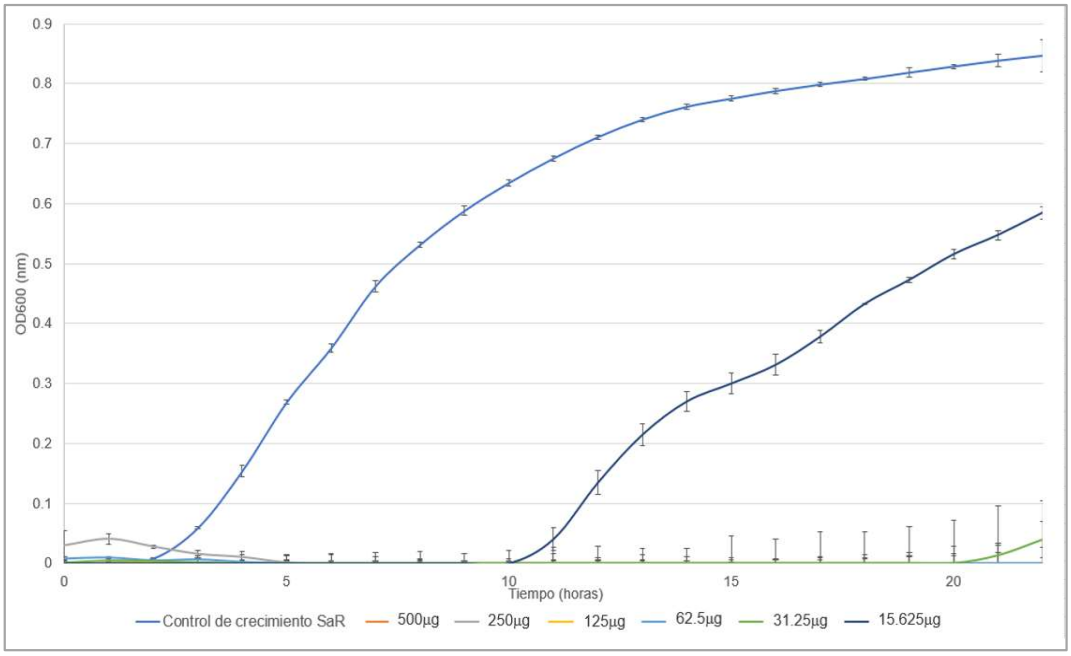

Figura 31. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos

En las figuras 28-31 se puede apreciar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de distintas concentraciones establecidas de AgNPs. La figura 28 muestra que las AgNPs sintetizadas con extracto de cáscara de limón tuvieron un efecto inhibitorio en todas sus concentraciones por lo cual el efecto inhibitorio de SAR se encuentra en 15.625µg/µL de AgNPs. Para la figura 29 el efecto inhibitorio de SAR se encuentra entre 15.625-31.2µg/mL de AgNPs sintetizadas con extracto de cáscara naranja. En la figura 30 las AgNPs sintetizadas con extracto de toronja el efecto inhibitorio de SAR se encuentra en 15.625µg/µL de AgNPs. Por el contrario, las AgNPs sintetizadas con extracto de cáscara de limón, naranja y toronja (figura 31) su efecto inhibitorio contra SAR se encuentra en concentraciones arriba de 15.625µg/mL

4.9.1.2 CuNPs vs SaR

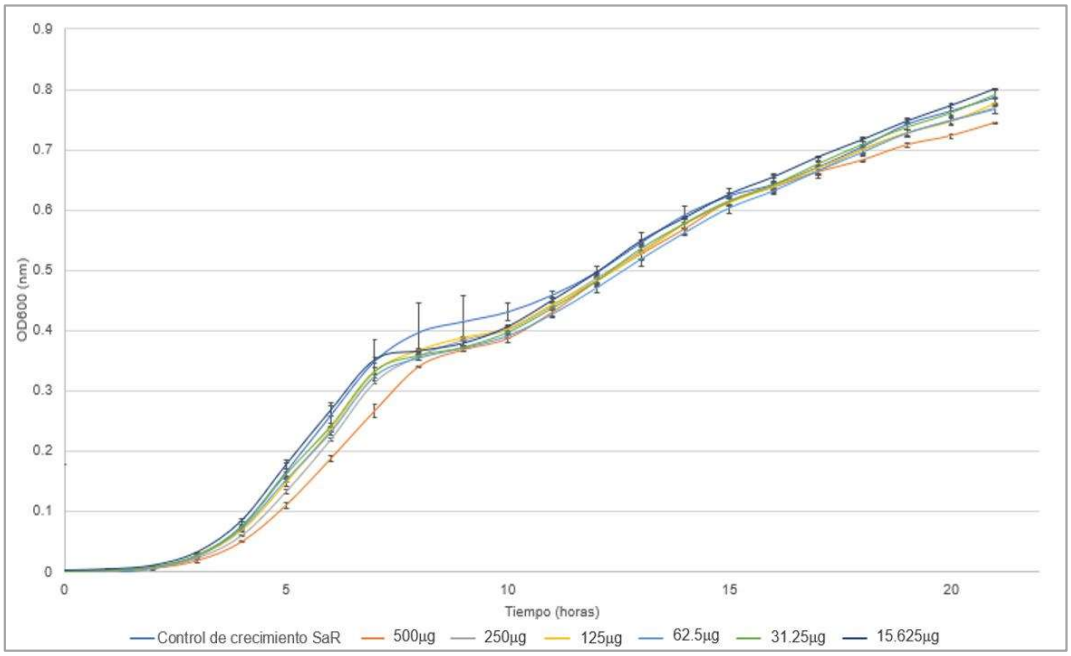

Figura 32. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos

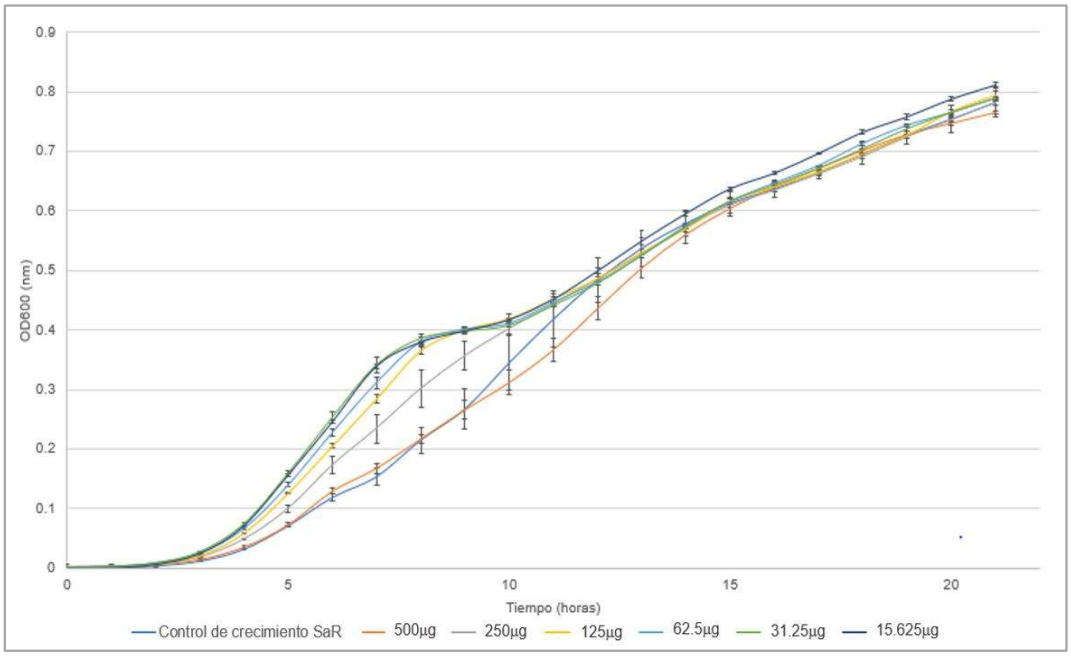

Figura 33. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos

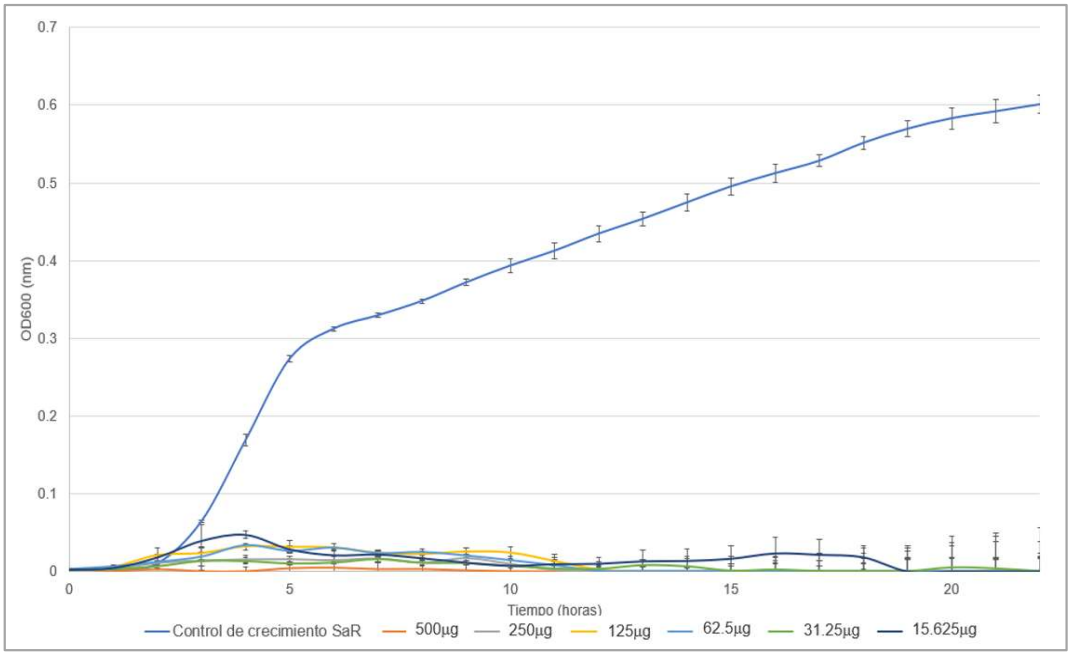

Figura 34. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos

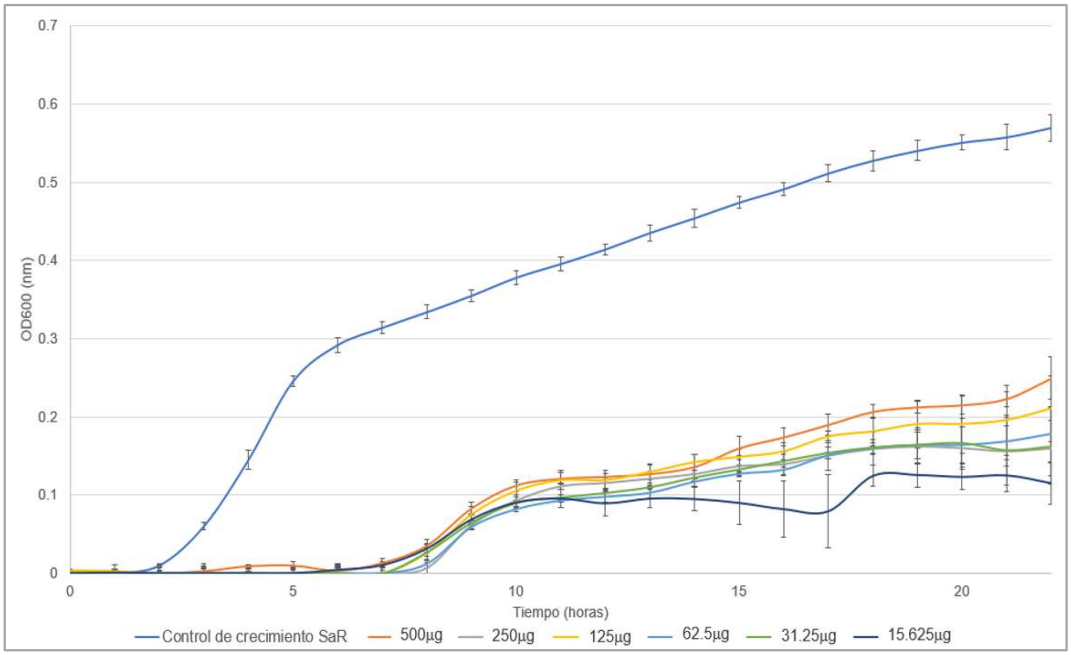

Figura 35. Actividad antimicrobiana de CuNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos

En las figuras 32-35 se puede apreciar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de distintas concentraciones establecidas de CuNPs.

Las figuras 32 y 33 se puede observar que las CuNPs sintetizadas con extracto de cáscara de limón y cáscara de naranja no tuvieron ningún efecto inhibitorio contra SAR en ninguna de sus concentraciones. Para la figura 34 las CuNPs tuvieron un efecto inhibitorio de SAR en todas sus concentraciones por lo cual, la CMI se encuentra en 15.625μg/mL de CuNPs sintetizadas con extracto de cáscara de toronja. En la figura 35 las CuNPs sintetizadas con extracto de toronja el efecto inhibitorio de SAR se encuentra en 15.625μg/mL. Por el contrario, las CuNPs sintetizadas con extracto de cáscara de limón, naranja y toronja no tuvieron un efecto inhibitorio contra SAR, si no un efecto bacteriostático en todas sus concentraciones.

4.9.1.3 Caolín-AgNPs vs SaR

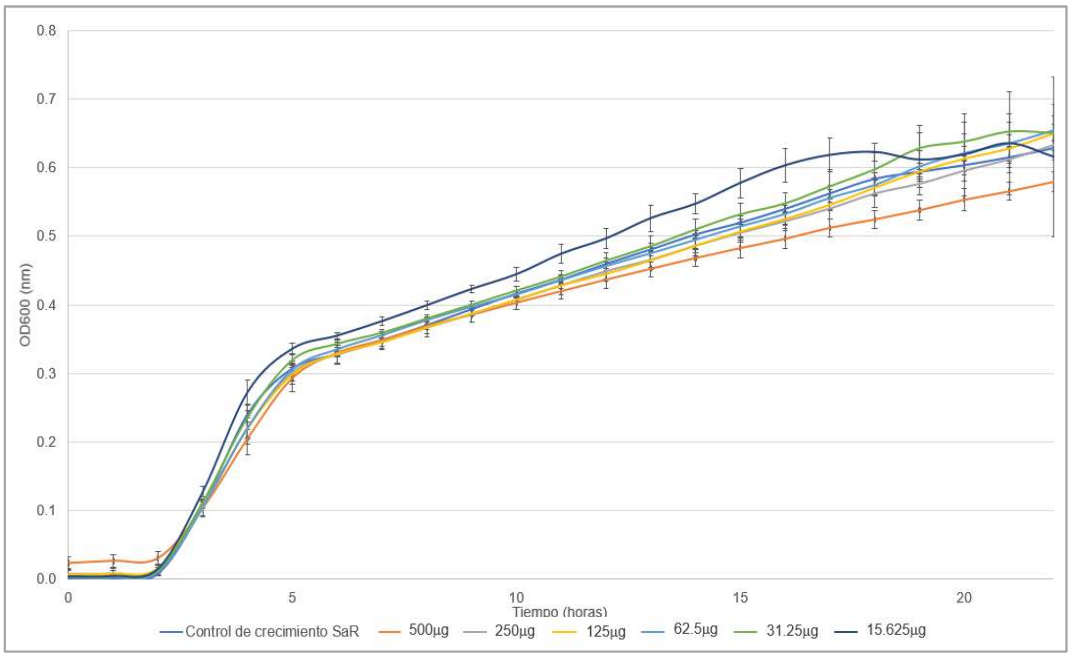

Figura 36. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos

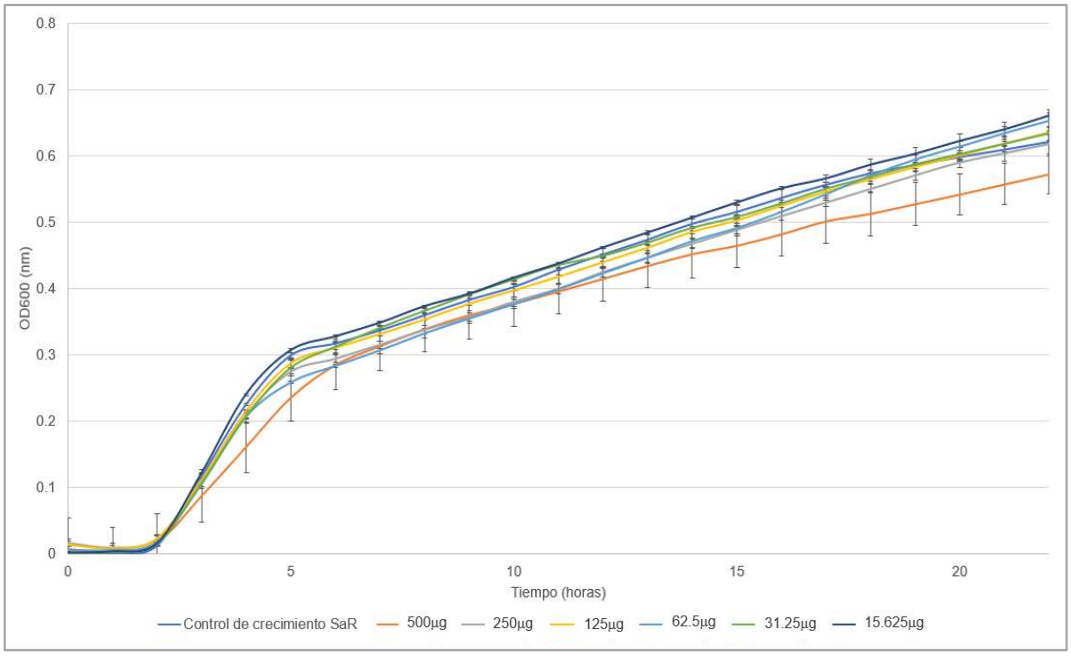

Figura 37. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos

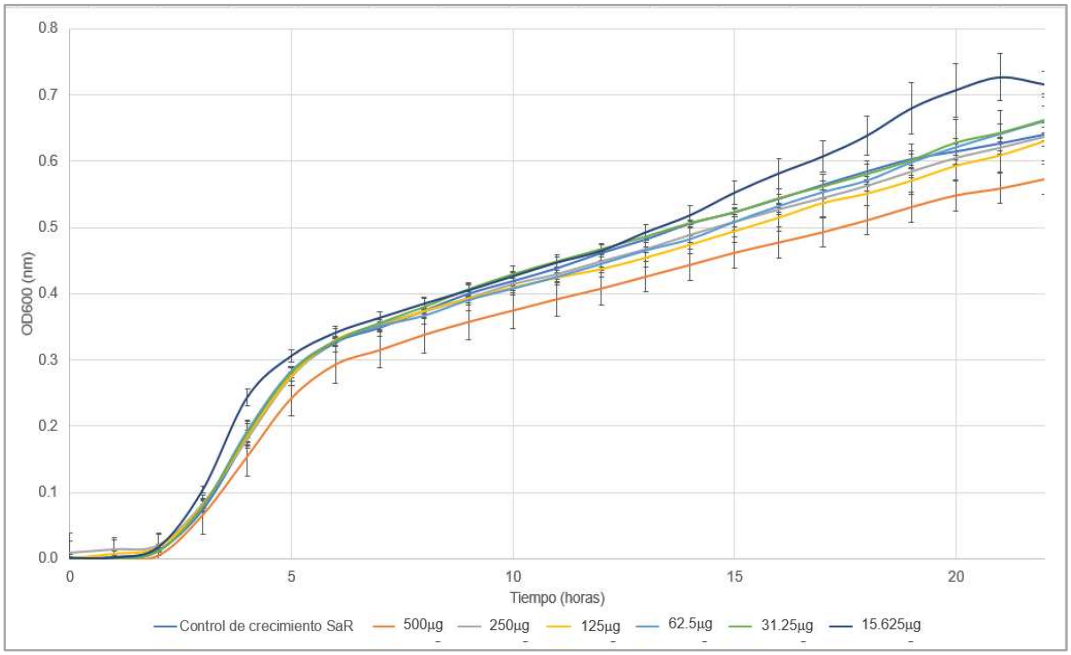

Figura 38. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos

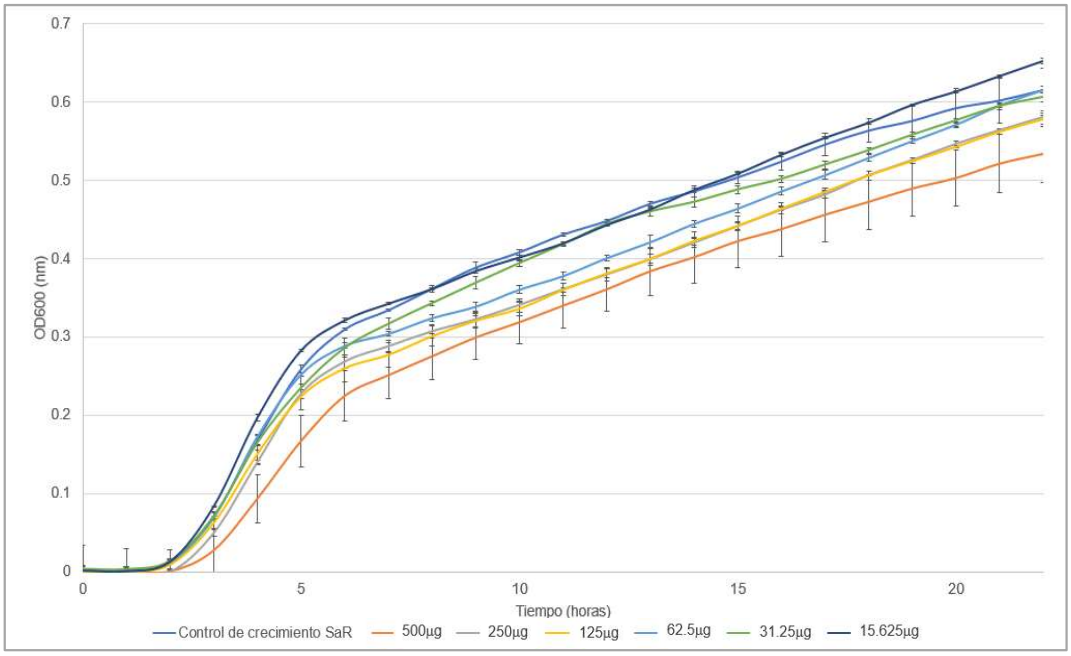

Figura 39. Actividad antimicrobiana de Caolín-AgNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos

En la figura 36-39 se puede apreciar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de distintas concentraciones establecidas de Caolín-AgNPs. En las figuras 36-39 se puede observar que las Caolín-AgNPs sintetizadas con los extractos no tuvieron un efecto inhibitorio contra SAR.

4.9.1.4 Caolín-CuNPs vs SaR

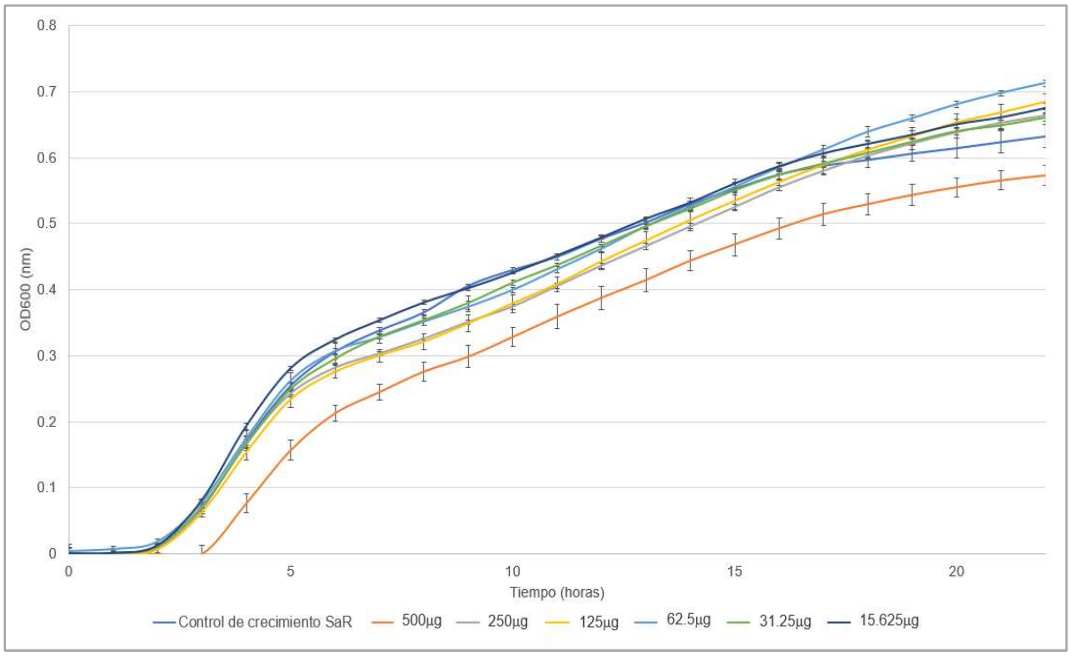

Figura 40. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de limón en diferentes tiempos

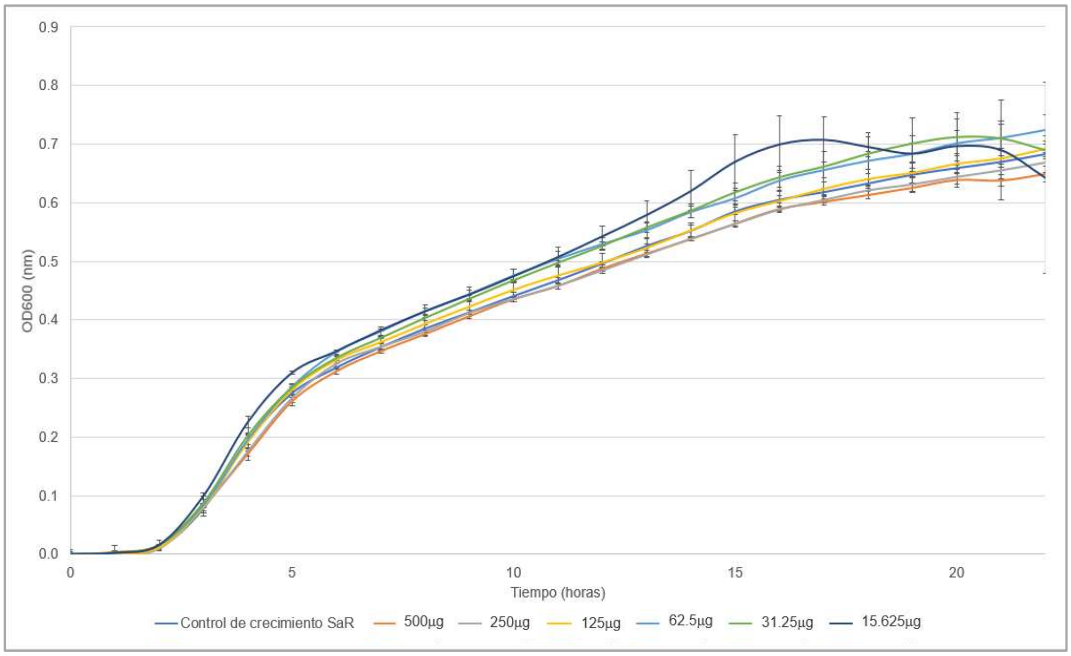

Figura 41. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de naranja en diferentes tiempos

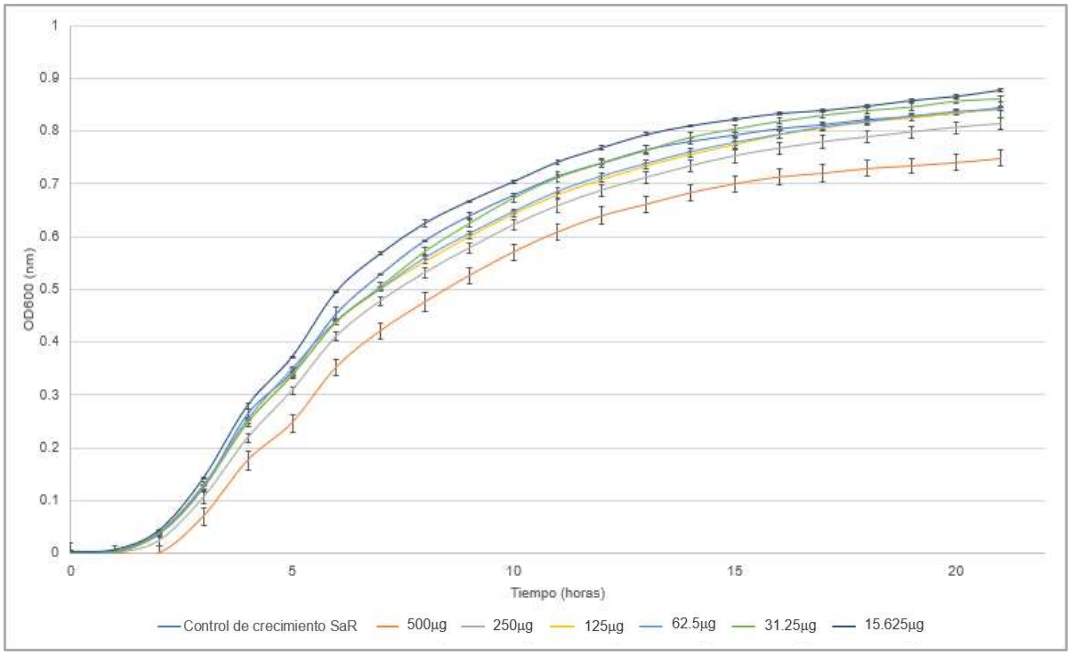

Figura 42. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de toronja en diferentes tiempos

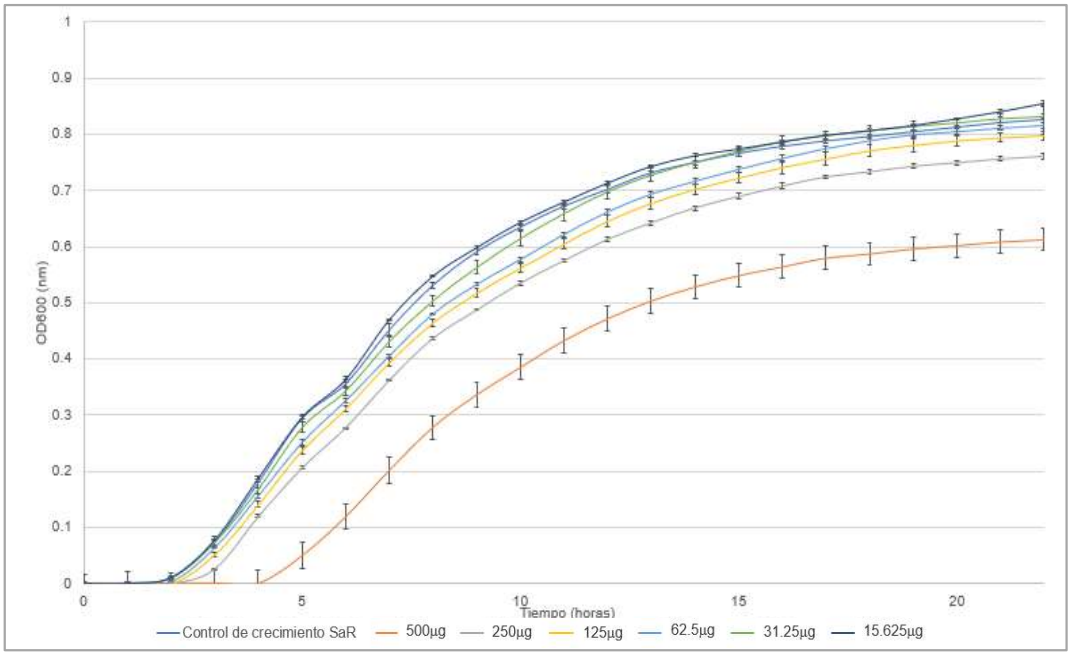

Figura 43. Actividad antimicrobiana de Caolín-CuNPs a partir de extracto de limón, naranja y toronja en diferentes tiempos

En la figura 40-43 se puede apreciar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de distintas concentraciones establecidas de Caolín-CuNPs. En las

figuras 40-42 se puede observar que las Caolín-AgNPs sintetizadas con los extractos no tuvieron un efecto inhibitorio contra SAR. Si embargo en la figura 43 se observa que las Caolín-CuNPs sintetizadas con extracto de limón, naranja y toronja tienen una reducción del 25% en el crecimiento de SaR y la fase lag de crecimiento pasó de 2 a 4 horas, por lo cual esto significa un punto de partida para futuros experimentos.

Se determinó que la mayoría de las nanopartículas sintetizadas y dispersas en caolín (figura 36-42) no tuvieron ningún efecto inhibitorio ni un efecto bacteriostático. Esto debido al tamaño de la partícula de caolín (figura 22-23), ya que las bacterias cuentan con una bomba de flujo para su alimentación y al no poder ingerir la partícula no se puede tener algún efecto en su crecimiento.

En comparación con Hariram et al., 2021 ellos realizaron la medición de la efectividad antimicrobiana de las AgNPs dispersas en caolín contra una cepa *Staphylococcus aureus* sin multiresistencia a medicamentos, además la medición la realizaron por zonas de inhibición; en comparación con este proyecto que se realizó con una cepa de *Staphylococcus aureus* multiresistente y la efectividad antimicrobiana se realizó por microdiluciones en placa, el cual es más fácil dar una dosis para combatir a esta bacteria.

5 Conclusiones

Utilizando extractos de residuos agro-industriales como lo son la cáscara de limón, naranja y toronja, se desarrollaron y probaron distintas vías la síntesis de nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre y para la dispersión de estas sobre el caolín, aplicando la ruta de síntesis más amigable para el medio ambiente y eficiente, comparado con los métodos químicos, que originan subproductos no deseados, requieren de energía y utilizan materia prima tóxica.

Por tal motivo, los métodos de síntesis finales para cada una de las nanopartículas resultan en un beneficio económico, menos perjudicial para el medio ambiente, en un solo paso para las AgNPs y CuNPs, y con resultados acertados tanto para la síntesis de nanopartículas de plata como de cobre.

La síntesis de las nanopartículas de plata, se comprobó con las técnicas de caracterización (UV-Vis, XRD, TEM, HRTEM, SAED, EDS). Estas pruebas demostraron la existencia de las nanopartículas en las síntesis obtenidas con picos anchos en un rango de 400 a 500 nm, estimados por estudios anteriores. Los análisis XRD, SAED y EDS confirmaron completamente que se trataba de nanopartículas de plata. Por medio de la microscopía TEM se observaron las AgNPS de forma cuasi esférica, teniendo un promedio de 2.42±0.48 nm para las nanopartículas sintetizadas.

La síntesis de las nanopartículas de cobre, se comprobó con las técnicas de caracterización anteriormente mencionadas. El análisis UV-Vis y XRD no reflejaron formación de CuNPs debido a que contenían gran cantidad de material

orgánico que impedía su medición. Las técnicas SAED y EDS confirmaron la presencia de cobre en estas nanopartículas. Por medio de la microscopía TEM se observó la morfología cuasi esférica, obteniendo un tamaño promedio de 4.25±1.24 nm.

También, se logró la dispersión de las nanopartículas de plata y cobre sobre caolín, las AgNPs se dispersas, aumentaron su tamaño considerablemente de 2.42±0.48 nm a 54.07±27.47 nm y las CuNPs disminuyeron ligeramente su tamaño 4.25±1.24 nm a 3.58±1.68 nm.

La medición de la actividad antimicrobiana de las AgNPs y CuNPs se evidenció con la disminución en el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* multirresistente. En contra parte de las AgNPs y CuNPs dispersas que no redujeron en nada el crecimiento de esta bacteria, por lo cual se comprueba que el tamaño principalmente del caolín juega un factor muy importante en la inhibición de la bacteria, ya que esta no hay una buena biodisponibilidad de las nanopartículas.

6 Recomendaciones

Las siguientes son recomendaciones servirán a futuras investigaciones en la misma línea de proyecto, ya que servirán para mejorar en el desarrollo de la metodología propuesta:

- Realizar la extracción de agentes estabilizadores y reductores con etanol y agua con el fin de extraer muchos más agentes reductores y comparar la morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas con esta investigación.
- Realizar la extracción de agentes estabilizadores y reductores combinando distintos tipos de residuos orgánicos.
- Realizar otra ruta de dispersión de nanopartículas para obtener un tamaño menor de caolín y mantener el tamaño de las nanopartículas.
- Realizar otra ruta mas verde para la síntesis de nanopartículas de cobre en la cual no requiera energía.
- Probar la actividad antimicrobiana a menores diluciones y probar su efectividad contra otras cepas de microorganismos multirresistentes.

7 Referencias

Abid, J. P.; Wark, A. W.; Brevet, P. F.; Girault, H. H. Preparation of Silver Nanoparticles in Solution from a Silver Salt by Laser Irradiation. Chem. Commun. 2002, 7, 792–793. https://doi.org/10.1039/b200272h.

Agusti, M., MARTÍNEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., MARIANO, J., & ALMELA, V. (2003). Cuajado y Desarrollo de los Frutos Cítricos-Instituto Agroforestal Mediterráneo-Universidad Politécnica de Valencia. Serie divulgación técnica.

Alarcon, E. I.; Udekwu, K.; Skog, M.; Pacioni, N. L.; Stamplecoskie, K. G.; González-Béjar, M.; Polisetti, N.; Wickham, A.; Richter-Dahlfors, A.; Griffith, M.; Scaiano, J. C. The Biocompatibility and Antibacterial Properties of Collagen-Stabilized, Photochemically Prepared Silver Nanoparticles. Biomaterials 2012, 33 (19), 4947–4956. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.033.

Al-Ashaal, H. A., & El-Sheltawy, S. T. (2011). Antioxidant capacity of hesperidin from Citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. Pharmaceutical Biology, 49(3), 276–282. https://doi.org/10.3109/13880209.2010.509734

Al-Haddad, J., Alzaabi, F., Pal, P., Rambabu, K., & Banat, F. (2020). Green synthesis of bimetallic copper–silver nanoparticles and their application in catalytic and antibacterial activities. Clean Technologies and Environmental Policy, 22(1), 269–277. https://doi.org/10.1007/s10098-019-01765-2

Alzahrani, E. (2015). Eco-Friendly Production of Silver Nanoparticles from Peel of Tangerine for Degradation of Dye. World Journal of Nano Science and Engineering, 05(01), 10–16. https://doi.org/10.4236/wjnse.2015.51002

Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Kokkalou, E., Assimopoulou, A. N., & Papageorgiou, V. P. (2005). Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. Biomedical Chromatography, 19(2), 138–148. https://doi.org/10.1002/bmc.430

Andrews J. M., "Determination of minimum inhibitory concentration," J. Antimicrob. Chemother., vol. 48, no. 1, pp. 5–16, 2001.

Arun, C., & Sivashanmugam, P. (2017). Study on optimization of process parameters for enhancing the multi-hydrolytic enzyme activity in garbage enzyme produced from preconsumer organic waste. Bioresource Technology, 226, 200–210. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.029

Ashrafizadeh, M.; Ahmadi, Z.; Mohammadinejad, R.; Ghasemipour Afshar, E. Tangeretin: A Mechanistic Review of Its Pharmacological and Therapeutic Effects. J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 2020, 31 (4), 1–12. https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0191.

Azizi-Toupkanloo, H.; Goharshadi, E.K.; Nancarrow, P. Structural, electrical, and rheological properties of palladium/silver bimetallic nanoparticles prepared by conventional and ultrasonic-assisted reduction methods. Adv. Powder Technol. 2014, 25, 801-810. DOI: 10.1016/j.apt.2013.11.015

Bacanli, M.; Başaran, A. A.; Başaran, N. The Antioxidant and Antigenotoxic Properties of Citrus Phenolics Limonene and Naringin. Food Chem. Toxicol. 2015, 81, 160–170. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.015.

Basavegowda, N., Mandal, T. K., & Baek, K. H. (2020). Bimetallic and Trimetallic Nanoparticles for Active Food Packaging Applications: A Review. Food and Bioprocess Technology, 13(1), 30–44. https://doi.org/10.1007/s11947-019-02370-3

Boshtam, M., Moshtaghian, J., Naderi, G., Asgary, S., & Nayeri, H. (2011). Antioxidant effects of Citrus aurantifolia (Christm) juice and peel extract on LDL oxidation. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, 16(7), 951.

Burridge, K., Johnston, J., & Borrmann, T. (2011). Silver nanoparticle-clay composites. Journal of Materials Chemistry, 21(3), 734–742. https://doi.org/10.1039/c0jm02702b

Castro, L., Blázquez, M. L., González, F., Muñoz, J. A., & Ballester, A. (2013). Gold, silver and platinum nanoparticles biosynthesized using orange peel extract. Advanced Materials Research, 825, 556–559. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.825.556

Castro-vazquez, L.; Alañón, M. E.; Rodríguez-robledo, V.; Pérez-coello, M. S.; Hermosín-gutierrez, I.; Díaz-maroto, M. C.; Jordán, J.; Galindo, M. F.; Arroyo-jiménez, M. M. And Cytoprotective Effects of Dried Grapefruit Peels (Citrus Paradisi Macf .). Oxid. Med. Cell. Longev. 2016, 2016, 1–12.

Cavaleri, J. et al. Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology, Seattle, Washington 12, 53–42 (2005).

Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M. Nanosilver as a New Generation of Nanoproduct in Biomedical Applications. Trends Biotechnol. 2010, 28 (11), 580–588. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006.

Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloevera plant extract. Biotechnology progress, 22(2), 577-583.

Chen, P.; Song, L.; Liu, Y.; Fang, Y. e. Synthesis of Silver Nanoparticles by γ-Ray Irradiation in Acetic Water Solution Containing Chitosan. Radiat. Phys. Chem. 2007, 76 (7), 1165–1168. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.11.012.

Condalab. Agar Luria (Agar LB Miller) Test Microbiológico. Condalab 2019, 21 (7), 1–2.

Dankovich, T. A.; Gray, D. G. Bactericidal Paper Impregnated with Silver Nanoparticles for Point-of-Use Water Treatment. Environ. Sci. Technol. 2011, 45 (5), 1992–1998. https://doi.org/10.1021/es103302t.

Dědková, K., Matějová, K., Lang, J., Peikertová, P., Kutláková, K. M., Neuwirthová, L., Frydrýšek, K., & Kukutschová, J. (2014). Antibacterial activity of kaolinite/nanoTiO2 composites in relation to irradiation time. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 135, 17–22. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.004

Denkova-kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., & Goranov, B. (2021). Chemical composition , antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (Citrus reticulata L .), grapefruit (Citrus paradisi L .), lemon (Citrus lemon L .) and cinnamon (Cinnamomum zeylanicum Blume). 76, 175–185.

Dhanya, B. S., Mishra, A., Chandel, A. K., & Verma, M. L. (2020). Development of sustainable approaches for converting the organic waste to bioenergy. Science of the Total Environment, 723, 138109. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138109

Escárcega-González, C. E., Garza-Cervantes, J. A., Vázquez-Rodríguez, A., Montelongo-Peralta, L. Z., Treviño-González, M. T., Díaz Barriga Castro, E., Saucedo-Salazar, E. M., Chávez Morales, R. M., Regalado Soto, D. I., Treviño González, F. M., Carrazco Rosales, J. L., Villalobos Cruz, R., & Morones-Ramírez, J. R. (2018). In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using acacia rigidula as a reducing and capping agent. International Journal of Nanomedicine, 13, 2349–2363. https://doi.org/10.2147/IJN.S160605

Faghihi, R., Larijani, K., Abdossi, V., & Moradi, P. (2020). Silver nanoparticles produced by green synthesis using Citrus paradise peel inhibits Botrytis cinerea in vitro. Journal of Horticulture and Postharvest Research, 3(2), 151–160. https://doi.org/10.22077/jhpr.2019.2540.1063

Flores Palomino, G. E. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES EN EL PSEUDOFRUTO DE MARAÑÓN (Anacardium Occidentale L.), ROJO Y AMARILLO EN TRES ESTADOS DE MADUREZ (FISIOLÓGICA, COMERCIAL Y SOBREMADUREZ) EN PUCALLPA. 2019, 1–27.

Ghaffar, A.; Kiran, S.; Rafique, M. A.; Iqbal, S.; Nosheen, S.; Hou, Y.; Afzal, G.; Bashir, M.; Aimun, U. Citrus Paradisi Fruit Peel Extract Mediated Green Synthesis of Copper Nanoparticles for Remediation of Disperse Yellow 125 Dye. Desalin. Water Treat. 2021, 212, 368–375. https://doi.org/10.5004/dwt.2021.26684.

Giamperi, L., Fraternale, D., Bucchini, A., & Ricci, D. (2004). Antioxidant activity of Citrus paradisi seeds glyceric extract. Fitoterapia, 75(2), 221-224.

Gour, A.; Jain, N. K. Advances in Green Synthesis of Nanoparticles. Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2019, 47 (1), 844–851. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878.

Ha, S. K.; Park, H. Y.; Eom, H.; Kim, Y.; Choi, I. Narirutin Fraction from Citrus Peels Attenuates LPS-Stimulated Inflammatory Response through Inhibition of NF-KB and MAPKs Activation. Food Chem. Toxicol. 2012, 50 (10), 3498–3504. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.007.

Hajimahmoodi, M.; Moghaddam, G.; Mousavi, S. M.; Sadeghi, N.; Oveisi, M. R.; Jannat, B. Eriocitrin and Quercetin Contents of Various Lemon Juices. 2014, 13 (June), 951–956.

Hariram, M.; Ganesan, V.; Muthuramkumar, & S.; Vivekanandhan, & S. Functionalization of Kaolin Clay with Silver Nanoparticles by Murraya Koenigii Fruit Extract-Mediated Bioreduction Process for Antimicrobial Applications. https://doi.org/10.1007/s41779-020-00545-2/Published.

Huang, H.; Yang, X. Synthesis of Polysaccharide-Stabilized Gold and Silver Nanoparticles: A Green Method. Carbohydr. Res. 2004, 339 (15), 2627–2631. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.005.

Ibrahim, H. M. M. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Banana Peel Extract and Their Antimicrobial Activity against Representative Microorganisms. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 2015, 8 (3), 265–275. https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007.

Ingle, A. P., Duran, N., & Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(3), 1001–1009. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8

Jalani, N. S., Michell, W., Lin, W. E., Hanani, S. Z., Hashim, U., & Abdullah, R. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles using Citrus grandis peel extract. Malaysian Journal of Analytical Sciences, 22(4), 676–683. https://doi.org/10.17576/mjas-2018-2204-14

Jha, A. K.; Prasad, K.; Prasad, K.; Kulkarni, A. R. Plant System: Nature's Nanofactory. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2009, 73 (2), 219–223. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.018.

Judy Azar, A. R., & Mohebbi, S. (2013). One-pot greener synthesis of silver nanoparticles using tangerine peel extract: Large-scale production. Micro and Nano Letters, 8(11), 813–815. https://doi.org/10.1049/mnl.2013.0473

Kalemelawa, F., Nishihara, E., Endo, T., Ahmad, Z., Yeasmin, R., Tenywa, M. M., & Yamamoto, S. (2012). An evaluation of aerobic and anaerobic composting of banana peels treated with different inoculums for soil nutrient replenishment. Bioresource Technology, 126, 375–382. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.030

Khan, A.; El-Toni, A. M.; Alrokayan, S.; Alsalhi, M.; Alhoshan, M.; Aldwayyan, A. S. Microwave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles Using Poly-N-Isopropylacrylamide/Acrylic Acid Microgel Particles. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2011, 377 (1–3), 356–360. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.042.

Khan, Z.; Al-Thabaiti, S. A.; Obaid, A. Y.; Al-Youbi, A. O. Preparation and Characterization of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2011, 82 (2), 513–517. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.008.

Lee, S. H., & Jun, B. H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. International Journal of Molecular Sciences, 20(4), 1–23. https://doi.org/10.3390/ijms20040865

Lee, Y. Y.; Lee, E. J.; Park, J. S.; Jang, S. E.; Kim, D. H.; Kim, H. S. Anti-Inflammatory and Antioxidant Mechanism of Tangeretin in Activated Microglia.

J. Neuroimmune Pharmacol. 2016, 11 (2), 294–305. https://doi.org/10.1007/s11481-016-9657-x.

Lin, L. Y., Chuang, C. H., Chen, H. C., & Yang, K. M. (2019). Lime (Citrus aurantifolia (Christm.) swingle) essential oils: Volatile compounds, antioxidant capacity, and hypolipidemic effect. Foods, 8(9). https://doi.org/10.3390/foods8090398

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

Manthey, J. A.; Grohmann, K. Concentrations of Hesperidin and Other Orange Peel Flavonoids in Citrus Processing Byproducts. J. Agric. Food Chem. 1996, 44 (3), 811–814. https://doi.org/10.1021/jf950572g.

Medina, M. Medios de Cultivo En Un Laboratorio de Microbiología. Rev. Invest. (Guadalajara). 2012, 2 (4), 1–42.

Meneguzzo, F., Brunetti, C., Fidalgo, A., Ciriminna, R., Delisi, R., Albanese, L., Zabini, F., Gori, A., Nascimento, L. B. dos S., De Carlo, A., Ferrini, F., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2019). Real-scale integral valorization of waste orange peel via hydrodynamic cavitation. Processes, 7(9), 1–24. https://doi.org/10.3390/pr7090581

Mitchell, J. K. (1993). Fundamentals of soil behavior., 2nd edn (Wiley: New York).

Montanari, A., Chen, J., & Widmer, W. (1998). Citrus flavonoids: A review of past biological activity against disease. Discovery of new flavonoids from dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves. Advances in Experimental Medicine and Biology, 439, 103–116. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5335-9_8

Nair, R.; Varghese, S. H.; Nair, B. G.; Maekawa, T.; Yoshida, Y.; Kumar, D. S. Nanoparticulate Material Delivery to Plants. Plant Sci. 2010, 179 (3), 154–163. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012.

Najimu Nisha, S., Aysha, O. S., Syed Nasar Rahaman, J., Vinoth Kumar, P., Valli, S., Nirmala, P., & Reena, A. (2014). Lemon peels mediated synthesis of silver nanoparticles and its antidermatophytic activity. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 124, 194–198. https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.12.019

Nasr, H. A., Nassar, O. M., El-Sayed, M. H., & Kobisi, A. A. (2019). Characterization and antimicrobial activity of lemon peel mediated green synthesis of silver nanoparticles. International Journal of Biology and Chemistry, 12(2), 56–63. https://doi.org/10.26577/ijbch-2019-i2-7

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 442431, Narirutin. Retrieved February 27, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Narirutin.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 10621, Hesperidin. Retrieved March 10, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hesperidin.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 83489, Eriocitrin. Retrieved March 14, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eriocitrin.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 442428, Naringin. Retrieved March 14, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringin.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 68077, Tangeretin. Retrieved March 14, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tangeretin.

Nazeruddin, G. M., Prasad, R. N., Shaikh, Y. I., & Shaikh, A. A. (2014). Synergetic effect of Ag-Cu bimetallic nanoparticles on antimicrobial activity. Der Pharmacia Lettre, 6(3), 129–136.

Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishii, T.; Yano, M.; Ohta, H. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006, 70 (1), 178–192. https://doi.org/10.1271/bbb.70.178.

Park, K.; Seo, D.; Lee, J. Conductivity of Silver Paste Prepared from Nanoparticles. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2008, 313–314, 351–354. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.04.147.

Pasachova, J.; Ramirez, S.; Muñoz, L. Staphylococcus Aureus: Generalidades, Mecanismos de Patogenicidad y Colonización Celular. Nova 2019, 17 (32), 25–38.

Patakfalvi, R., & Dékány, I. (2004). Synthesis and intercalation of silver nanoparticles in kaolinite/DMSO complexes. Applied Clay Science, 25(3–4), 149–159. https://doi.org/10.1016/j.clay.2003.08.007

Peterson, J. J.; Beecher, G. R.; Bhagwat, S. A.; Dwyer, J. T.; Gebhardt, S. E.; Haytowitz, D. B.; Holden, J. M. Flavanones in Grapefruit, Lemons, and Limes: A Compilation and Review of the Data from the Analytical Literature. J. Food Compos. Anal. 2006, 19 (SUPPL.), 74–80. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.009.

Prow, T. W.; Grice, J. E.; Lin, L. L.; Faye, R.; Butler, M.; Becker, W.; Wurm, E. M. T.; Yoong, C.; Robertson, T. A.; Soyer, H. P.; Roberts, M. S. Nanoparticles and Microparticles for Skin Drug Delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 2011, 63 (6), 470–491. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.012.

Quiñones, M.; Aleixandre, M. M. A. Los Polifenoles, Compuestos de Origen Natural Con Efectos Saludables Sobre El Sistema Cardiovascular. [The polyphenols, Nat. Occur. Compd. with Benef. Eff. Cardiovasc. Dis. 2012, 27 (1), 76–89. https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418.

Ramyadevi, J.; Jeyasubramanian, K.; Marikani, A.; Rajakumar, G.; Rahuman, A. A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Copper Nanoparticles. Mater. Lett. 2012, 71, 114–116. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.12.055.

Reicha, F. M.; Sarhan, A.; Abdel-Hamid, M. I.; El-Sherbiny, I. M. Preparation of Silver Nanoparticles in the Presence of Chitosan by Electrochemical Method. Carbohydr. Polym. 2012, 89 (1), 236–244. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.002.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. Trends Plant Sci. 1997, 2 (4), 152–159. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2.

Rosas-Mendoza, E. S., Méndez-Contreras, J. M., Aguilar-Lasserre, A. A., Vallejo-Cantú, N. A., & Alvarado-Lassman, A. (2020). Evaluation of bioenergy potential from citrus effluents through anaerobic digestion. Journal of Cleaner Production, 254, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120128

Rosbero, T. M. S., & Camacho, D. H. (2017). Green preparation and characterization of tentacle-like silver/copper nanoparticles for catalytic degradation of toxic chlorpyrifos in water. Journal of Environmental Chemical Engineering, 5(3), 2524–2532. https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.009

SÁNCHEZ, C. 2005. “Producción y Comercialización de Cítricos”, ediciones Ripalme, Lima. p 25 a 29; 110,111.

Satyavani, K., Gurudeeban, S., Ramanathan, T., & Balasubramanian, T. (2011). Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. Journal of Nanobiotechnology, 9, 2–9. https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-43

Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. Silver Nanoparticles: Green Synthesis and Their Antimicrobial Activities. Adv. Colloid Interface Sci. 2009, 145 (1–2), 83–96. https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002.

Shende, S., Ingle, A. P., Gade, A., & Rai, M. (2015). Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus medica Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(6), 865–873. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1840-3

Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2016). Green Synthesis, Characterization and Uses of Palladium/Platinum Nanoparticles. Nanoscale Research Letters, 11(1). https://doi.org/10.1186/s11671-016-1695-z

Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2020). Current status of plant metabolite-based fabrication of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: A review. Biomaterials Research, 24(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s40824-020-00188-1

Siles, J. A., Vargas, F., Gutiérrez, M. C., Chica, A. F., & Martín, M. A. (2016). Integral valorisation of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting technologies. Bioresource Technology, 211, 173–182. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.056

Song, J. Y.; Kim, B. S. Rapid Biological Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Leaf Extracts. Bioprocess Biosyst. Eng. 2009, 32 (1), 79–84. https://doi.org/10.1007/s00449-008-0224-6.

Subhapriya, S.; Gomathipriya, P. Green Synthesis of Titanium Dioxide (TiO2) Nanoparticles by Trigonella Foenum-Graecum Extract and Its Antimicrobial Properties. Microb. Pathog. 2018, 116 (December 2017), 215–220. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.027.

Sumitha, S.; Vidhya, R. P.; Suba Lakshmi, M.; Shanmugha Prasad, K. Leaf Extract Mediated Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Ocimum Tenuiflorum and Its Characterisation. Int. J. Chem. Sci. 2016, 14 (1), 435–440.

Suraj, G., Iyer, C. S. P., & Lalithambika, M. (1998). Adsorption of cadmium and copper by modified kaolinites. Applied Clay Science, 13(4), 293-306.

Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 6(2), 257–262. https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002

USDA—United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Citrus: World Markets and Trade. 2019; pp. 1–11. Available online: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf (accessed on 22 September 2020).

Volokitin, Y., J. Sinzig, L. De Jongh, G. Schmid, M. Vargaftik, and I. Moiseevi. 1996. Quantum-size effects in the thermodynamic properties of metallic nanoparticles. Nature 384 (6610):621–23. doi:10.1038/384621a0

Wang, Z. L. Characterizing the Structure and Properties of Individual Wire-Like Nanoentities. Adv. Mater. 2000, 12 (17), 1295–1298.

https://doi.org/10.1002/1521-4095(200009)12:17<1295::aid-adma1295>3.3.co;2-2.

Wicaksono, W. P., Kadja, G. T. M., Amalia, D., Uyun, L., Rini, W. P., Hidayat, A., Fahmi, R. L., Nasriyanti, D., Leun, S. G. V., Ariyanta, H. A., & Ivandini, T. A. (2020). A green synthesis of gold–palladium core–shell nanoparticles using orange peel extract through two-step reduction method and its formaldehyde colorimetric sensing performance. Nano-Structures and Nano-Objects, 24(September), 100535. https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100535

Wilmsen, P. K., Spada, D. S., & Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(12), 4757–4761. https://doi.org/10.1021/jf0502000

Yang, J.; Pan, J. Hydrothermal Synthesis of Silver Nanoparticles by Sodium Alginate and Their Applications in Surface-Enhanced Raman Scattering and Catalysis. Acta Mater. 2012, 60 (12), 4753–4758. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.05.037.

Zhang, W.; Qiao, X.; Chen, J. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles in AOT Microemulsion System. Chem. Phys. 2006, 330 (3), 495–500. https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2006.09.029.

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. International Journal of Molecular Sciences, 17(9). https://doi.org/10.3390/ijms17091534