

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**“SINTESIS VERDE DE CATALIZADORES DE ORO PARA LA
OBTENCION DE ACIDO LACTOBIONICO”**

Tesis presentada por la Bachiller:

Zegarra Zegarra, Melanie Allison

para optar el Título Profesional de
Ingeniera Biotecnóloga

Asesor (a):

**Mg. Medina Pérez, Jeaneth
Marisol**

Arequipa – Perú

2022

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 21 de septiembre del 2022

Dictamen: 004775-C-EPIB-2022

Visto el borrador del expediente 004775, presentado por:

2014221132 – ZEGARRA ZEGARRA MELANIE ALLISON

Titulado:

**SINTESIS VERDE DE CATALIZADORES DE ORO PARA LA OBTENCION DE ACIDO
LACTOBIONICO**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**0838 – CARDENAS GARCIA JAIME DANTE
DICTAMINADOR**



**2346 – MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**2781 – BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

A mi mamá, mi hermanita y a mis abuelitos por su amor y apoyo incondicional para cumplir cada una de mis metas.

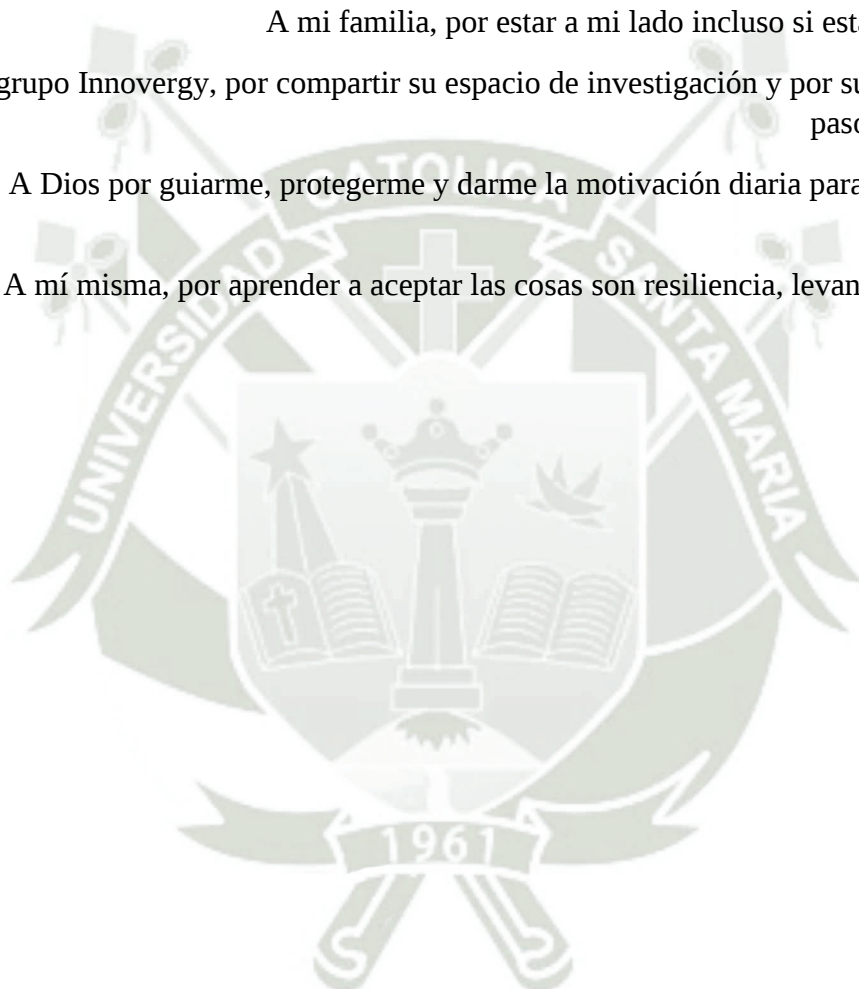
A mi asesora de tesis, por su guía y dedicación a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A mi familia, por estar a mi lado incluso si están lejos de mí.

Al grupo Innovergy, por compartir su espacio de investigación y por su apoyo a cada paso del proyecto.

A Dios por guiarme, protegerme y darme la motivación diaria para culminar esta investigación.

A mí misma, por aprender a aceptar las cosas con resiliencia, levantarme y seguir adelante.



RESUMEN

El presente trabajo describe el estudio de capacidad antioxidante de cinco extractos de las siguientes especies vegetales: Cúrcuma (*Cúrcuma longa L.*), Maíz Morado (*Zea mays L.*), Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*) y Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), por el método de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Por su capacidad antioxidante se escogieron los 3 mejores extractos para la síntesis de nanopartículas de oro, las plantas escogidas fueron: Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), Ratania (*Krameria lappacea*) y Camu camu (*Myrciaria dubia*). Para la síntesis de estas partículas de emplearon diferentes volúmenes de cada extracto vegetal (1 a 5 mL) con 10 mL de agentes precursor. Las nanopartículas se analizaron mediante Zetasizer, obteniendo tamaños de 166.5 nm, 77.03 nm y 107.3 nm respectivamente.

Por resultados obtenidos al evaluar las características y estabilidad de las nanopartículas sintetizadas, se escogieron las nanopartículas obtenidas por extracto de Camu camu (*Myrciaria dubia*) para la obtención de ácido lactobiónico. Las nanopartículas de oro de extracto de Camu camu, fueron caracterizadas por Espectroscopia UV-Vis y Microscopia de Barrido SEM-EDX, con el fin de determinar sus características, morfología y composición.

Para la obtención de ácido lactobiónico se emplearon 20 mL de solución de lactosa empleando diferentes cantidades en mg de nanopartículas y condiciones experimentales, determinándose que el mejor ensayo para su obtención se logró con 5 mg de nanopartículas y a 60 °C de temperatura, obteniendo 21.94 g/L de ácido lactobiónico a las 3 horas.

Por los resultados obtenidos, se ha podido comprobar la eficiencia de estas plantas nativas para la síntesis de nanopartículas de oro, así como en su empleo para el proceso de producción ácido lactobiónico.

Palabras clave: *Uncaria tomentosa*, *Krameria lappacea*, *Myrciaria dubia*, capacidad antioxidante, catalizadores de oro, nanopartículas de oro, ácido lactobiónico, FTIR, SEM-EDX, espectroscopia UV-Vis, Zetasizer.

ABSTRACT

This research project describes the study of antioxidant capacity of five extracts from the following plant species: Curcuma (*Curcuma longa* L.), Maíz morado (*Zea mays* L.), Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*) and Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical decolorization method.

Due to their antioxidant capacity, the 3 best extracts were chosen for the synthesis of gold nanoparticles, the chosen plants were: Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), Ratania (*Krameria lappacea*) and Camu camu (*Myrciaria dubia*). For the synthesis of these particles, use different volumes of each plant extract (1 to 5 mL) with 10 mL of precursor agents. Nanoparticles were analyzed by Zetasizer, reaching a size of 166.5nm, 77.03nm and 107.3nm respectively.

Based on the results obtained when evaluating the characteristics and stability of the synthesized nanoparticles, the nanoparticles obtained by extracting Camu camu (*Myrciaria dubia*) were chosen to obtain lactobionic acid. Camu camu (*Myrciaria dubia*) gold nanoparticles were characterized by UV-Vis Spectroscopy and SEM-EDX Scanning Microscopy, in order to determine their characteristics, morphology and composition.

To obtain lactobionic acid, 20 mL of lactose solution were used using different amounts in mg of nanoparticles and experimental conditions, determining that the best test for obtaining it was achieved with 5 mg of nanoparticles and at a temperature of 60 °C, obtaining 21, 94 g /L of lactobionic acid at 3 hours.

Due to the results obtained, it has been possible to verify the efficiency of these native plants for the synthesis of gold nanoparticles, as well as their use for the production process of lactobionic acid.

Keywords : *Uncaria tomentosa*, *Krameria lappacea*, *Myrciaria dubia*, antioxidant capacity, gold catalysts, gold nanoparticles, lactobionic acid, FTIR, SEM-EDX, UV-Vis spectroscopy, Zetasizer.

INDICE

DICTAMEN APROBATORIO	
DEDICATORIA	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
INDICE	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xii
INTRODUCCION	xiii
HIPOTESIS	xv
OBJETIVOS	xvi
OBJETIVO GENERAL	xvi
OBJETIVOS ESPECIFICOS	xvi
CAPITULO I	xvii
1. MARCO TEORICO	xvii
1.1. Partículas	xvii
1.1.1. Definición de nanopartículas (Np)	xvii
1.2. Clasificación de nanopartículas.....	xviii
1.2.1. Nanopartículas orgánicas.	xviii
1.2.2. Nanopartículas inorgánicas.	xviii
1.2.3. Nanopartículas cerámicas.....	xix
1.2.4. Nanopartículas biológicas o bionanopartículas.	xix
1.3. Síntesis de nanopartículas	xix
1.3.1. Síntesis química.....	xxi
1.3.2. Método de Turkevich	xxi
1.3.3. Método Brust-Schiffrin.	xxii
1.3.4. Método electroquímico.	xxii
1.3.5. Método biológico o Síntesis Verde.	xxii
1.4. Compuestos fenólicos en especies vegetales.....	xxiv
1.4.1. Ratania (<i>Krameria lappacea</i> o <i>Krameria triandra</i>).	xxiv
1.4.2. Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>).....	xxv
1.4.3. Uña de Gato (<i>Uncaria tomentosa</i>)	xxv

1.4.4.	Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>).....	xxvi
1.4.5.	Maíz Morado (<i>Zea mays L.</i>).....	xxvi
1.4.6.	Compuestos fenólicos	xxvii
1.5.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	xxviii
1.6.	Radicales Libres	xxix
1.7.	Antioxidantes	xxx
1.8.	Método DPPH	xxx
1.8.1.	Fundamento Método DPPH	xxx
1.9.	Ácido lactobiónico	xxxii
1.9.1.	Importancia en la industria farmacéutica.	xxxii
1.9.2.	Importancia en la industria química.	xxxii
1.9.3.	Importancia en la industria cosmética.	xxxiii
1.9.4.	Importancia en la industria nutricional.....	xxxiii
1.10.	Microscopía electrónica de barrido	xxxiii
1.10.1.	Formación de imagen.	xxxv
1.10.2.	Caracterización de materiales.....	xxxv
1.10.3.	Principios de la espectroscopia de rayos X de dispersión de energía.....	xxxvi
1.11.	Espectrofotometría UV-Vis.....	xxxviii
1.12.	FTIR	xxxviii
CAPITULO II.....		xxxix
2.	MATERIALES Y METODOS	xxxix
2.1.	MATERIALES	xxxix
2.1.1.	Muestras vegetales	xxxix
2.1.2.	Reactivos químicos	xxxix
2.1.3.	Equipos.....	xxxix
2.1.4.	Software	xxxix
2.2.	METODOLOGIA	xl
2.2.1.	Evaluación y determinación del potencial reductor de los extractos vegetales.....	xl
2.2.2.	Síntesis verde de nanopartículas de oro.	xliv
2.2.3.	Análisis morfológico y composicional en SEM y EDX.....	xliv
2.2.4.	Producción de ácido lactobiónico a partir de lactosa	l
CAPITULO III.....		liii
3.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	liii
3.1.	Determinación de la capacidad antioxidante para las 5 especies vegetales.	liii

3.2. Síntesis de partículas a partir de los extractos con mayor capacidad antioxidante.	lvii
3.3. Análisis morfológico y composicional de nanopartículas de oro producidas por extractos vegetales con mayor capacidad antioxidante.	lxiii
3.4. Caracterización de ácido lactobiónico.....	lxviii
3.5. Producción de ácido lactobiónico.	lxxi
CAPITULO IV	lxxv
4.1. CONCLUSIONES	lxxv
REFERENCIA	lxxvi



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Color de partículas según el tamaño y forma de las mismas (7).....	xvii
Figura 2. Esquema de la reducción de oro y formación de nanopartículas. (10).	xx
Figura 3. Esquema síntesis verde de nanopartículas de oro producida por extractos vegetales (2).....	xxiv
Figura 4. Meristemo en crecimiento de raíz de ratania, plantula resiembra Krameria lappacea (21).....	xxiv
Figura 5. Fruto Camu camu verde (Myrciaria dubia) (22).	xxv
Figura 6. Tallo Uña de gato seca (Uncarla tomentosa).	xxvi
Figura 7. Rizoma Cúrcuma (Cúrcuma longa) (24).....	xxvi
Figura 8. Maíz morado (Zea mays L.) (a) coronta, (b) brácteas (25).....	xxvii
Figura 9. Reacción del radical DPPH con un antioxidante. (34).....	xxxii
Figura 10. Esquema de la oxidación catalítica de la lactosa a ácido lactobiónico (35).	xxxii
Figura 11. Secuencia del proceso de formación de imagen SEM (41).	xxxv
Figura 12. Representación de los tipos de espectro de rayos X emitidos tras el bombardeo de electrones rápidos (42).....	xxxvii
Figura 13. Esquema de preparación de extractos vegetales.	xli
Figura 14. Soluciones stock y estándares de Trolox tratados por DPPH	xlii
Figura 15. Diluciones preparadas a partir de los extractos iniciales de cada especie vegetal.....	xliii
Figura 16. Esquema de síntesis verde de partículas por extractos vegetales.....	xlvi
Figura 17. Esquema para la síntesis verde de partículas.	xlvi
Figura 18. Imágenes equipo Zetasizer Nano ZS90.	xlvi
Figura 19. Procesador ultrasónico Model CV 188, SERIAL 201502).....	xlvi
Figura 20. Esquema purificación de Nanopartículas (50).....	xlix
Figura 21. Imágenes equipo SEM- UCSM.....	l
Figura 22. Secado de partículas en estufa a 40°C.	l
Figura 23. Producción de ácido lactobiónico a partir de partículas de oro y Equipo FTIR-ART.	lii
Figura 24. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método DPPH.. liv	liv
Figura 25. Muestras de extractos vegetales posterior al tratamiento con DPPH.....	liv
Figura 26. Poder reductor de las especies vegetales.....	lv
Figura 27. Curva de calibración para la capacidad antioxidante por inhibición de DPPH.....	lvi
Figura 28. Resultados primera ronda experimental.....	lix
Figura 29. Informe de distribución de tallas por intensidad E.V. Camu camu.	lx
Figura 30. Informe de distribución de tallas por intensidad E.V. Ratania.	lxi
Figura 31. Informe de distribución de tallas por intensidad E.V. Uña de gato.	lxi

Figura 32. Imágenes de partículas sintetizadas líquidas con 1mL de cada extracto vegetal A) Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>), B) Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>) y C) Ratania (<i>Krameria lappacea</i>).	lxiii
Figura 33. Espectro UV- Vis nanopartículas de oro con extracto de Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>).	lxiv
Figura 34. Espectro FTIR de A) Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>), B) Ratania (<i>Krameria lappacea</i>) y C) Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>).	lxvi
Figura 35. Imágenes SEM de partículas de Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	lxvi
Figura 36. Imágenes SEM de partículas Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>)	lxvii
Figura 37. Imágenes EDX Nanopartículas Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	lxvii
Figura 38. Análisis elemental de NpAu Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	lxviii
Figura 39. Comparación de espectros FTIR de lactosa y ácido lactobiónico.	lxix
Figura 40. Espectro FTIR de ácido lactobiónico obtenidas en la curva de calibración.	lxx
Figura 41. Curva de calibración ácido lactobiónico.	lxx
Figura 42. Porcentaje de rendimiento de ácido lactobiónico por ensayo experimental.	lxxii
Figura 43. Relación entre las áreas y los ensayos realizados	lxxiv

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de estándares de Trolox para radical DPPH	xli
Tabla 2. Preparación de la Curva de calibración de DPPH	xlii
Tabla 3. Preparación de muestras de extractos vegetales para el análisis por DPPH..	xliii
Tabla 4. Prueba piloto síntesis de partículas de oro.	xlvi
Tabla 5. Síntesis de partículas de oro a partir extracto de Ratania (<i>Krameria lappacea</i>) con diferentes parámetros experimentales.....	xlvi
Tabla 6. Síntesis de partículas con extracto de Ratania (<i>Krameria lappacea</i>), Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>), Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>).	xlvi
Tabla 7. Parámetros empleados para la producción de ácido lactobiónico a partir de lactosa.	li
Tabla 8. Curva de Calibración ácido lactobiónico.....	lii
Tabla 9. Calibración del método de DPPH con estándares de Trolox.	liii
Tabla 10. Capacidad antioxidante de muestras de extractos vegetales por el método DPPH.....	liv
Tabla 11. Inhibición del radical DPPH para patrones de Trolox.....	lv
Tabla 12. Capacidad antioxidante de extractos vegetales por el método DPPH.....	lvi
Tabla 13. Prueba piloto con extractos de Ratania (<i>Krameria lappacea</i>), Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>), Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>).....	lvii
Tabla 14. Primera prueba preliminar con extracto de Ratania (<i>Krameria lappacea</i>)...	lviii
Tabla 15. Pruebas de síntesis de partículas sin ultrasonificación y con ultrasonificación.	lx
Tabla 16. Síntesis de partículas posterior al proceso de purificación.....	lxi
Tabla 17. Grupos funcionales de los espectros IR de E.V. de Camu camu, Ratania y Uña de gato.....	lxv
Tabla 18. Tabla composicional de NpAu Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>).....	lxviii
Tabla 19. Tabla resumen de flexiones presentes en ácido lactobiónico y lactosa.....	lxix
Tabla 20. Lectura área de la curva de calibración del ácido lactobiónico.....	lxxi
Tabla 21. Resultados de la producción de ácido lactobiónico a partir de cantidad de nanopartículas en (mg)	lxxi
Tabla 22. Rendimiento ácido lactobiónico para cada ensayo con nanopartículas de oro por E.V. de Camu camu.....	lxxii
Tabla 23. Áreas obtenidas tras las lecturas en FTIR por cada secuencia de experimentos.....	lxxiii
Tabla 24. Concentraciones en g/L de LBA por cada secuencia de experimentos....	lxxiii
Tabla 25. Análisis ANOVA en 2 vías.	lxxiii

ABREVIATURAS

LBA: Ácido Lactobiónico.

EDX: Espectroscopia de rayos X de Dispersión de Energía.

FTIR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.

ATR: Reflectancia Total Atenuada.

Np: Nanopartículas.

Np Au: Nanopartículas de oro.

SEM: Microscopia de Barrido Electrónico.

E.V.: Extracto Vegetal

Zsizer: Zetasizer



INTRODUCCION

Las nanopartículas de metales nobles y específicamente, nanopartículas de oro, exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad, con un amplio espectro de aplicación como catalizador en reacciones químicas. Estas pueden ser producidas en distintos tamaños y formas, así como por múltiples métodos de síntesis (1).

El uso de plantas en la síntesis de nanopartículas metálicas ofrece un procedimiento de un solo paso para su obtención, en la cual la naturaleza del extracto de la planta, la concentración del agente reductor, la concentración de solución metálica, tiempo de reacción, pH y temperatura afectan la tasa de producción de nanopartículas, influyendo en sus características morfológicas y propiedades anteriormente mencionadas (2).

La síntesis verde o biosíntesis de partículas nanométricas presenta múltiples ventajas frente a los métodos de síntesis química de catalizadores, en primer lugar, esta nueva tecnología incluye recursos biológicos de fácil adquisición y económicos, no requiere el uso de altas temperaturas o presión, ni es necesario el empleo de reactivos tóxicos y agresivos con el medio ambiente (3).

Actualmente existe un gran interés sobre explorar el potencial antioxidante de distintas plantas con el fin de emplearlas en diferentes industrias. El Perú al igual que otros países de Latinoamérica y el Caribe cuenta con una gran variedad de alimentos beneficiosos empleados desde poblaciones indígenas hasta la actualidad. Estas propiedades promotoras de la salud se deben principalmente a la cantidad de antioxidantes, compuestos fenólicos, vitaminas y minerales presentes en ella de forma natural. La característica de megadiversidad propia del territorio peruano permiten ofrecer condiciones de crecimiento idóneas para distintos tipos de raíces, semillas y frutos, capaces de soportar diferentes condiciones medio ambientales como son temperatura extremas y exposición a radiación y en respuesta a este estrés abiótico que se cree que se favorece la cantidad de compuestos antioxidantes en las plantas empleadas en ellas como mecanismo de protección (4). Característica idónea para ser posibles reductores en una síntesis de catalizadores de oro, para ser empleados en distintos tipos de industria en el país, presentándose como una oportunidad de desarrollo sostenible.

Por otro lado, el ácido lactobiónico (LBA), es un ácido aldónico, familia de los azúcares ácidos obtenidos por la oxidación del grupo funcional aldehído de una aldosa para formar un grupo funcional carboxilo, obtenido al oxidarse la lactosa. LBA posee múltiples aplicaciones como ingrediente alimenticio y producto farmacéutico por su poder antioxidante y propiedades humectantes, también es empleado en el área médica para uso investigativo. Actualmente los productores más importantes de ácido lactobiónico se encuentran en Alemania y Países Bajos, teniendo una demanda de 15000 y 17000 toneladas anuales, provista a un crecimiento del 5 % anual (5).

Es por esto que la presente investigación busca sintetizar catalizadores de oro a nanoescala a base de 5 plantas peruanas con potencial antioxidante: Cúrcuma (*Cúrcuma*

longa L), Maíz Morado (*Zea mays L.*), Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), con el fin de determinar la que produzca mejores características y estabilidad de partículas, para emplearlas en la obtención de ácido lactobiónico.



HIPOTESIS

Es probable que la presencia de agentes reductores en especies vegetales endémicas del Perú pueda asistir la formación de partículas de oro como agente reductor y estabilizador, que actúen sobre la lactosa para producir ácido lactobiónico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la síntesis verde de catalizadores de oro para la obtención de ácido lactobiónico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar los potenciales reductores verdes endémicos del Perú.
2. Seleccionar los agentes reductores con mayor capacidad antioxidante.
3. Sintetizar partículas de oro a partir de los tres extractos vegetales con mayor capacidad antioxidante.
4. Determinar características morfológicas y composicionales de las nanopartículas, mediante microscopia electrónica de barrido SEM - EDX, Zsizer y espectroscopia UV-Vis.
5. Evaluar la capacidad de oxidación de las partículas de oro sintetizadas para la producción de ácido lactobiónico a partir de lactosa por FTIR.
6. Determinar el rendimiento de ácido lactobiónico obtenido tras la utilización de las partículas de oro sintetizadas.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1.Partículas

1.1.1. Definición de nanopartículas (Np)

Se define nanopartículas “como una amplia clase de materiales que incluyen sustancias particuladas, cuya dimensión es inferior a 100 nm” (6).

Estos materiales empezaron a considerarse de importancia en investigación cuando se encontró que el tamaño que poseían podía influir en las propiedades fisicoquímicas de una sustancia como por ejemplo en sus propiedades ópticas.

Las Nanopartículas presentan un color característico según sea el material de precursor siendo las más conocidas las de oro (Au), platino (Pt), plata (Ag) y paladio (Pd) de 20 nm, siendo el rojo vino, gris amarillento, negro y negro oscuro respectivamente, de igual forma se demostró que el color y propiedades de las nanopartículas de oro (Np Au) pueden variar según el tamaño y forma de las mismas. **Figura 1.** En la cual se muestra que la alteración de cualquier factor influye en las propiedades de absorción de las Np, por lo que presentan diferentes colores de absorción (7).

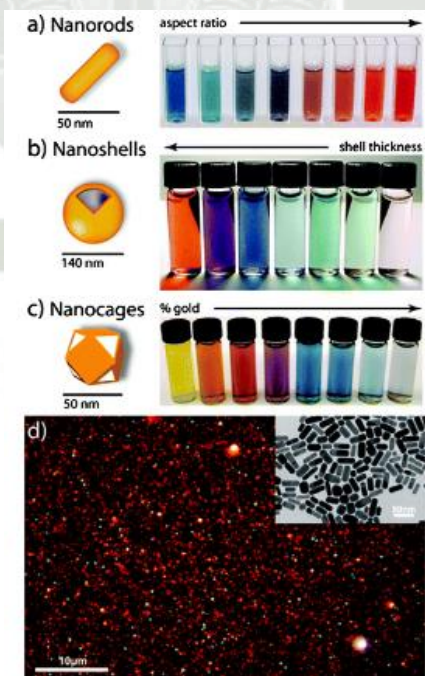


Figura 1. Color de partículas según el tamaño y forma de las mismas (7).

1.2. Clasificación de nanopartículas

Las Nanopartículas se pueden clasificar en diversos tipos según sus características como su morfología, tamaño y forma. Algunas se mencionarán a continuación:

1.2.1. Nanopartículas orgánicas.

En este grupo se incluyen la ferritina, micelas, dendrímeros y liposomas. Las nanopartículas orgánicas, también llamadas nanopartículas poliméricas no son tóxicas, son biodegradables y algunas presentan una esfera hueca específicamente en el caso de las micelas y liposomas.

Estas nanopartículas son empleadas para la administración de fármacos debido a sus características, siendo útiles en la administración de fármacos objetivo. La forma más conocida de estas partículas son la nanoesfera o nanocápsula (8).

1.2.2. Nanopartículas inorgánicas.

Las nanopartículas orgánicas no presentan carbono en su composición, no son tóxicas y son biocompatibles e hidrófilas, y poseen mayor estabilidad que las nanopartículas orgánicas.

Las nanopartículas inorgánicas se clasifican en nanopartículas metálicas y de óxido metálico (8).

1.2.2.1. Nanopartículas metálicas.

Los metales son empleados en la síntesis de nanopartículas metálicas como métodos destructivos o constructivos. Los precursores metálicos son empleados en la síntesis de nanopartículas de metal puro.

Se pueden sintetizar partículas de todos los metales, los precursores más comunes son, aluminio, oro, hierro, plomo, plata, cobalto, zinc, cadmio y cobre. Las nanopartículas presentan propiedades distintas debido a su tamaño (10-100 nm), como son área -superficial a volumen, carga superficial, tamaño de poro, densidad de carga superficial, estructura (cristalina y amorfa), formas (esférica, varilla, hexagonal, tetragonales, cilíndricas e irregulares, color y factor ambiental (luz solar, humedad, aire y calor) (8).

1.2.2.2. Nanopartículas óxido metálicas.

La principal función de estas nanopartículas es modificar las propiedades de sus respectivas nanopartículas metálicas, como son las de nanopartículas de hierro que se oxidan a nanopartículas de óxido de hierro. Se ha comprobado que la reactividad en nanopartículas de óxido de hierro es mayor en nanopartículas de hierro. El ejemplo de nanopartículas de óxidos metálicos son el óxido de zinc, el dióxido de silicio, el óxido de hierro, el óxido de aluminio, el óxido de cerio, el óxido de titanio y la magnetita (8).

1.2.3. Nanopartículas cerámicas.

Las nanopartículas cerámicas, también llamadas sólidos no metálicos, se sintetizan a partir de calentamiento y enfriamiento consecutivo. Estas nanopartículas pueden ser policristalinas, amorfas, porosas, densas o huecas. Estas partículas poseen un amplio espectro de aplicabilidad como son la fotodegradación de colorantes, fotocatalisis, catálisis y aplicaciones de imagen (8).

1.2.4. Nanopartículas biológicas o bionanopartículas.

Las bio-nanopartículas biológicas son un conjunto de átomos o moléculas que se sintetizan en el sistema biológico y tienen al menos una dimensión en el rango de 1 a 100 nm. Todas las bionanopartículas son naturales. Estas nanopartículas se dividen en dos categorías: estructura intracelular y estructura extracelular. Un ejemplo de bionanopartículas con estructura intracelular son los magnetosomas y un ejemplo de bionanopartículas con estructura extracelular son las lipoproteínas y virus (8).

1.3. Síntesis de nanopartículas

Los estados de oxidación del oro incluyen su estado Au^{+1} (auroso), Au^{+3} (áurico) y su estado no oxidado Au^0 , este último es el estado idóneo final para las nanopartículas. Por lo tanto, para la síntesis de nanopartículas de oro (NpAu) es necesario involucrar el paso de reducir el Au^{+1} o Au^{+3} a Au^0 agregando un donante de electrones, (agente reductor) en la reacción. El precursor mayormente utilizado para la síntesis de nanopartículas de oro es el ácido cloroáurico, $HAuCl_4$ con el oro en sus estados de oxidación Au^{+3} (9).

En el procedimiento experimental las nanopartículas de oro se producen en un líquido por la reducción de ácido cloráurico $HAuCl_4$. Una vez disuelto el $HAuCl_4$ en agua, la solución debe ser agitada rápidamente mientras se le añade un agente reductor. Esto permitirá que los iones de oro Au^{+3} sean reducidos a átomos neutros de oro Au^0 . A medida que mas átomos se forman, la solución se vuelve sobresaturada, y el oro poco a poco comenzara a nuclear en forma de partículas nanométricas. El resto de los átomos de oro que se forman, se adhieren a las partículas existentes y si la solución se agita con fuerza suficiente, el tamaño de partículas será uniforme (10).

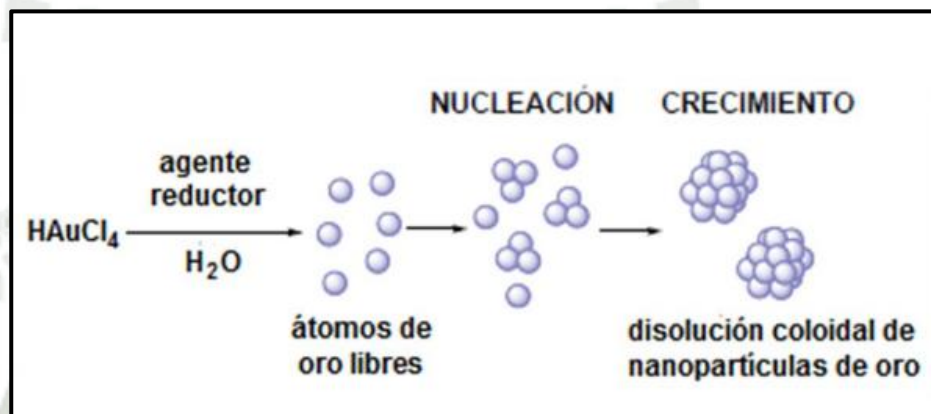
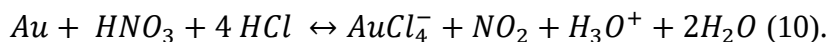


Figura 2. Esquema de la reducción de oro y formación de nanopartículas. (10).

Debido a que el $HAuCl_4$ es una sustancia corrosiva se debe evitar el contacto del metal con el reactivo. Por otro lado, la limpieza de cristalería es de suma importancia en la preparación de nanopartículas de oro, es por esto que todo elemento empleado debe ser lavado con agua regia y enjuagado con agua nanopura para secarse. Este paso evitará la agregación de partículas de oro residuales, así como la nucleación no deseada en el procedimiento de síntesis. Todas las partículas sintetizadas deben almacenarse en oscuridad con el fin de minimizar la oxidación fotoinducida y en refrigeración para disminuir la influencia del calor (11). La importancia del agua regia (HNO_3 y HCl) radica en que esta solución disuelve el oro, sin embargo, no es posible con la acción de los componentes de forma individual, solo en combinación adquieren esta propiedad. El ácido nítrico, HNO_3 , posee un alto potencial oxidante que disuelve incluso mínimas cantidades de oro, formando iones Au^{+3} . Por otro lado, el ácido clorhídrico, HCl , proporciona iones cloruro (Cl^-), los cuales reaccionarán con iones de oro para crear aniones de tetraclorourato (III) en solución. Esta reacción de equilibrio favorece la formación de aniones clorourato ($AuCl_4^-$). Lo que resulta en la eliminación de iones de oro en la solución de oxidación del oro resultante (12).



Los agentes más conocidos para reducir el ácido tetracloroáurico son borohidruro de sodio, aminas, alcoholes, ácidos carboxílicos, citrato de sodio, ácido ascórbico y otros. Sin embargo, dado a la creciente preocupación mundial por el desarrollo de aplicaciones que incluyan métodos ecoamigables y sostenibles, es clave para el proceso sea aceptado y replicable.

Es así, como surge el enfoque ecológico de la formación de nanopartículas, con el fin de cambiar los reductores químicos por materia naturalmente biodegradable.

La degradación de compuestos orgánicos por el enfoque verde (extractos de plantas) se debe principalmente a la presencia de polifenoles en el material biodegradable utilizado en la reacción (13).

A continuación, se mencionarán las principales vías para la síntesis de nanopartículas de oro:

1.3.1. Síntesis química.

La síntesis química de nanopartículas (AuNp) en su reducción química incluye dos partes: La reducción por agentes reductores, por ejemplo, borohidruros, aminoboranos, formaldehído, hidracina, hidroxilamina, polioles, ácidos cítrico y oxálico, azúcares, peróxido de hidrógeno, monóxido de carbono, sulfitos, hidrogeno, acetileno y otros agentes reductores electrónicos; y estabilización usando agentes, por ejemplo citrato trisódico dihidratado, ligandos de azufre (en tiolatos particulares), ligandos de fósforo, ligandos a base de oxígeno y ligandos basados en nitrógeno (incluidos los heterocíclicos compuestos), dendrímeros, polímeros y tensioactivos (bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)), con el fin de evitar la agregación de las partículas (14).

1.3.2. Método de Turkevich

Este es uno de los métodos más empleados en la síntesis de AuNp, consiste en la reducción de $HAuCl_4$ por citrato en agua, creado por Turkevich en 1951. En este método, la solución $HAuCl_4$ se hierve y el citrato trisódico dihidratado se añade rápidamente a la solución en ebullición y agitación vigorosa. Después de unos minutos, la coloración de la solución pasa de un amarillo pálido a un rojo vino intenso. El método sintetiza nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro. Los iones citrato actúan como agentes estabilizadores y reductores a la vez. Posteriormente, este método fue modificado con

el fin de obtener diferentes diámetros de partículas, siendo la modificación realizada por Frens sobre el método de Turkevich el que logró partículas desde 15 nm a 150 nm, controlando la proporción de agente reductor/ agente estabilizador (citrato trisódico/oro). Este último método ha sido modificado por varios grupos de investigación demostrando que al aumentar la concentración de citrato las nanopartículas de oro estabilizan su tamaño pequeño y lo mantienen homogéneo, mientras que al disminuir su concentración se produce agregación de partículas pequeñas volviéndolas más grandes (14).

1.3.3. Método Brust-Schiffrin.

Este método fue descubierto en 1994 y permitió un enfoque más sencillo para la síntesis de nanopartículas de oro estables térmicamente, con un tamaño controlado y baja dispersión. En esta técnica, $AuCl_4^-$ se transfirió a una fase de tolueno desde una solución acuosa usando bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) como agente de transferencia de fase y reducido por $NaBH_4$ en presencia a dodecanotiol. La adición del agente reductor produce un cambio de color de la fase orgánica de un naranja a un marrón oscuro. Indicando la formación de nanopartículas de oro (15).

1.3.4. Método electroquímico.

Este método se desarrolló por primera vez en 1994, se demostró en este estudio que la escala nanométrica de partículas de metales transición podría fijarse electroquímicamente, utilizando sales de tetraalquilamonio como estabilizadores de clusters metálicos en un medio acuoso. Las nanopartículas de oro se preparan electroquímicamente empleando una celda simple de dos electrodos, con oxidación del ánodo y reducción de cátodo. Este método es superior a los otros métodos de síntesis de AuNp debido a su equipo modesto, económico, menor uso de temperatura, alta calidad y facilidad para controlar el rendimiento (16).

1.3.5. Método biológico o Síntesis Verde.

Si bien los métodos químicos son más comunes en la síntesis de nanopartículas metálicas, el uso de reactivos tóxicos y caros como los agentes reductores y estabilizadores limita sus aplicaciones, debido a los residuos de estos reactivos químicos en la superficie de las partículas es que son no aptos en aplicaciones biomédicas.

Los métodos biológicos para la síntesis de nanopartículas se basan en la síntesis por medio de enzimas, plantas o extractos de plantas.

En la actualidad el uso de plantas para la síntesis de nanopartículas de oro aumento su importancia gracias a su disponibilidad, bajo costo y respeto al medio ambiente, debido a su naturaleza no toxica.

La síntesis verde se basa en la reducción de metales mediante especies naturales con poder antioxidante (17).

En el caso específico de las plantas, el método más directo para obtener nanopartículas, es empleando el extracto acuoso de la planta, el cual posee diferentes ingredientes activos (18).

Partes de plantas como as hojas, raíces, látex, semillas y tallos se emplean en la síntesis de nanopartículas metálicas y el punto de vista en común para escoger un reductor es la cantidad de polifenoles como agente principal responsable de la síntesis verde de catalizadores.

Síntesis verde de nanopartículas es el método más avanzado de síntesis de catalizadores debido a que es fácil, relativamente reproducible y rentable, y como característica principal más estables. Otra ventaja de emplear extractos de plantas sobre el empleo de microorganismos es la rapidez de la reacción para obtener las partículas, mientras que una es en minutos, la contraria podría tardar días debido a la baja velocidad de reacción, siendo esto su principal reto de aplicabilidad.

Se han realizado numerosos estudios sobre plantas como el uso de extracto de *Zingiber officinale* sintetizando partículas a partir de el con un tamaño de 5 a 15 nm, actuando como agente reductor y estabilizante (19).

También se sintetizaron partículas de oro a partir de *Piper longum* obteniendo un tamaño promedio de partículas de hasta 56 nm confirmado por DLS, al igual que con extracto acuoso de *Citrus máxima* (C. máxima). Otros extractos empleados de forma exitosa para la síntesis de partículas de oro fueron los extractos acuosos de *Azadirachta indica*, *Phyllanthus amarus*, *Corian drum sativum* (cilantro), *Cassia fistula*, *Lonicera Japonica flower*, entre otros.

En la mayoría de ejemplos la reacción que indica la formación de nanopartículas es bastante rápida una vez se añade el extracto a la solución de Au (III) (19).

El análisis de estas partículas se realiza con equipos que emplean energía dispersiva, como es la espectroscopia de rayos X (EDX), técnicas de microscopia electrónica (SEM), lo que permite corroborar la formación de partículas y evaluar su morfología. Por otro lado, las características espectroscópicas se analizan por métodos de espectroscopia UV-Vis, espectroscopia infrarroja transformada de

Fourier (FTIR), SEM y microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) (19).

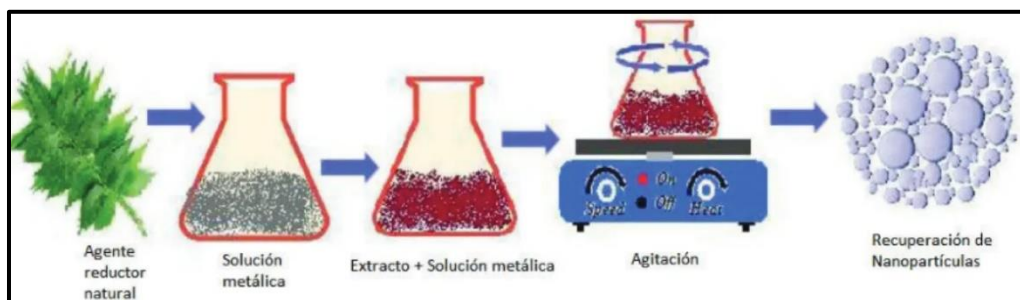


Figura 3. Esquema síntesis verde de nanopartículas de oro producida por extractos vegetales (2).

1.4. Compuestos fenólicos en especies vegetales

1.4.1. Ratania (*Krameria lappacea* o *Krameria triandra*).

Es un arbusto que se distribuye en los semidesiertos andinos peruanos, al sur de Ecuador, Argentina, Chile y Bolivia. Ratania es utilizada en la medicina popular peruana como planta medicinal y como tintura vegetal debido a su contenido de taninos. En la actualidad, es empleada en la industria farmacéutica y cosmética en el cuidado dental y por su potencial antioxidante tópico y captador de radicales libres contra el fotodaño de la piel. Las raíces también contienen neolignanós (20,21).



Figura 4. Meristemo en crecimiento de raíz de ratania, plantula resiembra *Krameria lappacea* (21).

1.4.2. Camu camu (*Myrciaria dubia*)

Es un fruto nativo de la región amazónica, que posee el más alto contenido de ácido ascórbico (vitamina C). Esta fruta está distribuida en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, pero es en la Amazonia peruana donde se encuentra en mayor concentración, en las regiones de Pucallpa y Pevás. La fuente de vitamina C se concentra principalmente en la cascara del fruto maduro o sobre maduro, también es fuente de antioxidantes nutricionales y β - caroteno, este fruto contiene abundantes compuestos fenólicos como elagitaninos, ácido elágico, quercetina glucósidos, ácido siríngico y miricetina (22).



Figura 5. Fruto Camu camu verde (*Myrciaria dubia*) (22).

1.4.3. Uña de Gato (*Uncaria tomentosa*)

Es una liana trepadora que crece en las selvas de América del sur, empleada con fines medicinales. Es empleada como antiinflamatorio y se utiliza como tratamiento para la diabetes, diversas tumoraciones, cáncer y procesos virales. Presenta alcaloides derivados del ácido quinóvico, fitoesteroles y compuestos polifenólicos (flavonoides y taninos catéquicos) (23).



Figura 6. Tallo Uña de gato seca (*Uncarla tomentosa*).

1.4.4. Cúrcuma (*Curcuma longa*)

Es una hierba perenne de casi 1 m de altura, frecuente en el centro y oriente de Cuba, con rizomas subterráneos aromáticos, amarillo brillante en su interior. Esta planta destaca por su contenido de flavonoides, polifenoles, glucósidos, taninos, triterpenos y otros compuestos de acción antioxidante (24).



Figura 7. Rizoma Cúrcuma (*Curcuma longa*) (24).

1.4.5. Maíz Morado (*Zea mays L.*)

Es un integrante de la raza Kculli, único en el mundo de color morado a negro en su grano, brácteas y corontas, debido a las antocianinas que

posee. Las antocianinas son pigmentos naturales hidrosolubles del grupo de flavonoides- glucósidos de las antocianinas (25).

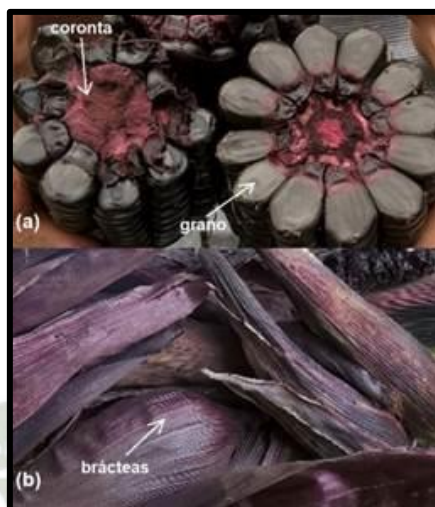


Figura 8. Maíz morado (*Zea mays* L.) (a) coronta, (b) brácteas (25).

1.4.6. Compuestos fenólicos

Son sustancias orgánicas distribuidas ampliamente en el reino vegetal y son sintetizadas como metabolitos secundarios cuya función es la de defensa, son responsables del color, la astringencia, sabor y aroma de los vegetales.

Muestran una gran diversidad de estructuras, incluyendo moléculas simples, como por ejemplo ácido gálico, vainillina y ácido cafeico) y polifenoles como estilbenos, flavonoides y polímeros derivados de estos. Existen más de 8000 moléculas reportadas en la familia solo de los flavonoides, aumentando la lista con el pasar de los años.

En 1962 se definió a los polifenoles por Bate-Smith y Swain como “compuestos fenólicos solubles en agua, que presentan pesos moleculares entre 500 y 3000 (Da) y son capaces de precipitar alcaloides y otras proteínas”, para posteriormente mejorar esta definición por E. Haslam cambiando a “compuestos fenólicos que poseen de 12-16 grupos hidroxilo fenólicos en cinco a siete anillos aromáticos con 1000 (Da) de masa molecular relativa”. En la actualidad se define “polifenol” como el metabolito secundario de plantas derivado exclusivamente de los fenilpropanoides derivados del ácido shikímico y/o de las vías del policético, que presentan más de una resina fenólica y careciendo de cualquier grupo funcional basado en nitrógeno en su expresión estructural más básica” (26).

Existen compuestos fenólicos muy extendidos, mientras que otros son específicos en ciertas familias de plantas o se encuentran únicamente en ciertos órganos de las plantas o etapas de desarrollo de las mismas. La variedad de estructuras está relacionada con las propiedades asociadas a los roles que cumplen en las plantas, de ahí su distribución específica. Un ejemplo son las antocianinas un pigmento presente en la mayoría de órganos vegetales rojos y azules que se encuentran en frutos maduros y flores y cumple el papel de atracción en procesos de polinización y diseminación de semillas.

Los flavonoides protegen los tejidos vegetales contra la radiación UV, mientras que las proantocianidinas (PA) y taninos hidrolizables pueden participar como defensa en las plantas contra herbívoros, hongos y virus, debido a sus propiedades curtientes proteínas y se encuentran en la mayoría de tejidos vegetales antes de las etapas de desarrollo (27).

Los fenoles en extractos vegetales incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y en menor cantidad estilbenos y lignanos. Algunos de los flavonoides más comunes incluyen quercetina, un flavonol abundante en cebolla, brócoli y manzanas, catequina, presente en el té y varias frutas, naringenina, principalmente presente en el pomelo, cianidina-glucósido, una antocianina abundante en frutos rojos y gliciteína, isoflavona presente en la soja.

Los ácidos fenólicos, se pueden dividir en dos clases: derivados del ácido benzoico, como ácido gálico y derivados del ácido cinámico tales como ácido cumárico, cafeico y ferúlico.

El ácido cafeico es el más abundante en frutas y verduras, la mayoría de veces presente como ácido químico como en ácido clorogénico, principal compuesto fenólico en el café. Otro ácido fenólico común es ácido ferúlico, presente en cereales que se esterifica a hemicelulosa en la pared celular (28).

1.5. Determinación de la capacidad antioxidante

Los métodos empleados para la determinación de la capacidad antioxidante se basan en comprobar si un agente oxidante induce al daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inducido o reducido en presencia de un antioxidante, es así como la inhibición que se produce es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto, pero también, existen métodos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los antioxidantes dietéticos más comunes son la vitamina C y E, así como los compuestos fenólicos son considerados potentes antioxidantes en los sistemas biológicos in vitro, la actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero si por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado (29, 30).

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se clasifican según su modo de reacción, llamados ensayos SET o HAT. Los ensayos basados en HAT y SET fueron desarrollados para medir la capacidad de capturar radicales libres, en vez de evaluar la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (31).

a) Ensayos basados en la transferencia de un solo electrón (SET): Estos ensayos están basados en la reacción por transferencia de un solo electrón, se basan en la medida de la capacidad de un compuesto en reducir un oxidante, que cambia de color al ser reducido (32).

- ABTS (*Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico*)
- DPPH (*2,2-difenil-1-picril-hidrazilo*)
- CUPRAC (*Capacidad de reducción antioxidante del cobre*)
- FRAP (*Poder de reducción antioxidante del hierro*)
- DMPD (*N, N-dimetil-p-fenilendiamina*)

b) Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): Estos ensayos están basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrogeno, se desarrolla un esquema de reacción competitiva en la cual el antioxidante y el sustrato compiten por un radical peroxilo (32).

- ORAC (*Capacidad de absorción del radical oxígeno*)
- TRAP (*Parámetro antioxidante de captura de radicales*)
- LDL (*Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad*)
- *Inhibición de la oxidación del ácido linoleico*

1.6.Radicales Libres

Los Radicales libres (RL) átomos o grupos de átomos que contienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre consigue sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose una reacción en cadena que destruye nuestras células.

Esta reactividad es la base de su naturaleza toxica y su corta vida media. Desde el punto de vista molecular, actúan como potentes agentes oxidantes y son causa de envejecimiento al combinarse con moléculas esenciales, como el ADN y proteínas, a las cuales desactivan (33).

1.7. Antioxidantes

Son sustancias que poseen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, en el cuerpo están organizados en diferentes posiciones para proteger en conjunto a los órganos y sistemas de posibles daños tisulares. Pueden ser endógenos como las enzimas o exógenos, como los obtenidos con los alimentos en la dieta diaria o administrados en forma de suplementos. Entre los exógenos se encuentran algunas vitaminas caracterizadas por ceder fácilmente un electrón sin cambiar básicamente su naturaleza, es decir, ceden un electrón sin dar origen a un nuevo radical e impidiendo con ello que el RL existente tome el electrón solicitado de un integrante de los tejidos corporales (33).

La barrera defensiva está constituida principalmente por sistemas antioxidantes que pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos comprenden enzimas cuya misión es catalizar la degradación sucesiva de los RL, convirtiéndolos en estructuras químicas menos agresivas. Entre estas se encuentran la catalasa, la glutatión peroxidasa, y muy especialmente la enzima superóxido dismutasa (SOD) que son una familia antioxidante responsable de la defensa contra la mayoría de las células expuestas al oxígeno, esta prevalece en la matriz mitocondrial, la zinc-SOD en el citosol y la SOD-extracelular.

A nivel del plasma sanguíneo se encuentra la transferrina, la lactoferrina, la ceruloplasmina y la albúmina. Estos derivados proteicos antioxidantes.

Otros antioxidantes circulan en el plasma sanguíneo, entre ellos están la melatonina, los estrógenos, la bilirrubina, el selenio, el zinc, las vitaminas C y E, los carotenos y los flavonoides (33).

Las enzimas lipolíticas (lipasas), proteolíticas (pectidasas y proteasas) entre otras contribuyen a conformar la barrera enzimática de defensa.

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos están constituidos principalmente por tres vitaminas: E, A y C, así como dos oligoelementos fundamentales, el selenio y el zinc. Como los antioxidantes no enzimáticos no se sintetizan en el organismo, se debe mantener un equilibrio entre el consumo endógeno y el aporte exógeno (33).

1.8. Método DPPH

1.8.1. Fundamento Método DPPH

El radical libre DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidracilo) es ampliamente utilizado para evaluar propiedades antioxidantes, debido a su gran estabilidad y color intenso (34).

El mecanismo de reacción se basa en la reducción del radical de hidrogeno estable DPPH, que al donar un protón de hidrogeno el antioxidante al radical, perderá su color violeta y se convertirá a amarillo tenue.

La cuantificación se determina midiendo la disminución de absorbancia a 515 nm a 528 nm. Es empleada para evaluar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos. Es soluble solamente en medio orgánico (34).

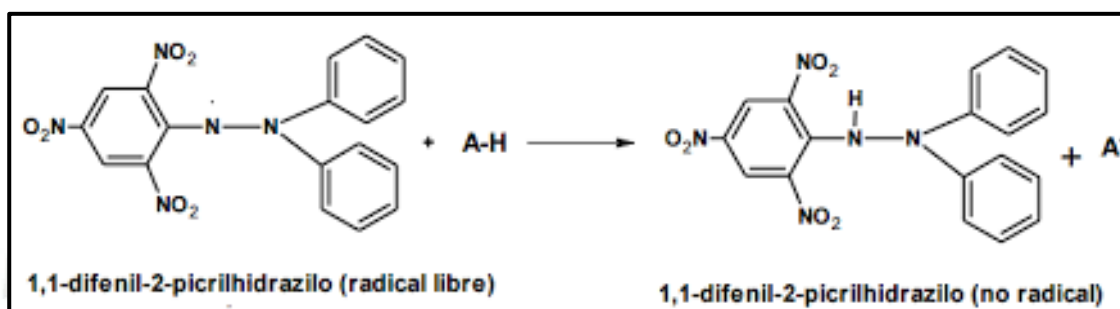


Figura 9. Reacción del radical DPPH con un antioxidante.
(34).

1.9. Ácido lactobiónico

El ácido lactobiónico (LBA) o Ácido 4-O-β- D- galactopiranosil-D-glucónico, $C_{12}H_{22}O_{12}$, es un derivado de la lactosa de alto valor agregado, surgiendo como una prometedora y versátil sustancia con innumerables aplicaciones en la cosmética, industria farmacéutica y alimentaria.

El LBA es un polidroxiaácido, obtenido por la oxidación de la lactosa (Figura. 1) La conversión selectiva de lactosa a LBA consiste en la oxidación del grupo aldehído libre de la glucosa en la molécula de lactosa al grupo carboxilo (35).

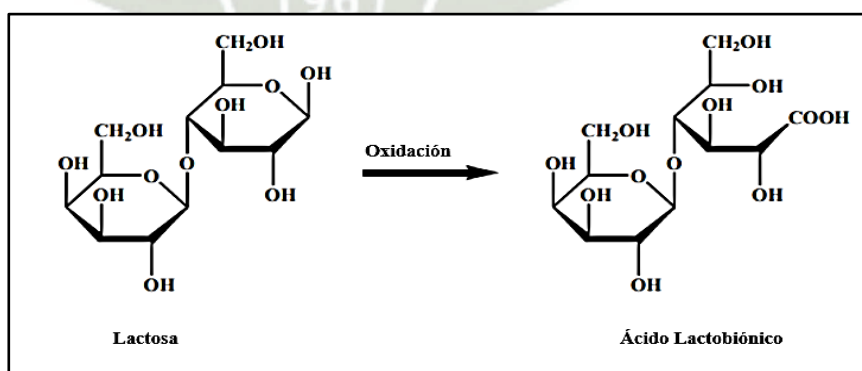


Figura 10. Esquema de la oxidación catalítica de la lactosa a ácido lactobiónico
(35).

LBA exhibe una gran cantidad de actividades biológicas con gran potencial terapéutico debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, así como sus propiedades quelantes, anfífilas (posee una doble afinidad polar- no polar, extremo hidrofílico e hidrófobo) y antioxidantes.

Este ácido carboxílico presenta un peso molecular de 358,3 con un pKA de 3.6, siendo altamente soluble en agua. Es así, que la sal de calcio de LBA muestra una solubilidad en agua mayor 40000 veces que el carbonato de calcio y 10 veces mayor que la del lactato de calcio.

LBA pertenece a la familia de ácidos aldobiónicos, que comprende además el ácido maltobiónico y celobiónico (36).

1.9.1. Importancia en la industria farmacéutica.

LBA ha recibido especial atención debido a su naturaleza como molécula bioactiva, perfecta como plataforma para la síntesis de biomateriales y vehículos de administración de fármacos biocompatibles y biodegradables.

LBA juega un papel de importancia estratégica en el tratamiento hepático a través de la nanomedicina, con un potencial a corto plazo, siendo por tanto una biomolécula clave para el campo de la nanotecnología (37).

La producción de LBA a partir de lactosuero como materia prima de bajo costo contribuye como una opción de bioproducción rentable y respetuosa con el medio ambiente, permitiendo también contribuir con el manejo de este gran residuo de la industria láctea (37).

1.9.2. Importancia en la industria química.

El LBA es empleado en la industria química como tensioactivo a base de azúcar o como co-constructor en detergentes biodegradables, haciendo composiciones de amida LBA (formadas por LBA y ácidos grasos primarios) y mejorando de esta forma sus propiedades de limpieza, estabilizador de espuma, emulsionantes y suavizantes en sistemas acuosos, para la formulación de productos de limpieza.

Por otro lado, LBA está siendo empleado como ingrediente activo en agentes antibacterianos, confiriendo excelente estabilidad de conservación de bienes de consumo.

Finalmente, como un enfoque prometedor, se plantea el LBA como un componente básico en la síntesis biocatalítica de polímeros con posibles aplicaciones industriales (38).

1.9.3. Importancia en la industria cosmética.

La industria farmacéutica actualmente está empleando LBA como un novedoso componente activo para el cuidado de la piel, antienvjecimiento y regenerador.

LBA ofrece beneficios para el tratamiento terapéutico de patologías dermatológicas como la dermatitis atópica y la rosácea. Este polihidroxiácido de la nueva generación de los alfa-hidroxiácidos, que no solo ofrecen efectos terapéuticos, sino que también reducen los efectos secundarios como irritación y escozor, sugiriendo que su aplicación es apta para tratamientos de pieles sensibles (39).

Estos efectos son debido a que su aplicación tópica, promueve la biosíntesis de glicosaminoglicanos o colágeno, mejorando el grosor y firmeza de la piel, también se ha comprobado que tanto la homeostasis de la barrera de la piel como la funcionalidad del estrato córneo mejoran al aplicarse LBA tópicamente.

LBA, constituye un inhibidor de la descomposición de la matriz de enzimas metaloproteinasas, debido a la quelación de metales, reduciendo así la aparición de arrugas producidas por el fotoenvejecimiento. LBA posee fuertes propiedades hidratantes, exfoliantes, humectantes y antioxidantes, ampliando la relevancia en el campo comercial de esta industria (39).

1.9.4. Importancia en la industria nutricional.

Esta sustancia puede considerarse un edulcorante bajo en calorías. Esto debido a que químicamente comprende una molécula de galactosa unida a una molécula de ácido glucónico a través de un enlace tipo éter y se caracteriza por la presencia de grupos multifuncionales (8 grupos hidroxilos).

La industria alimentaria de igual forma presenta gran interés en el uso de ácido lactobiónico como aditivo alimentario como portador de calcio, agente acidificante, agente gelificante, antioxidante, estabilizador, agente de capacidad de retener de agua (en productos cárnicos), potenciador del sabor, entre otras (40).

1.10. Microscopía electrónica de barrido

La microscopia electrónica de barrido o SEM (por sus iniciales del idioma inglés *Scanning Electron Microscopy*) es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, el cual se emplea en estudios de semiconductores, nanopartículas, modificación de productos comerciales, películas delgadas, entre otras, dadas sus características de resolución, magnificación y

versatilidad de variantes permite ser ampliamente aplicada en distintas muestras, ambientes y necesidades experimentales.

Este equipo permite tomar una imagen de la muestra, aunque lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones primarios) en lugar de registrar fotones como en una microscopía óptica común (41).

Un equipo SEM genera un haz de electrones de alta energía y se emplea un sistema de lentes para focalizar el haz (electrones incidentes EI) y hacerlo incidir sobre la muestra a analizar, la cual produce electrones (electrones secundarios y retrodispersados con siglas SE Y BSE, respectivamente) como respuesta al impacto electrónico y estos electrones que salen de la muestra son detectados mediante dispositivos Evenhart-Thornley y SED (Solid state Detector) que registran la cantidad de electrones detectados y lo convierten en señales digitales que se interpretan como intensidad de color, para construir una “imagen” aunque no se usen fotones (42).

Para obtener estas imágenes, se hace mover el haz en el plano xy (con sistemas ópticos, antes de impactar la muestra) de forma que recorra el área deseada o planificada. La resolución que puede alcanzar este equipo, con respecto a la imagen que puede distinguir en dos puntos diferentes próximos entre ellos en la superficie del material, puede llegar a 2 nm (42).

Si el equipo se tiene trabajando en una atmosfera interna en alto vacío y también cuenta con un detector que genere un campo eléctrico para llevar los SE hacia el cuerpo del detector, entonces se puede hacer ESEM (environmental SEM) o SEM ambiental, empleado en imágenes difíciles de tratar, como muestras sensibles al vacío o radiación, muestras líquidas y permite estudiar procesos in situ como corrosión, estrés mecánico o hidratación/deshidratación (42).

Los dispositivos para generar el haz de electrones son generalmente de dos tipos: Emisores termoiónicos o los cañones de emisión de campo (FEG, Field Emission Gun). Los termoiónicos generan electrones de alta velocidad es decir de alta energía, cuando se calienta un filamento metálico (generalmente tungsteno) o de un compuesto como LaB₆ si está en alto vacío. El segundo tipo de emisores de electrones, recientemente acoplados, los FEG, funcionan cuando una punta cristalina de tungsteno recubierta de óxido de Zirconio se somete a un gran campo eléctrico para minimizar la corrosión del emisor que está a alta temperatura, ya que podría reaccionar con moléculas del aire (42).

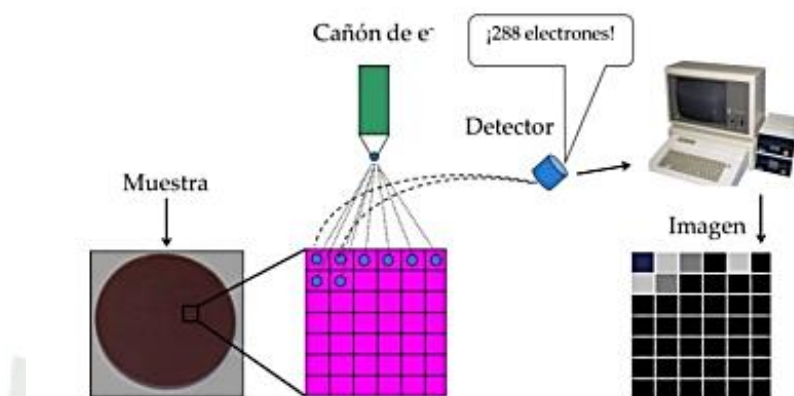


Figura 11. Secuencia del proceso de formación de imagen SEM (41).

1.10.1. Formación de imagen.

La imagen revelada en la imagen es obtenida gracias a un software que interpreta la cantidad de electrones detectados ya sean SE o BSE dándole a cada zona una intensidad de color en la escala de grises de acuerdo a una convención general, es así como las zonas que sean detectadas con un mayor número de electrones se representará con un color más blanco, es debido a esto que las imágenes obtenidas por este equipo son a escala de grises, aunque se puede añadir color de sombreado o saturación de imagen para resaltar la morfología de la imagen obtenida o resaltar características superficiales en la muestra.

El equipo SEM posee una magnificación de imagen desde 10 hasta 500000 veces el tamaño real de un área de muestra, esta magnitud se logrará barriendo un área muy pequeña e interpretando la señal para construir una imagen de dimensiones grandes, obteniendo en pantalla una visualización grande de por ejemplo 1920 x 1080 píxeles (42).

1.10.2. Caracterización de materiales

Debido a la alta resolución que posee el equipo SEM se pueden conocer características detalladas de un material con respecto a su estructura cristalina, porosidad, morfología superficial e incluso su composición química. Cabe mencionar que las imágenes obtenidas por los electrones SE tienen una mejor resolución que las obtenidas por los electrones BSE, a razón del número de electrones detectados siendo en el primer caso mucho mayor que en el segundo y a los efectos de superficie y penetración de los electrones incidentes o EI (42).

Es así como las características morfológicas de todas las muestras se pueden ver con bastante claridad sobre todo si se trata de muestras de materiales semiconductores, ya que la mayoría de procesos de transporte tanto eléctrico como de catálisis asistida por luz están fuertemente relacionados por la superficie del material (42).

Por otro lado, la composición química se puede diferenciar según patrones de contraste de cada zona que se originan según los átomos que lo conforman. Estas son apoyadas por otras técnicas que contrastan los modelos estructurales, para estudiar a mayor profundidad un material, permitiendo a este equipo incursionar en campos del estudio de topografía, recubrimiento microestructural, reconstrucción de imágenes 3D, nanoelectricidad, fotoluminiscencia, síntesis solvotérmica, nanoalambres (nonowires), sensores de glucosa, compuestos antibacterianos entre otros (42).

1.10.3. Principios de la espectroscopia de rayos X de dispersión de energía.

La espectroscopia EDX se emplea para la detección de la composición elemental de la sustancia, mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido.

EDX permite detectar los elementos que poseen un número atómico superior al boro, pudiéndose detectar estos elementos en concentración de al menos 0.1 % (42).

Entre sus principales aplicaciones se incluye la edificación de materiales, identificación de contaminación, análisis de detección puntual de regiones de hasta 10 cm de diámetro, entre otros.

Posterior a la colisión con el haz del equipo SEM, las muestras interactúan con el haz que producen rayos X característicos (42).

Ya que, ningún elemento tiene el mismo espectro en emisión de rayos X, se pueden diferenciar y medir por su concentración en la muestra. La radiografía obtenida es el resultado de la interacción del haz primario de electrones con el núcleo del átomo de muestra (42).

El haz de electrones primario excitará el electrón en el núcleo de un átomo, expulsándolo del núcleo y creando un agujero de electrones. Un electrón de la capa exterior (mayor energía) del átomo reemplazará al faltante y liberará el rayo X superfluo. Los rayos X que se emitirán consisten en un continuo de rayo X (generado por la desaceleración del electrón) y un rayo X característico (generado como resultado de un electrón en la capa del núcleo) (42).

El continuo de rayos X no es fundamental para la identificación de elementos en la muestra y necesita ser identificado para diferenciarlos. La intensidad de este rayo es contribuida por múltiples factores tales como la corriente de la sonda, el voltaje de aceleración suministrado y el número atómico de la muestra. La radiografía característica obtenida

de la muestra, será registrada por el espectrómetro de dispersión de energía para la medición de la composición elemental (42).

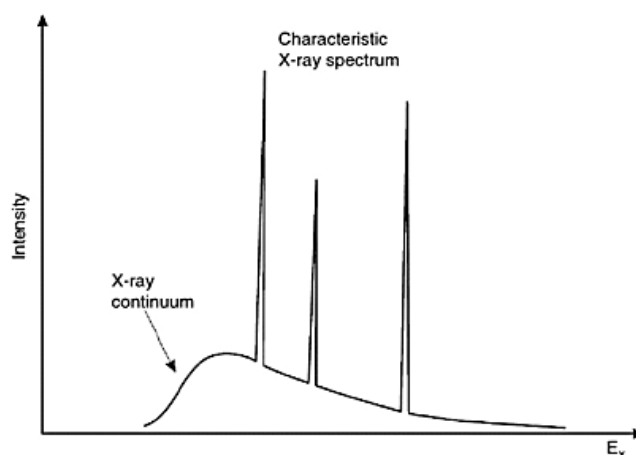


Figura 12. Representación de los tipos de espectro de rayos X emitidos tras el bombardeo de electrones rápidos (42).

1.10.4. Zetasizer

El equipo Zetasizer (Zsizer) actúa según las medidas de dispersión de luz gracias a su software acoplado.

Dicho equipo está dotado por un láser He/Ne de 4 mW que emite a 633 nm, lo que permite la medida del diámetro hidrodinámico en un amplio rango de temperaturas, hasta 120°C (43).

Las medidas de tamaños se realizan mediante el análisis de la retrodispersión de luz, ya que el detector está situado a un ángulo de 173° respecto al rayo incidente. El software de Malvern permite calcular la distribución de tamaños a partir de la función de autocorrelación (43).

Este dispositivo mide la intensidad dispersada por las moléculas en una muestra a lo largo del tiempo. Asume la esfericidad de las partículas y que las mismas partículas presentan movimiento browniano, esto se refiere a que las partículas se mueven debido a la fuerza termodinámica del propio disolvente y que no existe procesos que puedan causar el movimiento de las partículas, como precipitación, coagulación entre otros, relacionando la intensidad registrada por el detector a lo largo del tiempo con el tamaño de la partícula en movimiento (43).

1.11. Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría es empleada con el fin identificar átomos y moléculas, aprovechando que cada átomo tiene un espectro de absorción característico que puede ser modificado por su entorno.

La espectrofotometría es de gran interés debido a la existencia de los cromóforos, moléculas capaces de absorber energía procedente de radiaciones de la zona visible o ultravioleta del espectro electromagnético. La longitud de onda en la que se registra el valor de absorbancia máximo es característico y denota como λ_{max} (44).

1.12. FTIR

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica espectroscópica vibratoria que sondea las vibraciones moleculares. Los grupos funcionales pueden asociarse con bandas de absorción infrarrojas características, que corresponden a las vibraciones fundamentales de los grupos funcionales (45).

La espectroscopia infrarroja IR permite identificar grupos funcionales en muestras líquidas, sólidas, semisólidas, polvo o laminillas delgadas en regiones de 4000 a 400 cm^{-1} , este al contar con el accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) permitirá obtener el espectro infrarrojo de la muestra sin tratamiento previo (45).

La espectroscopia ATR-FTIR es la irradiación de muestras usando luz infrarroja (IR) para registrar vibraciones de enlaces moleculares entre las moléculas presentes en la muestra. Dado que cada muestra posee una composición diferente una a otra, ATR-FTIR registra una huella bioquímica de la muestra que se está estudiando.

Esto le da al equipo un potencial de diagnóstico y estudio amplio, desde diagnósticos in vitro rápidos hasta diagnósticos bioquímicos (46).

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1.MATERIALES

2.1.1. Muestras vegetales

- Cúrcuma (*Cúrcuma longa* L)
- Maíz Morado (*Zea mays* L.)
- Ratania (*Krameria lappacea*)
- Camu camu (*Myrciaria dubia*)
- Uña de gato (*Uncaria tomentosa*)

2.1.2. Reactivos químicos

- Etanol al 96 %
- Radical DPPH
- Trolox
- Ácido tetracloroáurico $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$
- Tri-sodio citrato dihidratado $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$
- Lactosa Grado Reactivo
- Ácido Lactobiónico Grado Reactivo
- Ácido Clorhídrico HCl al 35 %
- Ácido Nítrico HNO_3 al 65 %

2.1.3. Equipos

- Espectrofotómetro UV-VIS Cary 60.
- Zetasizer Nano ZS90.
- SEM (Modelo: ZEISS MA LS 10, Marca: Zeiss) y EDX (Detector de difracción de rayos "X").
- FTIR Cary 630, Transmission Cell Diamond ATR.
- Procesador ultrasónico Model CV 188, SERIAL 201502.
- Sonicador MRC DC- 200.
- Centrifugadora Rotofix 3 A.
- Estufa.
- Balanza.

2.1.4. Software

- Essential FTIR.
- Origin 2022 b.
- GraphPad Prism 9.

- Malvern- Zetasizer versión 2.2
- Microlab PC- FTIR versión B.05.03

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Evaluación y determinación del potencial reductor de los extractos vegetales

2.2.1.1. Preparación de extractos vegetales

Para la obtención de extractos vegetales de las 5 especies vegetales: Cúrcuma (*Cúrcuma longa L.*), Maíz Morado (*Zea mays L.*), Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*) y Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), como primer paso, se procedió a estabilizar las muestras vegetales cortada en trozos en una estufa a 40°C por una semana.

Como indica la **Figura 13**, pasados los 7 días de estabilización, se trituraron las muestras en un mortero de cerámica hasta obtener un polvo lo más fino posible. Seguidamente se pesó 1 g de la muestra triturada y se colocó en un tubo falcon de 15 mL con 3 mL de etanol al 96 %, a continuación, se llevaron las muestras a sonicación MRC DC- 200 H (40 kHz, sin temperatura) por 15 min y posteriormente a centrifugación a 4000 rpm por 15 min. Una vez terminado el proceso de extracción, se retiró el sobrenadante del tubo y se colocó en una fiola de 10 mL, se repitió el procedimiento 3 veces recolectando el sobrenadante en cada una de las repeticiones y se enrasó con etanol al 96% hasta completar el volumen (47, 48).



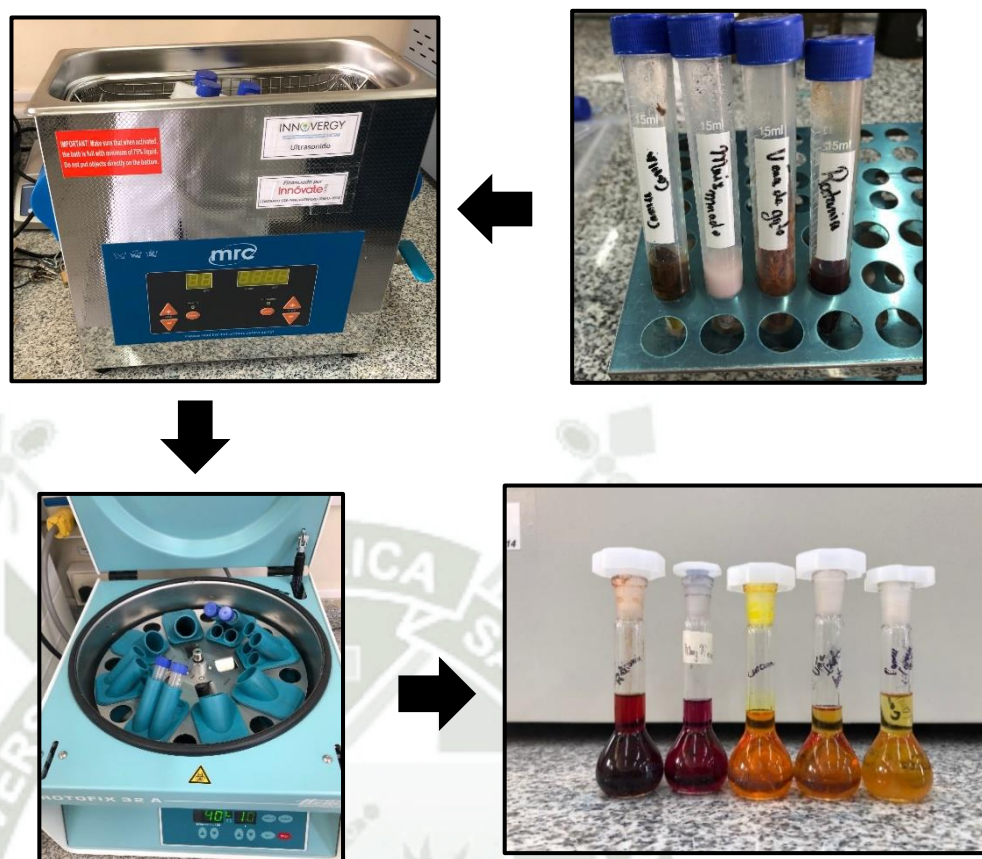


Figura 13. Esquema de preparación de extractos vegetales.

2.2.1.2. Preparación de soluciones stock de Trolox y DPPH.

a) Solución stock de Trolox

Se preparó una solución stock de trolox a $1598.1 \mu\text{M}$, por lo cual se pesaron 0.004 g de reactivo de Trolox y se enrasó en una fiola ámbar de 10 mL con etanol 96% . Como se observa en la **Tabla 1**, a partir de esta solución stock se prepararon estándares de $20\text{-}100 \mu\text{M}$ en fiolas de 2 mL

Tabla 1. Preparación de estándares de Trolox para radical DPPH

Estándar	Vol. Solución Stock de Trolox (μL)	Concentración (μM)
1	25	20
2	50	40
3	75	60
4	100	80
5	125	100

b) Radical DPPH

Se preparó una solución madre de DPPH a 300 μM para lo que se pesaron 0.003 g de DPPH y se enrasó a una fiola ámbar de 25 mL con etanol al 96 %.

2.2.1.3. Preparación de la curva de calibración de DPPH

Se prepararon 5 patrones en fiolas de 5 mL agregando 1.2 mL de estándares preparado a partir de la solución stock de trolox, 1.5 mL de radical DPPH y se enrasaron con etanol de 96% hasta llegar a 5 mL como se muestra en la **Tabla 2**, se dejó reposar en oscuridad por 30 min y luego se realizó la lectura de sus absorbancias a una longitud de onda de 515 nm en el espectrofotómetro, en la figura 14, se muestran las imágenes de las soluciones madre de trolox y DPPH, así como los estándares previo a la lectura.

Tabla 2. Preparación de la Curva de calibración de DPPH

Patrón	Concentración (μM)	Estándares Trolox (mL)	DPPH (mL)	Etanol (mL)
1	20	1.2	1.5	2.3
2	40	1.2	1.5	2.3
3	60	1.2	1.5	2.3
4	80	1.2	1.5	2.3
5	100	1.2	1.5	2.3
Blanco	-	-	1.5	3.5



Figura 14. Soluciones stock y estándares de Trolox tratados por DPPH

2.2.1.4. Capacidad antioxidante de extractos por método DPPH.

Se prepararon diluciones para cada uno de los extractos vegetales, para Camu camu, Maíz Morado, Uña de Gato y Cúrcuma fue 1 mL de extracto en 10 mL de etanol al 96% y para Ratania se empleó una dilución de 0.5 mL en 10 mL de etanol al 96%.

A partir de estas diluciones, se tomaron diferentes volúmenes para cada extracto, como indica la **Tabla 3**, se añadió 1.5 mL de radical DPPH y enrazó a 5 mL con etanol al 96 %, a continuación, todas las fiolas se llevaron a oscuridad por 30 min hasta su posterior lectura. Se analizaron las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

Tabla 3. Preparación de muestras de extractos vegetales para el análisis por DPPH

Nombre del extracto	Vol. de muestra (mL)	DPPH (mL)
Ratania	0.05	1.5
Camu camu	0.5	1.5
Maíz Morado	1	1.5
Cúrcuma	0.1	1.5
Uña de gato	0.025	1.5

En la **Figura 15**, se muestran los extractos vegetales diluidos según la **Tabla 3** con etanol al 96%, para el análisis de radical DPPH.



Figura 15. Diluciones preparadas a partir de los extractos iniciales de cada especie vegetal.

2.2.2. Síntesis verde de nanopartículas de oro.

Posterior a los análisis de capacidad antioxidante por el ensayo de radical DPPH, se escogieron los 3 extractos vegetales con mayor capacidad antioxidante para la síntesis de partículas de oro, estos fueron: Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*).

Para la síntesis de partículas es de suma importancia limpiar todo el material de vidrio y la barra magnética con agua regia (1 HNO_3 : 3 HCl), posteriormente enjuagarlo 3 veces con agua ultrapura y secar el material, esto con el fin evitar la agregación de partículas de oro residual y la nucleación no deseada durante los procedimientos de síntesis (49).

De igual forma, una vez sintetizadas las partículas se deben guardar en frascos ámbar o protegidos de la luz con el fin de minimizar la oxidación fotoinducida y preferentemente en refrigeración para disminuir la influencia del calor (49).

2.2.2.1. Prueba piloto síntesis de partículas.

Se preparó una solución madre de 0.001 M de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, pesando 0.020 g del reactivo y añadiendo 50 mL de agua ultrapura a temperatura ambiente en un beaker de 100 mL. Debido a que $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ es corrosivo al metal, se pesó en plástico.

También, se preparó una solución de Citrato de sodio al 38.8 mM pesando 0.1 g del reactivo y añadiendo 10 mL de agua ultrapura a temperatura ambiente, el citrato de sodio juega un rol fundamental en la síntesis de partículas, estabilizando las nanopartículas contra la agregación propiciando una fuerza repulsiva que controla el crecimiento de las nanopartículas e interfiere en el tamaño y forma geométrica final de las mismas (50).

Los extractos vegetales de Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), fueron empleados previa filtración simple.

Como se puede ver en la **Figura 17**, en un beaker de 50 mL, se colocaron 10 mL de la solución de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ agitándose a 250 rpm, se dejó agitando 1 minuto y se añadió 2 mL de citrato de sodio, se dejó pasar un minuto más y se añadió 5 mL de extracto fresco a la solución (50), posteriormente se dejó en agitación constante por hora y media. Los experimentos se realizaron en proporción 1:0.5.

También, se realizó un monitoreo del pH a lo largo de la reacción permaneciendo ácido, pH idóneo para la síntesis de partículas. Pasado el tiempo de reacción, se determinó el tamaño de partículas sintetizadas, así como el porcentaje poblacional de las mismas en mediante el equipo Zetasizer Nano ZS90, con el software de Malvern versión 2.2, **Figura 18**, estos análisis se realizaron a temperatura de 25 °C. Esta metodología se replicó para los tres extractos, respetando el orden de incorporación de cada uno de los elementos de reacción.

Como se observa en la **Figura 16**, el extracto vegetal el cual posee compuestos antioxidantes ricos en radicales OH, reducen los iones de oro (Au^{+3}) para convertirlos en átomos de oro neutro (Au^0). A medida que aumenta la población de estos átomos, la solución se sobresatura de estos y comienza a nuclear en forma de partículas nanométricas.

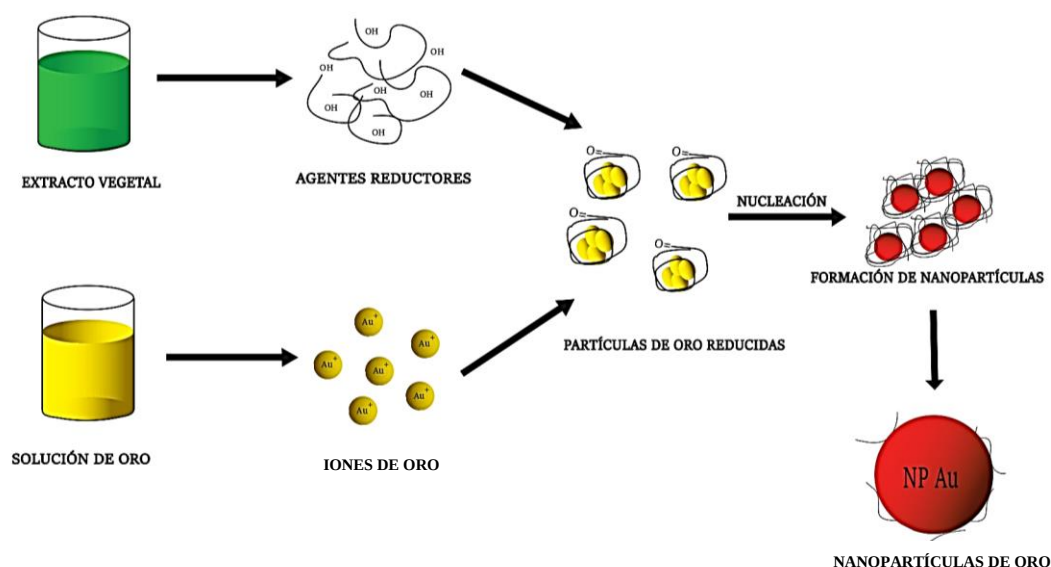


Figura 16. Esquema de síntesis verde de partículas por extractos vegetales.

(Elaboración Propia.)

Tabla 4. Prueba piloto síntesis de partículas de oro.

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	CONDICIONES EXPERIMENTALES
E.V. <i>Ratania</i>	5	2	22 °C/ pH 5
E.V. <i>Camu camu</i>	5	2	22°C/ pH 5
E.V. <i>Uña de gato</i>	5	2	22°C/ pH 5

E.V. Extracto vegetal.

xlvi

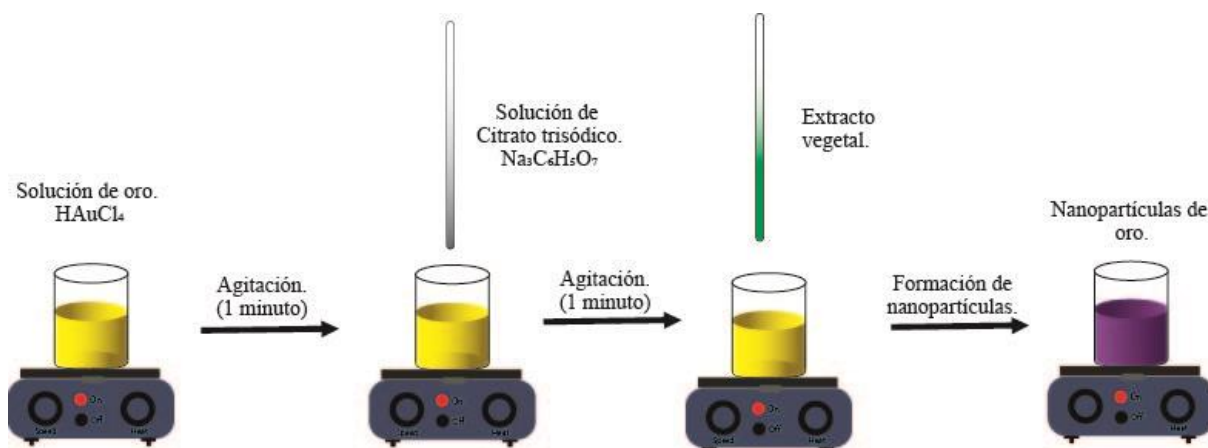


Figura 17. Esquema para la síntesis verde de partículas.

(Elaboración propia)



Figura 18. Imágenes equipo Zetasizer Nano ZS90.

2.2.2.2. Síntesis de partículas.

Se realizó análisis solo con extracto vegetal de *Ratania* (*Krameria lappacea*), debido a que fue el extracto con menor tamaño de partículas en la prueba piloto, para probar 4 parámetros experimentales.

Como se puede observar en la **Tabla 5**, se evaluaron factores de temperatura, incorporación y ausencia de citrato de sodio y dos volúmenes de extracto. Todo se preparó según las primeras pruebas

xlvi

experimentales en cuanto al tiempo de incorporación de cada elemento, así como también la solución de oro y la solución de citrato de sodio, dejando en agitación constante por dos horas.

Tabla 5. Síntesis de partículas de oro a partir extracto de *Ratania* (*Krameria lappacea*) con diferentes parámetros experimentales.

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	TEMPERATURA (°C)
E.V. Ratania	10	2	22
	5	2	22
	5	-----	22
	5	2	45

Con los resultados obtenidos en las pruebas anteriores se realizaron ensayos para los tres extractos, *Ratania* (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*). Como se muestra en la **Tabla 6**, se probaron volúmenes menores de extracto vegetal, con incorporación de citrato de sodio y a temperatura ambiente.

Tabla 6. Síntesis de partículas con extracto de *Ratania* (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*).

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	TEMPERATURA (°C)
E.V. Ratania	2.5	2	22
E.V. Uña de gato	1	2	22
E.V. Camu camu	2.5	2	22
	1	2	22

Con el fin de obtener mejores resultados en cuanto al tamaño de las muestras, estas fueron sometidas a ultrasonificación, empleando el Procesador ultrasónico Model CV 188, SERIAL 201502, **Figura 19**, con parámetros de 130 watt y 20 kHz por un periodo de tiempo de 3 minutos por muestra.



Figura 19. Procesador ultrasónico Model CV 188, SERIAL 201502)

2.2.2.3. Purificación de partículas de oro

Como se observa en la **Figura 20**, el procedimiento de purificación consistió en dos rounds de centrifugación a 6000 rpm x 20 min (50). Para el primer round, se colocó 15 mL de cada extracto en tubos falcon y se procedió a centrifugar según los parámetros indicados. Seguidamente se extrajo el sobrenadante en un nuevo tubo y se volvió a centrifugar, reservando el sedimento obtenido. Realizado esto, se incorporó agua ultrapura y se resuspendió el nuevo sedimento y se le añadió al primer sedimento obtenido, llevando al volumen inicial de tubo.

Para el segundo round, se procedió a centrifugar el sobrenadante resuspendido en su nuevo volumen, a las mismas condiciones de centrifugación. Realizado esto, se separó el sobrenadante en un nuevo tubo y se reservó el sedimento obtenido. Seguidamente el sobrenadante se volvió a centrifugar y separando el sobrenadante del nuevo sedimento y se resuspendió en agua ultrapura para unirse al sedimento anterior, para centrifugarse por última vez. En este último caso, se eliminó el sobrenadante y se dejó solo el sedimento en el tubo. Posteriormente, se añadió 3 mL de etanol y se llevó a ultrasonificación. Realizado el proceso de purificación las muestras fueron llevadas a lectura en el Zetasizer por última vez, con el fin de evaluar su estabilidad del tamaño de partículas posterior a dicho proceso.

1^{er} round de centrifugación de la síntesis fresca de NpAu.

2^{do} round de centrifugación de NpAu posterior al primer round de

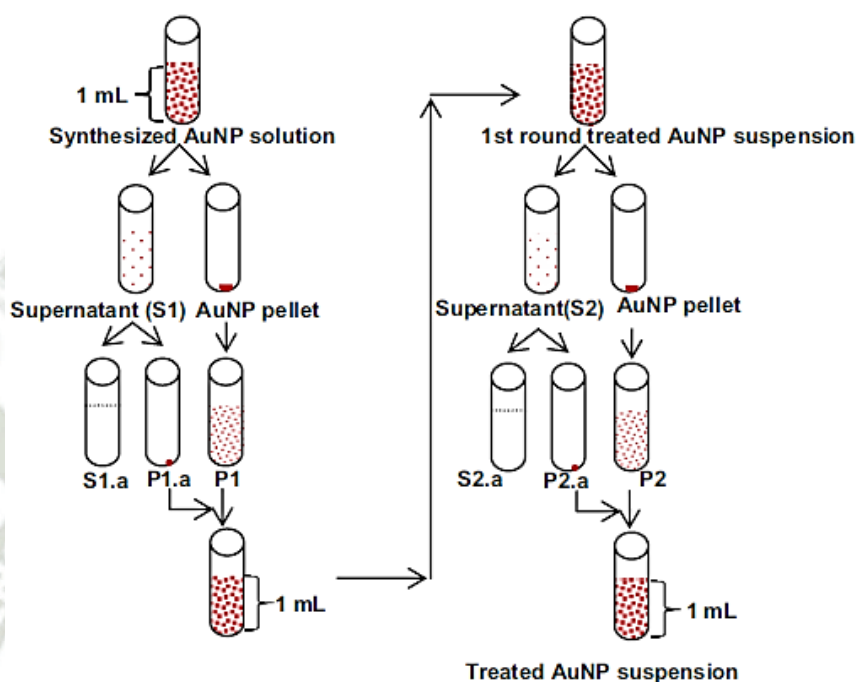


Figura 20. Esquema purificación de Nanopartículas (50)

Las nanopartículas de síntesis verde con menor tamaño y mayor estabilidad posterior al tratamiento de purificación, fueron llevadas a análisis posteriores con el objetivo de determinar su morfología y composición. De igual forma, se analizaron las partículas sintetizadas mediante espectrofotometría UV-Vis, empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en el rango de temperatura de 20 a 24°C a una longitud de onda de 400 a 800 nm.

2.2.3. Análisis morfológico y composicional en SEM y EDX

Para el análisis morfológico las muestras se llevaron secas en sólido, (Modelo: ZEISS MA LS 10, Marca: Zeiss) y EDX (Detector de difracción de rayos "X"). El análisis por SEM se realizó a 20 kV, con magnificación de 326 X resolución y EDX con una resolución de 133 eV.

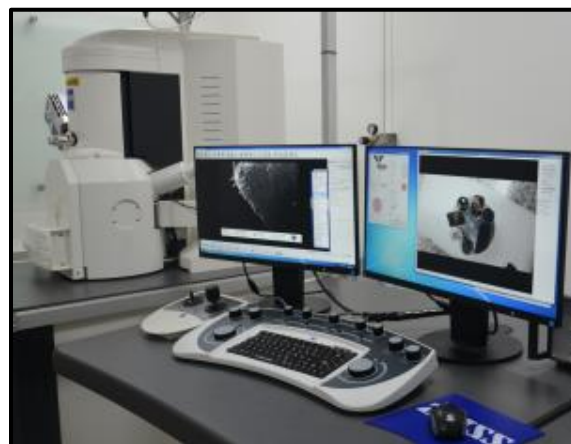


Figura 21. Imágenes equipo SEM- UCSM.

Fuente: Portal UCSM.

2.2.3.1. Secado de partículas para obtención de ácido lactobiónico

Las partículas fueron secadas durante dos días en una estufa a 40°C en moldes de silicona, hasta obtener una biopelícula brillante delgada, a continuación, con una espátula de plástico se procedió a raspar el inferior del contenedor y el polvo se almacena en tubos eppendorf limpios hasta su utilización.



Figura 22. Secado de partículas en estufa a 40°C.

2.2.4. Producción de ácido lactobiónico a partir de lactosa

Para determinar la cantidad de lactosa para los experimentos de producción de ácido lactobiónico, se utilizó como referencia los resultados obtenidos en el informe de ensayo de lactosuero dulce.

La determinación de lactosa se obtuvo por el método de Bertrand, basado en la determinación de cantidad de Cu_2O formado, empleando una disolución ácida de $Fe_2(SO_4)_3$ y posterior valoración con $KMnO_4$ (51).

El resultado fue 58,28 mg/mL de lactosa en la muestra, sin embargo, para el procedimiento experimental se utilizó un aproximado de 50 mg/mL, empleándose esta concentración en todos los análisis de producción de ácido lactobiónico y calculándose la cantidad de gramos de lactosa empleadas en el ensayo a partir de este.

Se preparó una solución madre de lactosa con 5 g de lactosa grado reactivo con 100 mL de agua ultrapura, las variables constantes fueron pH 9 en lactosa y agitación permanente a 250 rpm durante 3 horas, las variables a estudiar fueron cantidad de partículas en mg y temperatura a 60 °C o sin temperatura como se indica en la **Tabla 7**.

En un frasco, se incorporó 20 mL de solución de lactosa a pH 9 y se añadió la cantidad de nanopartículas secas, para los ensayos con temperatura esta fue controlada con un termómetro de mercurio.

Posterior al procedimiento experimental, se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se llevaron a cuantificar por FTIR-ATR (Cary 630 con ATR de punta de diamante). Se adquirieron un total de 32 espectros por muestra con 32 scans por espectro, con una resolución espectral de 4 cm^{-1} en el intervalo espectral de 4000 a 650 cm^{-1} . Los espectros medidos se registraron y pretrataron con el Software MicroLab PC.

Posteriormente se realizó el análisis de rendimiento entre la lactosa y el ácido lactobiónico producido.

Tabla 7. Parámetros empleados para la producción de ácido lactobiónico a partir de lactosa.

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD DE PARTICULA (mg)	TEMPERATURA (°C)	pH	AGITACIÓN (rpm)
Np Au Camu camu	10 mg	60	9	250
		-----	9	250
	5 mg	60	9	250
		-----	9	250
	2.5 mg	60	9	250
		-----	9	250

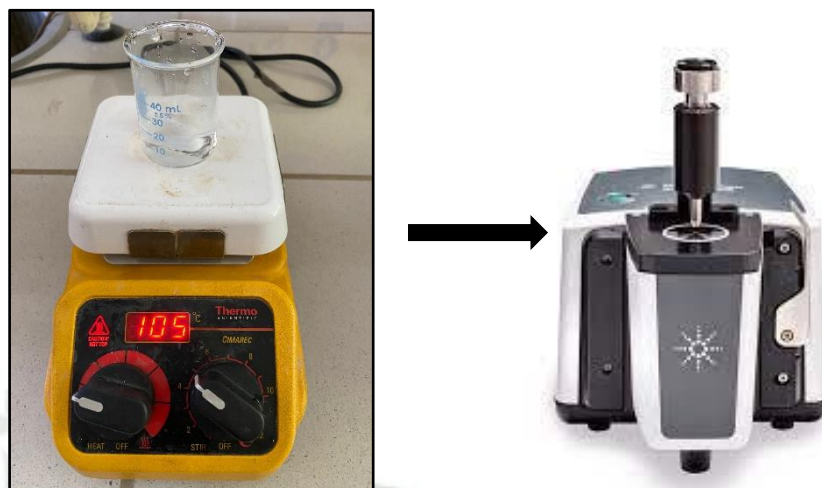


Figura 23. Producción de ácido lactobiónico a partir de partículas de oro y Equipo FTIR-ART.

2.2.5. Curva de calibración ácido lactobiónico.

Para evaluar la concentración en g/L de los experimentos realizados, se preparó una curva de calibración con diferentes pesos conocidos de ácido lactobiónico grado reactivo, con el fin de caracterizar el espectro IR obtenido con el equipo FTIR-ATR al aumentar la concentración del mismo.

Tabla 8. Curva de Calibración ácido lactobiónico.

Estándares	Peso de estándar (mg)	Concentración de estándar (g/L)
1	8	16
2	10.8	21.6
3	13.6	27.2
4	16.4	32.8
5	19.2	38.4

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Determinación de la capacidad antioxidante para las 5 especies vegetales.

Se preparó las soluciones de reactivos y los estándares de calibración como lo describe el apartado 2.2.1.3., cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Calibración del método de DPPH con estándares de Trolox.

Patrón	Concentraciones (uM)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	St. Des
1	20	1.161	1.151	1.156	1.156	0.0050
2	40	0.996	0.989	0.9925	0.993	0.0035
3	60	0.894	0.886	0.89	0.890	0.0040
4	80	0.753	0.745	0.749	0.749	0.0040
5	100	0.589	0.578	0.5835	0.584	0.0055

A partir de estos valores de concentración y absorbancia promedio se realizó una curva de calibración presentada en la **Figura 24**.

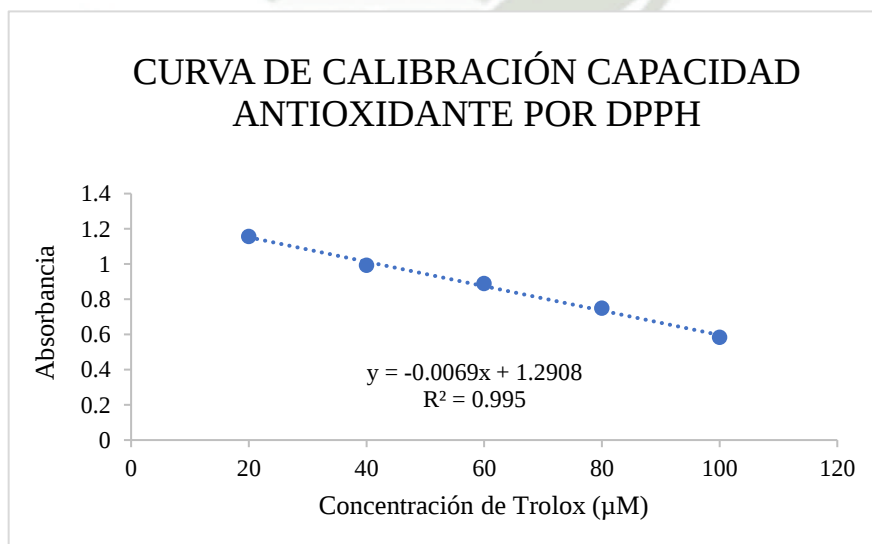


Figura 24. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método DPPH.

Posteriormente se trataron las muestras de los extractos vegetales obtenidos Cúrcuma (*Cúrcuma longa* L), Maíz Morado (*Zea mays* L.), Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*) y Uña de gato (*Uncaria tomentosa*, como describe el apartado 2.2.1.4. De este modo se obtuvo lecturas de absorbancia y se interpoló la concentración de trolox utilizando la ecuación de regresión lineal presentada en la **Figura 24**. Los datos se presentan en la **Tabla 10**. En la **Figura 25**, se muestran los cambios de color sobre las muestras en estudio.



Figura 25. Muestras de extractos vegetales posterior al tratamiento con DPPH.

Tabla 10. Capacidad antioxidante de muestras de extractos vegetales por el método DPPH.

Muestra	Abs 1	Abs 2	Abs3	Promedio	Abs 100%	St. Des	Concentración M de trolox/ 100 g de extracto seco
Ratania	1.0827	1.0822	1.08245	1.08245	1.6293	0.00025	15.6491
Camu camu	0.6809	0.6828	0.68185	0.68185	1.6293	0.00095	2.0538
Maíz Morado	0.8859	0.8894	0.88765	0.88765	1.6293	0.00175	0.8060
Cúrcuma	1.1637	1.1682	1.16595	1.16595	1.6293	0.00225	1.7930
Uña de gato	0.6218	0.6209	0.62135	0.62135	1.6293	0.00045	48.4097

En la **Figura 26**, se compara la concentración en M de Trolox/ 100 g de extracto seco de los extractos de Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), Maíz Morado (*Zea mays L.*) y Cúrcuma (*Cúrcuma Longa L.*).

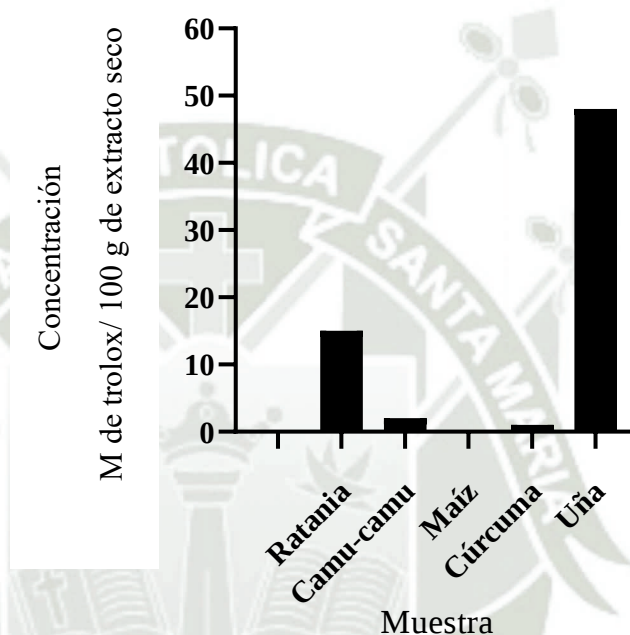


Figura 26. Poder reductor de las especies vegetales.

Se realizó un análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de DPPH de los estándares respecto a la concentración (Ver **tabla 11**), considerando 100 % al blanco de Absorbancia 1.6293.

Tabla 11. Inhibición del radical DPPH para patrones de Trolox.

Concentración (μM)	%Inhibición DPPH
20	29.05
40	39.08
60	45.38
80	54.03

100

64.19

A partir de esta concentración y el porcentaje de inhibición del radical DPPH de los estándares de Trolox, se realizó el grafico de calibración, presentado en la **Figura 27**.

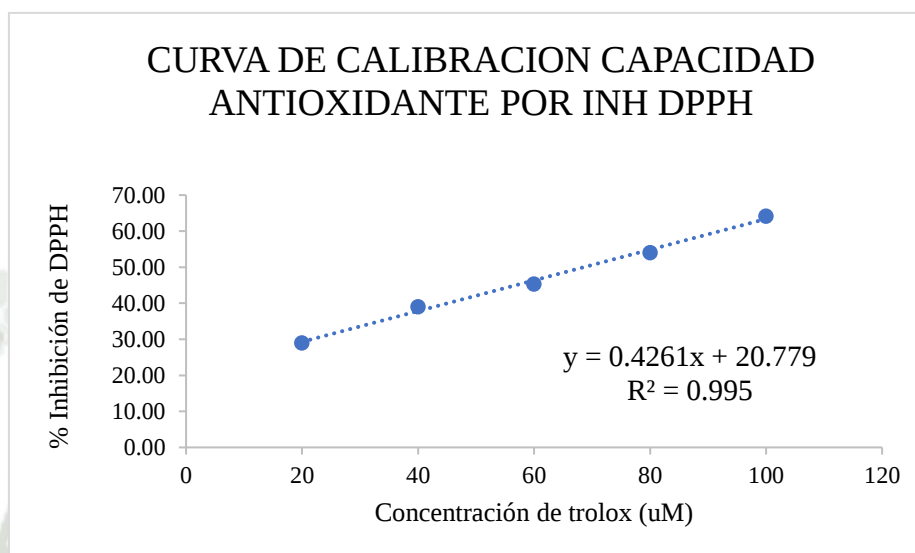


Figura 27. Curva de calibración para la capacidad antioxidante por inhibición de DPPH.

Utilizando la ecuación lineal de la **Figura 27**, se interpoló la concentración de trolox de las muestras de extracto a porcentaje de inhibición del radical DPPH, presentados en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Capacidad antioxidante de extractos vegetales por el método DPPH

Muestra	% Inhibición DPPH
Ratania	35.79
Camu camu	6.05
Maíz Morado	4.92
Cúrcuma	3.12
Uña de gato	65.04

3.2. Síntesis de partículas a partir de los extractos con mayor capacidad antioxidante.

Para la prueba piloto se prepararon ensayos relación de solución de oro y extracto de 1:0.5, es decir 10 mL de solución de oro y 5 mL de extracto, las muestras fueron analizadas por el equipo Zetasizer, como se muestra en la **Tabla 13**.

A la hora y media de iniciada la síntesis se pudo observar cambio de coloración para los 3 ensayos piloto, por el cual se pudo comprobar que los extractos vegetales en estudio permitían la síntesis de partículas, sin embargo, su tamaño era mayor al indicado según bibliografía como nanopartículas. Las medidas obtenidas de partículas fueron 288.9 nm, 499.5 nm, 881.5 nm correspondientes a Ratania, Camu camu y Uña de gato respectivamente. A raíz de estos resultados se decidió probar distintos parámetros sobre el extracto con menor tamaño de partícula y determinar que parámetro se podía manejar en los siguientes experimentos.

Tabla 13. Prueba piloto con extractos de Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*).

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	CONDICIONES EXP.	TAMAÑO DE PARTICULAS (nm)
E.V. Ratania	5	2	22 °C/ pH 5	288.9 población 99.3% 22.46 población de 0.7 %
E.V. Camu camu	5	2	22 °C/ pH 5	499.5 población 96.4% 111.9 población de 3.6 %
E.V. Uña de Gato	5	2	22 °C/ pH 5	881.5 población de 94.5% 54.23 población de 5.5%

Las siguientes pruebas se realizaron con la utilización del extracto de Ratania, que rindió el menor tamaño de partículas, obteniéndose posterior a los experimentos solo dos lecturas en Zsizer de los 4 experimentos realizados. Como se puede ver en la **Tabla 14**, los experimentos realizados sin citrato de

sodio y con temperatura, precipitaron, indicando una fallida síntesis de nanopartículas, esto es debido a que la temperatura pudo ocasionar perdida en los componentes reductores del extracto, desestabilizando el proceso de síntesis, de igual forma parece ser que la ausencia de citrato de sodio como estabilizador de la reacción produce agregaciones no deseadas sobre la síntesis, haciendo precipitar las partículas de oro que poseen mayor tamaño, en consecuencia generando la turbidez de la muestra, esta no pudo ser leída en el Zetasizer, descartándose así estas dos variables.

También como se pueden ver en la **Tabla 14**, al aumentar el volumen del extracto, las partículas sintetizadas aumentan en consecuencia de tamaño de la partícula, deduciendo así que, al aumentar la cantidad usada de extracto, este se halla en exceso en la reacción, aumentando el tamaño y cambiando las características de las partículas.

Tabla 14. Primera prueba preliminar con extracto de *Ratania* (*Krameria lappacea*).

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	CONDICIONES EXP.	TAMAÑO PARTICULA (nm)	TAMAÑO PARTICULA POST-SONICACIÓN (nm)
E.V. Ratania	5	2	22 °C/ pH 5	302	229.5
	10	2	22 °C/ pH 5	1081	1454
	5	----	22 °C/ pH 5	PRECIPITADO NO LECTURA	PRECIPITADO NO LECTURA
	5	2	45°C/ pH 5	PRECIPITADO NO LECTURA	PRECIPITADO NO LECTURA

Como se observa en la **Figura 28**, los ensayos sin citrato y con temperatura a 45°C precipitaron, indicando una fallida síntesis de nanopartículas, lo que no se permitió realizarse una lectura de tamaño en Zsizer para estos ensayos, descartando estas variables.



5 mL Ratania s/ citrato sin temperatura



5 mL Ratania c/citrato c/ temperatura 45°C

Figura 28. Resultados primera ronda experimental.

En consecuencia, a los resultados presentados en la **Tabla 14**, se planteó trabajar con los tres extractos de Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*) y Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), disminuyendo el volumen del extracto en la reacción, incorporando citrato y descartando temperatura. Los nuevos ensayos se plantearon en relación 1: 0.25 y 1:01, es decir 2.5 mL y 1 mL de extractos, como se muestra en la **Tabla 15**.

Para estos nuevos ensayos se obtuvieron resultados aceptables en cuanto al tamaño de partículas, obteniendo los mejores resultados a 1 mL de extracto, siendo, el tamaño registrado de 101.4 nm para Ratania, 229.6 nm para Uña de gato y 110.2 nm para Camu camu.

Con el fin de obtener valores dentro del rango considerado como nanopartícula, estas fueron sometidas a ultrasonificación siguiendo los parámetros mencionados en el apartado 2.2.2.2, y realizando una nueva lectura en el Zetasizer, disminuyendo notablemente el tamaño de las nanopartículas, siendo en este punto de 77.03 nm para las producidas con E.V. de Ratania, 166.5 nm para las producidas con E.V. de Uña de gato y 107.3 nm para las producidas con E.V. de Camu camu, en un porcentaje población significativo, como se muestra en la **Tabla 15**.

Cabe resaltar que el análisis para 2.5 mL de Uña de gato, no pudo ser leído a pesar de los intentos, concluyéndose que esto era debido al tamaño de las nanopartículas, posiblemente demasiado grandes para que sean leídas por el equipo.

Tabla 15. Pruebas de síntesis de partículas sin ultrasonificación y con ultrasonificación.

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	CONDICIONES EXP.	TAMAÑO PARTICULAS (nm)	TAMAÑO PARTICULA POST ULTRASONIFICACIÓN (nm)
E. V. Ratania	2.5	2	22 °C/ pH 5	159.4 población 100%	125 población 99.5%
	1	2	22 °C/ pH 5	101.4 población 100%	77.03 población 98.6%
E.V. Uña de gato	2.5	2	22°C/ pH 5	SIN RESULTADOS	SIN RESULTADOS
	1	2	22°C/ pH 5	229.6 población 100%	166.5 población 100%
E.V. Camu camu	1	2	22°C/ pH 5	110.2 población 99.3% y 16.79 población 0.7%	107.3 población 98.6 %

Size (d.nm) **% Intensity:** **St Dev (d.nm)**
Z-Average (d.nm): 77.36 **Peak 1:** 107.3 100.0 50.72
Pdl: 0.279 **Peak 2:** 0.000 0.0 0.000
Intercept: 0.910 **Peak 3:** 0.000 0.0 0.000
Result quality Good

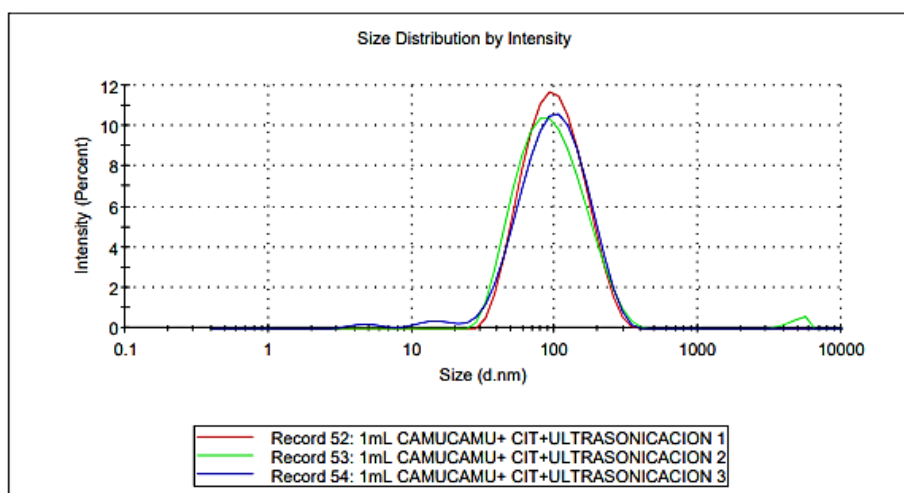


Figura 29. Informe de distribución de tallas por intensidad E.V. Camu camu.

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 63.41	Peak 1: 76.94	100.0	32.18
Pdl: 0.228	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.952	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

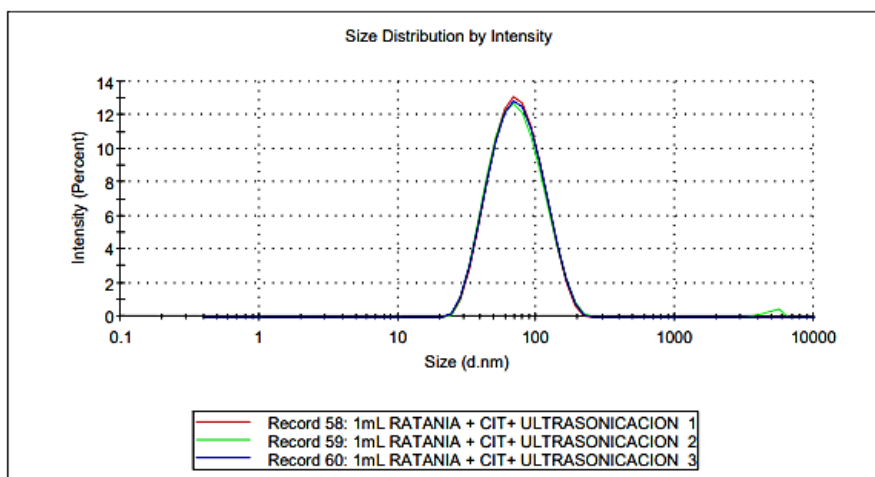


Figura 30. Informe de distribución de tallas por intensidad E.V. Ratania.

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 154.9	Peak 1: 166.7	100.0	45.00
Pdl: 0.050	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.925	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

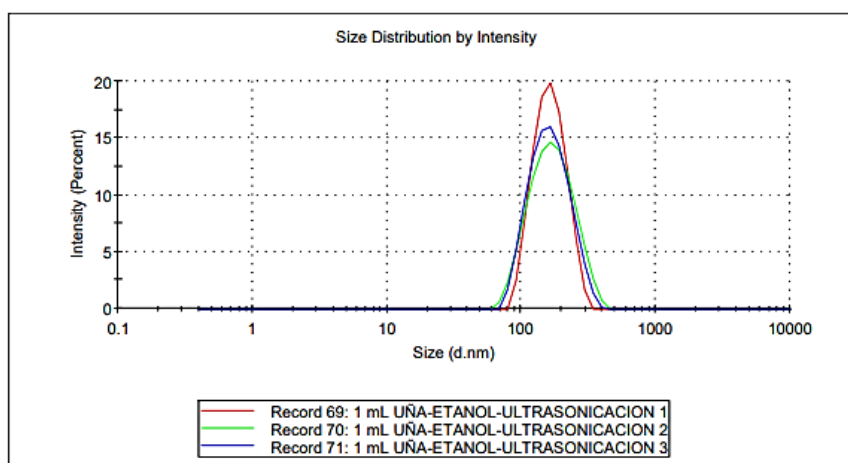


Figura 31. Informe de distribución de tallas por intensidad E.V. Uña de gato.

Posteriormente a esta prueba y comprobando la síntesis de nanopartículas, se procedió a purificarlas y ultrasonicarlas, seguidamente se llevaron a lectura en Zetasizer, para evaluar su estabilidad posterior a este tratamiento.

Como se muestra en la **Tabla 16.**, las nanopartículas de E.V. Ratania que poseía el menor tamaño de partículas con 77.03 nm en una población uniforme del 100%, posterior al proceso de purificación aumentaba significativamente y se dividió en dos poblaciones una de 45.15 nm en un 54.6% y 285.2 nm en un 45.4%. Las nanopartículas obtenidas por Uña de gato se mantuvieron relativamente estable, sin embargo, su tamaño no disminuyó posterior a los procesos de ultrasonificación por lo que fue descartada con Ratania, deduciendo de esta forma que las mejores partículas, más estables y con mejor tamaño eran las de Camu camu obteniéndose posterior al proceso de purificación una población significativa de 125 nm con una población del 91.2%.

Tabla 16. Síntesis de partículas posterior al proceso de purificación.

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	CITRATO DE SODIO (mL)	CONDICIONES EXP.	TAMAÑO PARTICULAS (nm) ULTRASONIFICACIÓN	TAMAÑO PARTICULAS POST-PURIFICACIÓN (nm)
E.V. Ratania	1	2	22 °C/ pH 5	77.03 población 98.6%	45.15 población 54.6% 285.2 nm población 45.4%
E.V. Uña de gato	1	2	22°C/ pH 5	166.5 población 100%	170.9 población 100%
E.V. Camu camu	1	2	22°C/ pH 5	107.3 población 98.6 %	125 población 91.2% 9.028 nm población del 8%

A continuación, se adjuntan imágenes de los distintos colores para las partículas sintetizadas con cada uno de los extractos vegetales, como se puede observar a pesar de los colores intensos de los extractos, el color de síntesis que produce es totalmente diferente, pudiéndose observar el cambio de coloración desde el primer contacto entre el extracto vegetal (agente reductor) con la solución de oro (agente precursor), como se observan en **Figura 32.**

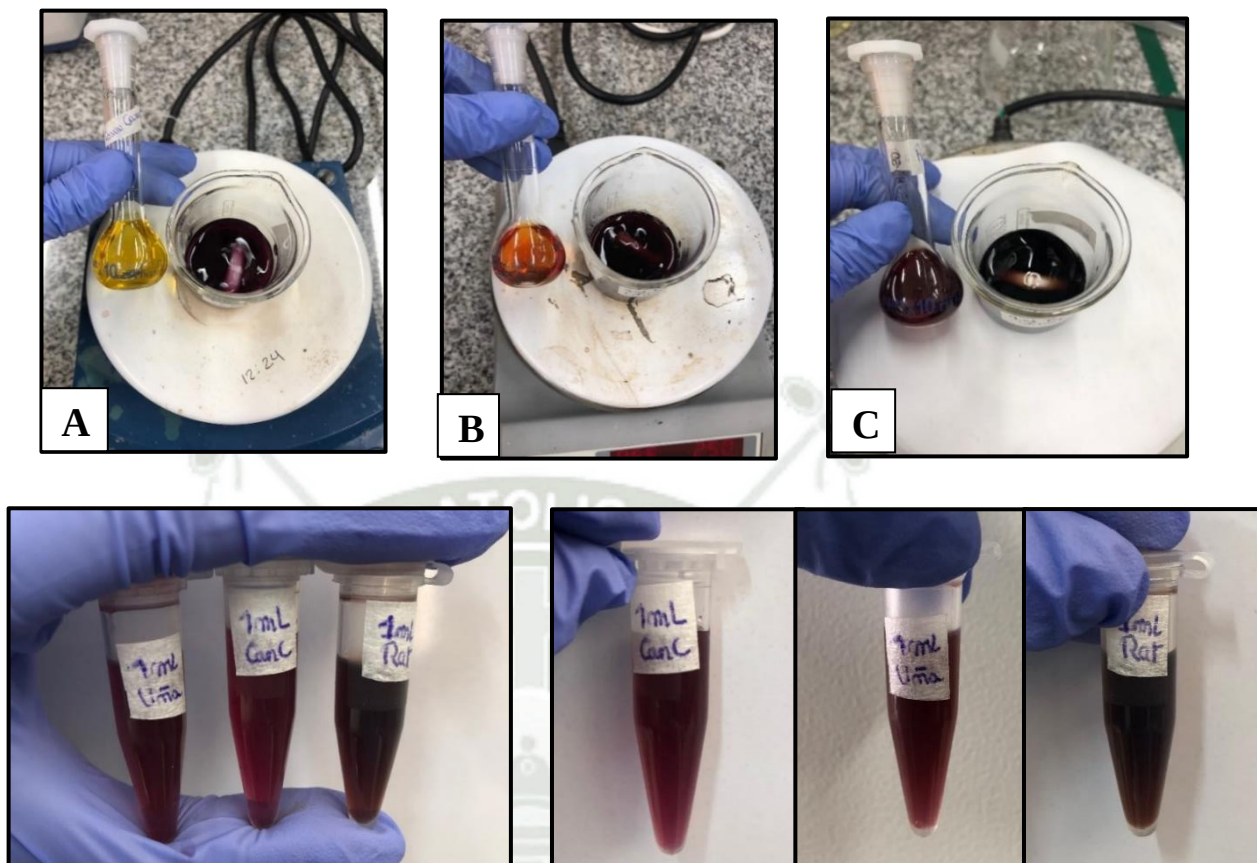


Figura 32. Imágenes de partículas sintetizadas líquidas con 1mL de cada extracto vegetal A) Camu camu (*Myrciaria dubia*), B) Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y C) Ratania (*Krameria lappacea*).

3.3. Análisis morfológico y composicional de nanopartículas de oro producidas por extractos vegetales con mayor capacidad antioxidante.

Dado que las nanopartículas producidas a partir de E.V. de Camu Camu, presentaron características de tamaño nanométrico y estabilidad posterior a la purificación, se procedió a realizar distintas pruebas de caracterización empezando por evaluar el espectro UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas.

El color purpura obtenido posterior a la mezcla de E.V. de Camu camu (*Myrciaria dubia*) con una solución de oro fueron el primer indicio para confirmar la formación de nanopartículas de oro. Las soluciones coloidales fueron escaneadas con espectroscopia UV-Vis mostrandose el espectro en la (**Figura 33**). Se observó la aparición de una fuerte banda en la longitud de onda de 538 nm correspondiente al pico de absorción de nanopartículas metálicas de oro (52).

Este fenómeno es consecuencia de las propiedades ópticas de las partículas metálicas y es conocido por el nombre de “Resonancia de plasmón de superficie localizada” o por sus siglas en inglés (LSPR) esto es debido a la excitación de plasmones de superficie de las nanoestructuras metálicas. Al aplicar luz sobre las nanoestructuras se produce una oscilación colectiva de electrones en la banda de conducción de las nanopartículas de oro en resonancia con una longitud de onda específica de luz incidente. La LSPR de nanopartículas de oro da como resultado una fuerte banda de absorción en la región visible de los 500-600 nm, que se puede medir por espectroscopia UV-Vis. Esta longitud de onda se puede relacionar también con el tamaño de las nanopartículas y su morfología, siendo entre más grande y con forma más irregular una banda de absorción más cercana a los 600 nm en la región del rojo.

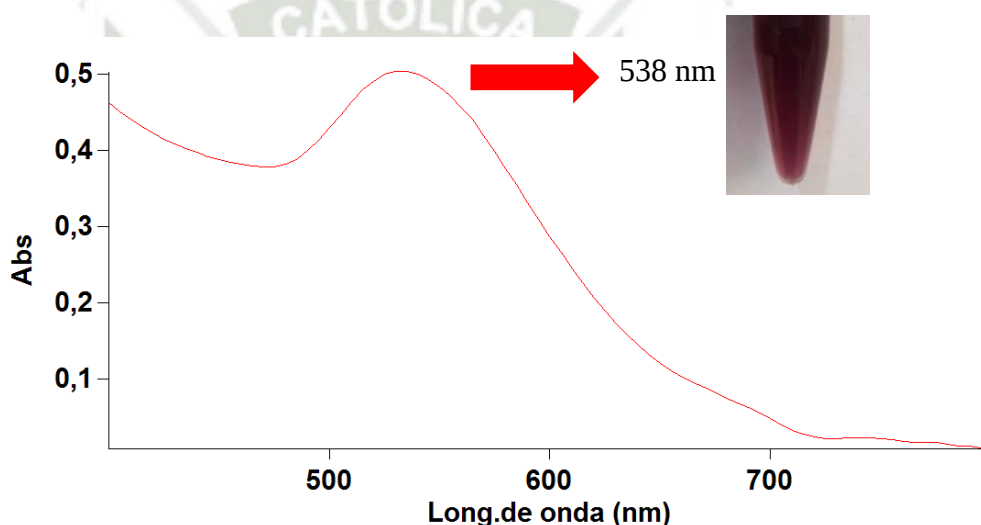


Figura 33. Espectro UV- Vis nanopartículas de oro con extracto de Camu camu (*Myrciaria dubia*)

En la **Figura 34**, se estudiaron los espectros FTIR de E.V. de Camu camu, E.V. de Ratania y E.V. de Uña de gato respectivamente. En donde la primera señal aparece a números de onda que van desde 3500 a 3200 cm^{-1} . Estas señales corresponden a la vibración característica de grupos funcionales OH presentes en alcoholes y fenoles, la banda más ancha se observa en el E.V. de Camu camu, deduciéndose así que hay mayor tensión de O-H en los compuestos químicos que lo integran (53, 54). Se evidencia la presencia de enlaces N-H a números de onda que van desde 2960 a 2961 cm^{-1} correspondientes a aminas, presentes en los tres espectros estudiados.

La presencia de alquenos se evidencia con señales características de dobles enlaces entre C=C que van de 1680 a 1600 cm^{-1} números de onda propio de cetonas, de igual forma presente en los 3 extractos. Se puede observar en los

tres espectros de extractos la presencia de un estiramiento ligero pero representativo ubicado a los 2143-2047 cm^{-1} , no pudo ser identificada.

Los tres espectros mostraron bandas con enlaces C-O a números de onda de 1030 cm^{-1} , demostrando presencia de anillos bencénicos. También, para el E.V. de Uña de gato y Ratania se muestra una tensión en los 781 cm^{-1} números de onda, correspondiente a alcanos. También se muestran flexiones en los E.V. de Ratania y Uña de gato espectros desde los 1416 y 828 cm^{-1} fuera del plano propias de alquenos.

La presencia de enlaces tales como C=C, C-H y O-H son relacionados con la presencia de flavonoides, terpenoides y compuestos de base proteica para los tres extractos

Tabla 17. Grupos funcionales de los espectros IR de E.V. de Camu camu, Ratania y Uña de gato.

Número de onda	Tipo de vibración	Interpretación
3500-3298	Estiramiento O-H	Alcoholes y fenoles
2915	Estiramiento N-H	Aminas
1610-1629	Estiramiento C=C	Alquenos, cetonas
1416	Estiramiento C-H	Alquenos
1030	Estiramiento C-O	Cetonas, anillos bencénicos
780	Tensión de C-H	Alcanos
828	Flexión C=C	Alquenos
2115	-----	No pudo ser identificada

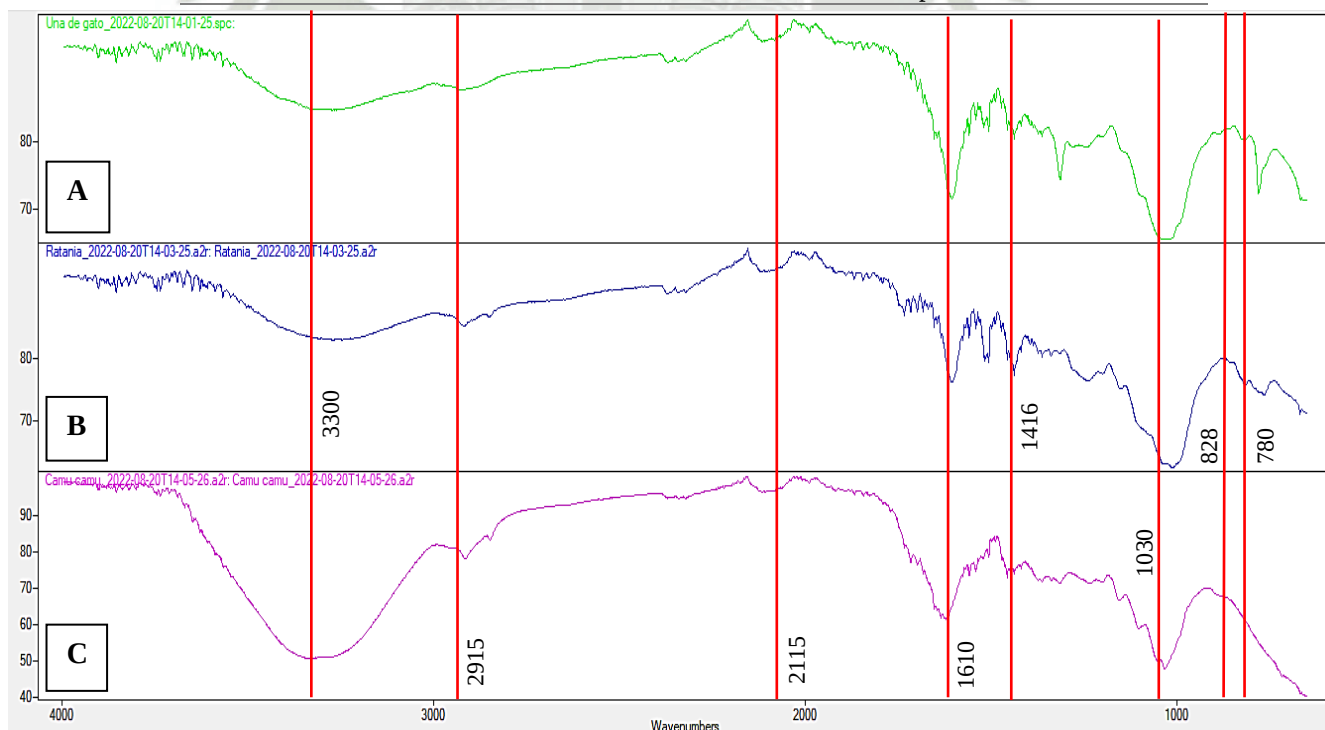


Figura 34. Espectro FTIR de A) Uña de gato (*Uncaria tomentosa*), B) Ratania (*Krameria lappacea*) y C) Camu camu (*Myrciaria dubia*).

Debido a la naturaleza de las partículas al secarlas hubo problemas de aglomeración en todas las muestras al analizarse en SEM, sin embargo, como se pueden apreciar en la **Figura 35**, las nanopartículas de Camu camu presentan una estructura cristalina con formas geométricas entre cuadrados y triángulos con bordes lisos. También, se puede ver que no distingue diferencias entre los tonos de grises en las imágenes, lo cual está indicando una composición relativamente homogénea para el límite de detección del equipo.

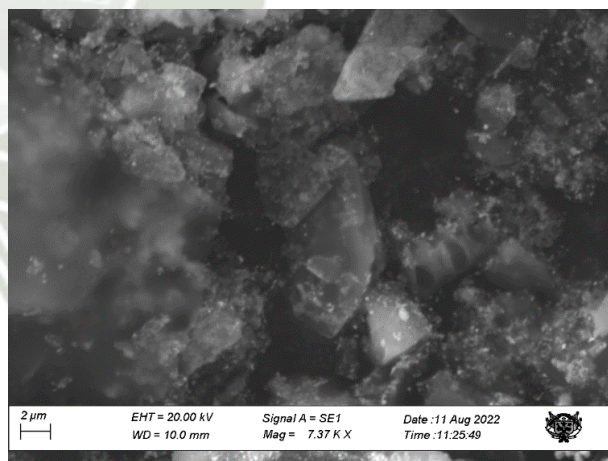
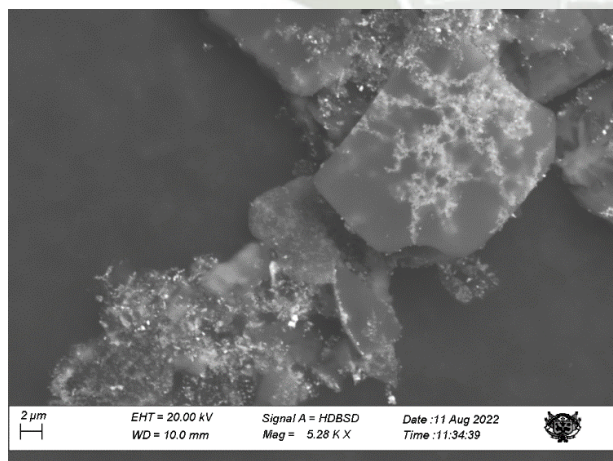
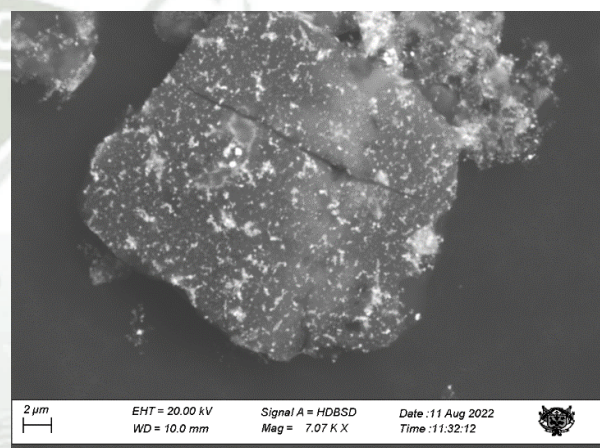
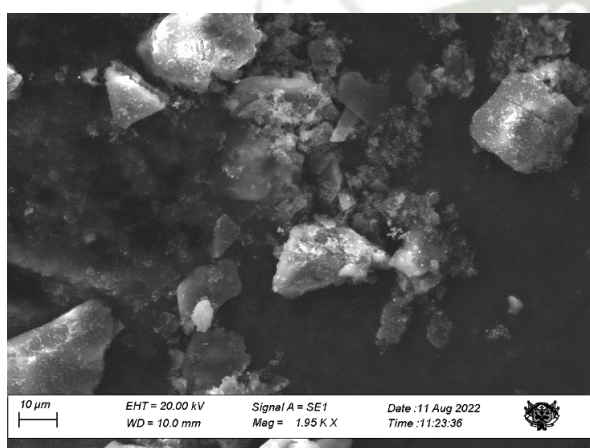


Figura 35. Imágenes SEM de partículas de Camu camu (*Myrciaria dubia*)

Para el caso de partículas de Uña de gato, como se observa en la **Figura 29**, no se pueden observar estructuras finas o regulares en las imágenes, de igual forma, por la superficie

de la muestra se pueden ver aglomeraciones gigantes a lo largo de la imagen, al igual que múltiples manchas de diferentes escalas de gris, indicando una composición heterogénea, también se puede observar porosidad en la superficie de la muestra.

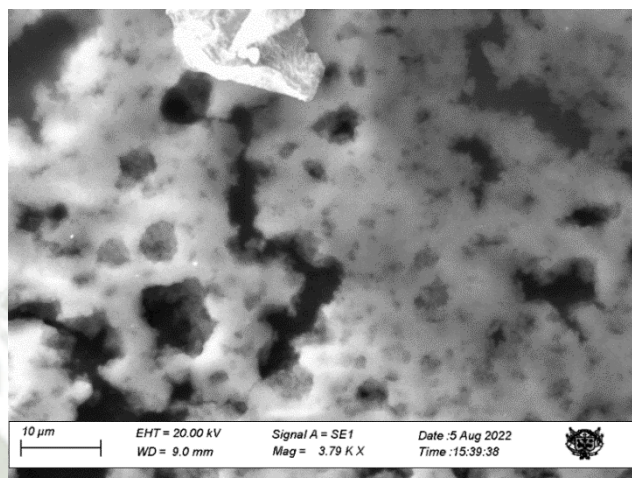


Figura 36. Imágenes SEM de partículas Uña de gato (*Uncaria tomentosa*)

Por medio de la microscopía de barrido electrónico y el detector EDX se calculó la composición porcentual promedio de cada uno de los elementos presentes en la muestra, siendo en este caso las nanopartículas de oro a partir de extracto de Camu camu (*Myrciaria dubia*). Como se observa en la **Figura 37**, los rayos fueron emitidos sobre la mayor cantidad de nanopartículas posibles, estos puntos se ubican en forma de círculos rojos en la imagen del lado derecho.

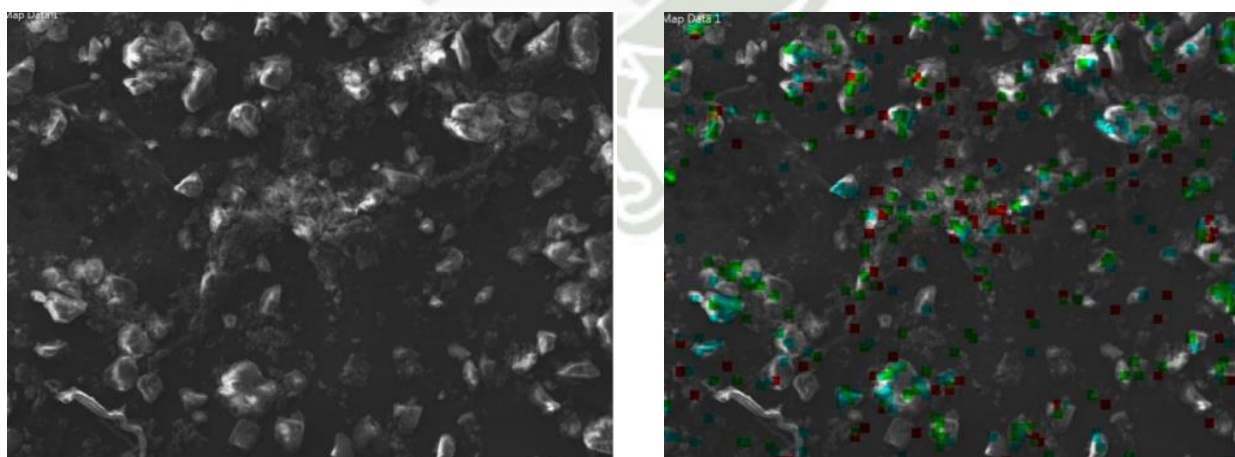


Figura 37. Imágenes EDX Nanopartículas Camu camu (*Myrciaria dubia*)

Como se ve en la **Figura 38**, la intensidad de un pico de oro notable el cual confirma la presencia de oro en la composición elemental de las partículas analizadas pudiéndose finalmente confirmar la naturaleza de las partículas sintetizadas.

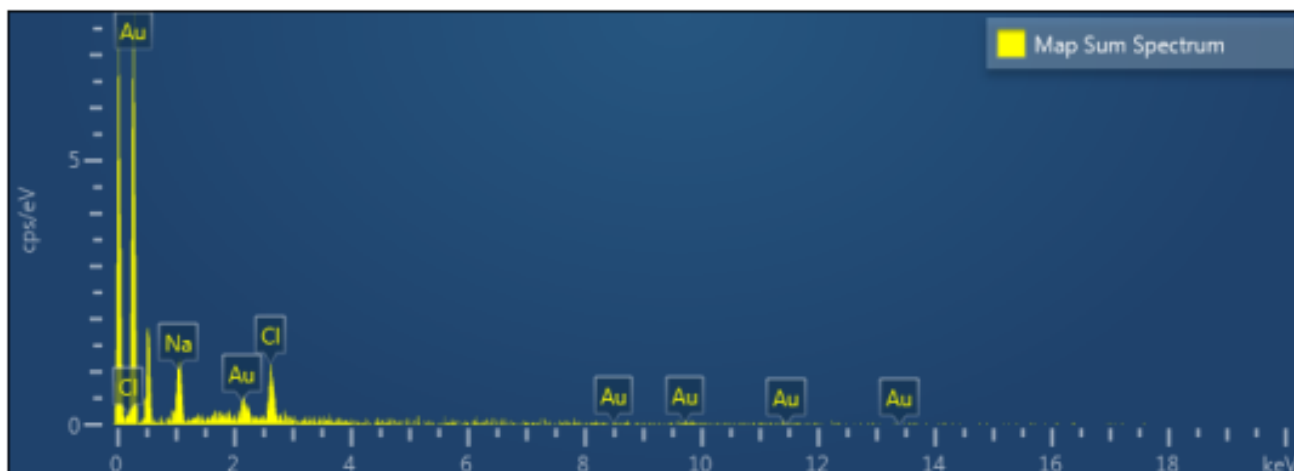


Figura 38. Analisis elemental de NpAu Camu camu (*Myrciaria dubia*)

Tabla 18. Tabla composicional de NpAu Camu camu (*Myrciaria dubia*)

Map Sum Spectrum		
Element	Line Type	Weight %
Au	M series	31.47
Na	K series	34.69
Cl	K series	33.84
Total		100.00

3.4.Caracterización de ácido lactobiónico.

3.4.1. Grafica de calibración ácido lactobiónico.

En la **Figura 39 y Tabla 19**, se comparan los espectros IR de lactosa y ácido lactobiónico, en estos se observa la similitud de los espectros en cuando a algunas bandas propias de sus estructuras como la presencia de una banda con gran intensidad propia del radical -OH entre los 3700-3500 cm^{-1} , sin embargo, se determinó que ácido lactobiónico posee una tensión fuerte propia del enlace C=O en los 1720-1730 cm^{-1} , perteneciente al radical -COOH (ácido carboxílico) en su composición química.

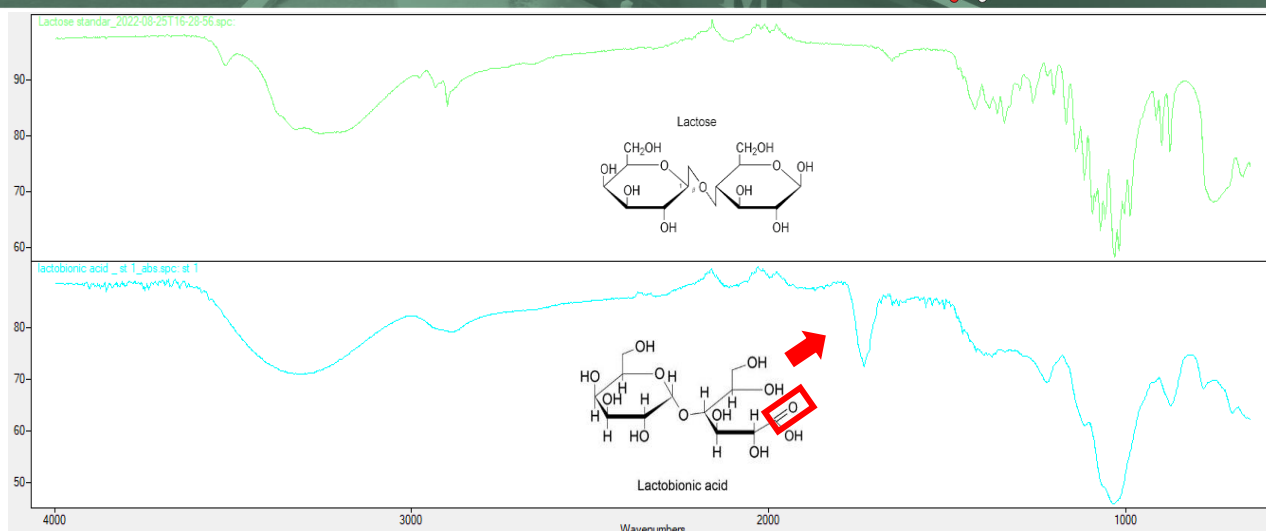


Figura 39. Comparación de espectros FTIR de lactosa y ácido lactobiónico.

Tabla 19. Tabla resumen de flexiones presentes en ácido lactobiónico y lactosa.

Absorción (cm-1)	Apariencia	Grupo	Clasificación de compuestos	Comentarios
1729	Fuerte	C=O	Ácido carboxílico	Presencia en ácido lactobiónico
3550-3200	Fuerte y amplia	O-H	Alcohol	Presencia en ácido lactobiónico y lactosa

Una vez lograda la caracterización de la lactosa y el ácido lactobiónico, se precedió preparar una curva de calibración del método para la determinación de LBA por FTIR, para esto se evaluó distintas cantidades de ácido lactobiónico, que ayudarían a determinar la cantidad de ácido lactobiónico g/L, obtenidos posterior a los ensayos con nanopartículas oro sobre la lactosa en solución por FTIR.

Como se puede observar en la **Figura 40**, al aumentar la concentración de ácido lactobiónico el pico representativo del compuesto, del enlace C=O ubicado a los 1729 cm⁻¹, aumenta significativamente su área, viendo en la **Figura 40**, de mayor concentración a menor concentración de ácido lactobiónico.

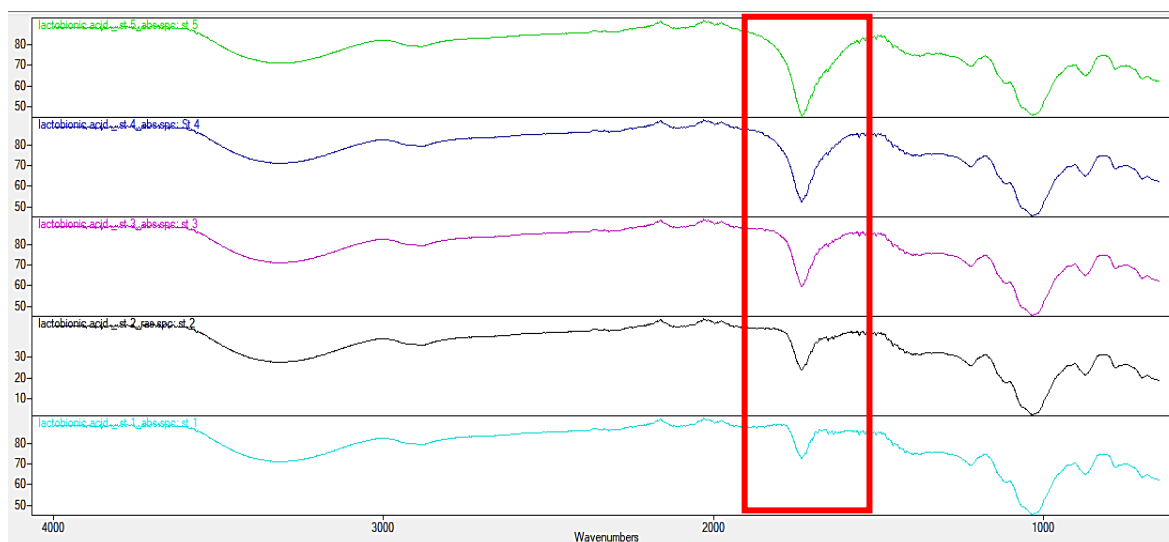


Figura 40. Espectro FTIR de ácido lactobiónico obtenidas en la curva de calibración.

Como se muestra en la **Figura 41** y la **Tabla 20**, se registraron las áreas obtenidas para cada estándar por triplicado. A partir de las concentraciones de áreas bajo pico promedio de los estándares, se realizó un gráfico de calibración para LBA.

En la **Figura 41**, se puede observar las concentraciones estudiadas guardan relación con un aumento en el valor del área obtenida para cada extracto.

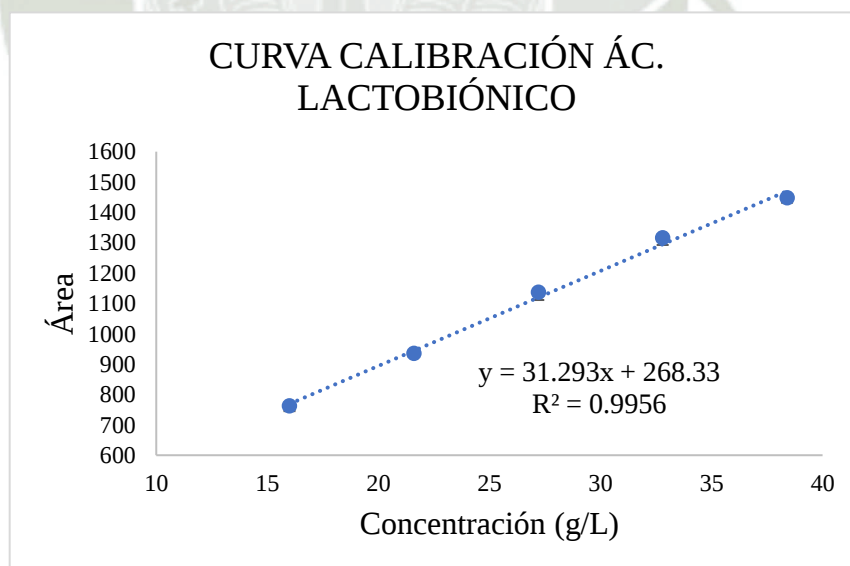


Figura 41. Curva de calibración ácido lactobiónico.

Peso de estándar (mg)	Concentración de estándar (g/L)	I	II	III	Promedio	Desv. Estándar	CV
8	16	745.0956	778.0114	762.1526	761.7532	16.4615	2.16
10.8	21.6	926.445	931.3179	949.0317	935.5982	11.8861	1.27
13.6	27.2	1139.2074	1160.1378	1110.0527	1136.46597	25.1548	2.21
16.4	32.8	1307.9068	1341.838	1297.6485	1315.79777	23.1274	1.76
19.2	38.4	1453.6497	1429.9257	1459.9767	1447.8507	15.8426	1.09

Tabla 20. Lectura área de la curva de calibración del ácido lactobiónico.

3.5. Producción de ácido lactobiónico.

Todos los ensayos de producción de ácido lactobiónico, fueron analizados por FTIR, con el fin de determinar la cantidad de ácido lactobiónico producidas por las nanopartículas de oro sintetizadas, relacionando las concentraciones conocidas con las nuevas concentraciones obtenidas a partir de los experimentos.

Se obtuvo producción de ácido lactobiónico con nanopartículas de oro en todos los ensayos. Con estos datos se procedió a realizar el análisis estadístico con el fin de obtener los mejores parámetros para la obtención de ácido lactobiónico.

Tabla 21. Resultados de la producción de ácido lactobiónico a partir de cantidad de nanopartículas en (mg)

Cod. Ensayo	Partículas (mg)	Cond. Exp T(°C)	I	II	III	Promedio	Desv. Estándar	Concentración (g/L)
A	Np Au 2.5	----	638.7572	648.1834	641.3435	642.7614	4.8704	11.9653
B	Np Au 2.5	60°C	795.9753	759.7621	782.8544	779.5306	18.3340	16.3359
C	Np Au 5	----	836.7549	841.6523	828.9733	835.7935	6.3939	18.1339
D	Np Au 5	60°C	952.8641	961.6462	949.7582	954.7562	6.1657	21.9355
E	Np Au 10	----	970.3623	967.9367	971.6534	969.9841	1.8870	22.4221
F	Np Au 10	60°C	976.2767	976.2763	981.2367	977.9299	2.8638	22.6760

También se realizó un análisis del rendimiento para cada uno de los ensayos, como indica la **Tabla 22**, y **Figura 42**, en los cuales se obtuvieron mejores porcentajes de rendimiento en cuanto a ácido lactobiónico sobre la matriz de lactosa, al aumentar la cantidad en mg de nanopartículas de oro.

Ecuación para obtener el porcentaje de rendimiento:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Concentración de LBA}}{\text{Concentración de Lactosa}} \times 100$$

LBA: Ácido lactobiónico.

Tabla 22. Rendimiento ácido lactobiónico para cada ensayo con nanopartículas de oro por E.V. de Camu camu.

Cod. Ensayo	Partículas (mg)	Cond. Exp T (°C)	Concentración (g/L) Lactosa	Concentración LBA (g/L)	Rendimiento %
A	Np Au 2.5	22	50	11.9653	23.93
B	Np Au 2.5	60	50	16.3359	32.67
C	Np Au 5	22	50	18.1339	36.26
D	Np Au 5	60	50	21.9355	43.87
E	Np Au 10	22	50	22.4221	44.84
F	Np Au 10	60	50	22.6760	45.35

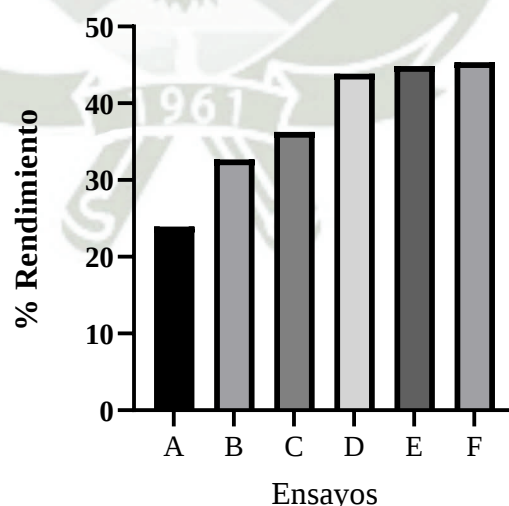


Figura 42. Porcentaje de rendimiento de ácido lactobiónico por ensayo experimental.

Los análisis estadísticos se realizaron en un ANOVA de 2 vías sobre datos de la **Tabla 23** y **Tabla 24**, los cuales nos permiten estudiar como influyen por si solas cada uno de nuestras variables, como son la temperatura (20°C y 45°C) y cantidad de nanoparticulas en mg (2.5 mg, 5 mg, 10 mg). Dicho análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism 9.

Tabla 23. Áreas obtenidas tras las lecturas en FTIR por cada secuencia de experimentos.

Temperatura °C	2.5 mg	5 mg	10 mg
20	638.7572	836.7549	970.3623
	648.1834	841.6523	967.9367
	641.3435	828.9733	971.6534
60	795.9753	952.8641	976.2767
	759.7621	961.6462	976.2763
	782.8544	949.7582	981.2367

Tabla 24. Concentraciones en g/L de LBA por cada secuencia de experimentos.

Temperatura °C	2.5 mg	5 mg	10 mg
20	11.84	18.16	22.43
	12.14	18.32	22.36
	11.92	17.92	22.48
60	16.86	21.87	22.62
	15.70	22.16	22.62
	16.44	21.78	22.78

Los resultados del análisis ANOVA se pueden observar en la **Tabla 25**, en el cual el valor de F es mayor que el valor de F crítico por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que admite que existe diferencia significativa en todos los grupos experimentales.

Tabla 25. Análisis ANOVA en 2 vías.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
AuNPs (mg)	35.50	1	35.50	462.97	5.9×10^{-11}	4.75
Temperatura	222.95	2	111.48	1453.85	4.8×10^{-15}	3.89
Interacción (AuNPs*T)	14.93	2	7.46	97.35	3.8×10^{-8}	3.89
Dentro del grupo	0.92	12	0.08			
Total	274.30	17				

Para comprobar estos datos se expresaron las áreas debajo de las bandas en FTIR por cada experimento como se muestra en la **Figura 43**, en los cuales se puede observar que efectivamente todos los experimentos presentan diferencia en cuanto sus resultados, aumentando el área al aumentar la cantidad de nanopartículas empleadas y la temperatura, sin embargo, en los últimos 3 experimentos D, E y F la diferencia es considerablemente menor por lo que es menos apreciable en la gráfica. Esto nos lleva a concluir que a partir del experimento D (5 mg de Np Au con temperatura a 60°C) incluso si se aumenta la cantidad de nanopartículas en mg y la temperatura, no aumentará significativamente la concentración de LBA (g/L). Siendo las condiciones experimentales del ensayo D, el mejor sistema de producción en la reacción producida por las Np Au sobre la lactosa para la obtención LBA.

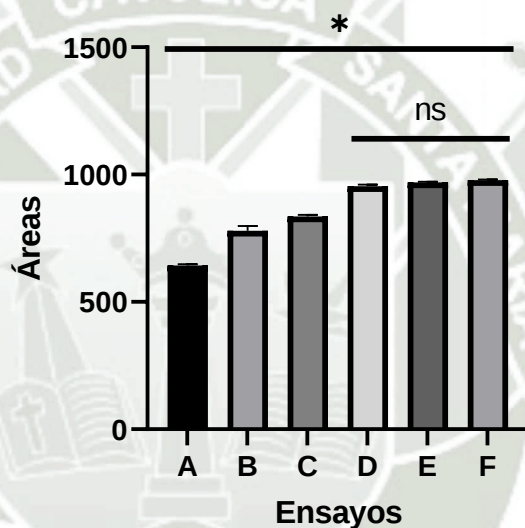


Figura 43. Relación entre las áreas y los ensayos realizados

CAPITULO IV

4.1. CONCLUSIONES

- PRIMERA. Se evaluaron 5 especies vegetales endémicas del Perú mediante el ensayo de radical DPPH sobre Cúrcuma (*Cúrcuma longa L.*), Maíz Morado (*Zea mays L.*), Ratania (*Krameria lappacea*), Camu camu (*Myrciaria dubia*) y Uña de gato (*Uncaria tomentosa*). Se escogieron las 3 especies vegetales con mayor potencial antioxidante, las cuales fueron Ratania, Camu camu y Uña de gato, con valores de concentración de M de trolox/ 100 g de extracto seco de 15.6491, 48.4097 y 2.0538 respectivamente.
- SEGUNDA. Se pudo sintetizar catalizadores de oro con la utilización de los 3 extractos vegetales como agentes reductores. Sin embargo, solo se obtuvieron partículas en nanoescala con el uso del E.V. de Ratania (*Krameria lappacea*) y Camu camu (*Myrciaria dubia*) alcanzando nanopartículas de tamaño de 77.03 nm y 107.3 nm respectivamente. Además, el citrato de sodio, cumplió un papel importante en la síntesis de partículas, siendo el estabilizante idóneo para la reacción de nuestros extractos reductores sobre la solución de oro.
- TERCERA. Las nanopartículas obtenidas con el E.V. de Camu camu como agente reductor, fueron caracterizadas obteniendo 31.47 % de oro en su composición, con un pico característico de absorbancia a 538 nm y con una morfología con superficie poco porosa y lisa.
- CUARTA. Se obtuvo ácido lactobiónico (LBA) a partir de lactosa mediante el empleo de las NpAu, sintetizadas con el E.V. de Camu camu (*Myrciaria dubia*), determinándose que las mejores condiciones experimentales se lograron con 5 mg de nanopartícula a 60°C con 43,87 % de rendimiento de la producción de ácido lactobiónico.

REFERENCIA

1. Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza A. Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. Acta Toxicol. Argent. 2013, 21(2): 102-109. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v21n2/v21n2a05.pdf>
2. Torres A. Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de oro y plata mediante el uso de plantas endémicas de Ecuador. Tesis Pregrado. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador. 2016. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/17109>
3. Usman A, Aziz A, Noqta O. Application of green synthesis of gold nanoparticles : a review. Jurnal Teknologi. 2018 (81) : 171-182. Disponible en : <https://journals.utm.my/jurnalteknologi/article/view/11409>
4. Chirinos R, Pedreschi R, Rogez H, Larondelle Y, Campos D. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medical properties from the Peruvian Andean region. Industrial Crops and Products. 2013(47) :145-152. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669013001052>
5. Gutiérrez L, Hamoudi S, Belkacemi K. Lactobionic acid : A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. International Dairy Journal. 2012 (26) : 103-111. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694612001173>
6. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander L, Muller R. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications [Internet]. Chem. Rev. 2008 [Citado 31 julio 2022], 108 : 2064-2110. Disponible en : <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr068445e>
7. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles : Properties, applications and toxicities [Internet]. Arabian Journal of chemistry. 2019,12 : 908-931. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217300990>
8. Ijaz I, Gilani E, Nazir A, Bukhari A. Detail review on chemica, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles [Internet]. Green chemistry letters and reviews. 2020, 13(3) :223-245. Disponible en :

- <https://www.tandfonline.com/doi/epub/10.1080/17518253.2020.1802517?needAccess=true>
9. Jain S, Hirst D, O'Sullivan M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy [Internet]. The British Institute of Radiology. 2014, 85(1010). Disponible en :
<https://www.birpublications.org/doi/10.1259/bjr/59448833>
 10. Salcido M. Fabricación y Caracterización de un material compuesto basado en nano-catalizadores metálicos (Au) soportados en una matriz cerámica (SiO_2 nanoestructurado), y la evaluación de sus propiedades catalíticas. Tesis Pregrado. Universidad de Sonora. Mexico. 2011. Disponible en:
<http://repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/1096/1/salcidomonteeverdemanuelalejandrol.pdf>
 11. Daruich C, Ribeire B, Rostelato M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction [Internet]. Journal of Alloys and Compounds. 2019,798 :714-740. Disponible en :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092583881931833X>
 12. Renner H, Schlamp G, Hollmann D, Lüscho H, Tews P, Rothaut J, Dermann K, Knödler A, Hecht C, Shlott M et al. (2000) Gold, Gold Alloys, and Gold Compounds [Internet] Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Disponible en:
https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2F14356007.a12_499
 13. Purushothaman C, Thalla D. Synthesis of Inorganic Nanomaterials [Internet]. Elsevier, 2018 [citado 6 agosto 2022]. Disponible en :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B97800810197570000757>
 14. Zhao P, Li N, Astruc D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. [Internet] Coord Chem Rev. 2013 [citado 11 agosto 2022], 257 (3-4), 638 :665. Disponible en :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010854512002305>
 15. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin D, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. [Internet] Chem Soc Chem Commun. 1994 [citado 11 agosto 2022], 7 :801-802. Disponible en :
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1994/c3/c39940000801>

16. Chen S, Yang Y. Magneto-electrochemistry of Gold Nanoparticle Quantized Capacitance Charging [Internet]. Coordination Chemistry Reviews. 2002 [citado 11 agosto 2022], 124(19), 5280-5281. Disponible en : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja025897%2B>
17. Herizchi R, Abbasi E, Milani M, Akbarzadeh A. Current methods for synthesis of gold nanoparticles [Internet]. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology. 2016 [citado 11 agosto 2022], 44(2), 596-602. Disponible en : <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/21691401.2014.971807>
18. Gomez M. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. Repertorio de Medicina y Cirugía. 2018, 27(2): 75-80. Disponible en: <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/191/173>
19. Teimuri-Mofrad R, Hadi R, Tahmasebi B, Farhoudian, Mehravar M, Nasiri R. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extract: Mini-review. Nanochem Res. 2017,2(1): 8-19. Disponible en: http://www.nanochemres.org/article_41809_0459dd0a9899e1e499149a333a10ee8a.pdf
20. Propagación in situ de *ratania-Krameria lappacea ameriaceae*: factores limitantes de la propagación natural y efectos de resiembra. Rev. peru biol. 2018, (25): . Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332018000100004
21. Carini M, Aldini G, Orioli M, Maffei R. Antioxidant and photoprotective activity of a lipophilic extract containing neolignans from *Krameria triandra* roots. Planta Med. 2002, 68(3) : 193-197. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11914952/>
22. Arellano- Acuña E, Rojas I, Paucar-Menacho L. Camu Camu (*Myrciaria dubia*): Fruta tropical de excelentes propiedades funcionales que ayudan a mejorar la calidad de vida. Scientia Agropecuaria. 2016, 7(4): 433-443. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172016000500008
23. Lopez M. Uña de gato. Elsevier. 2006,25(10). Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-una-gato-13095508>
24. Clapé O., Castillo A. Avances en la caracterización farmacotóxica de la planta medicinal *Curcuma longa* Linn. MEDISAN. 2012, 16(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000100013

25. Medina A, Narro L, Chávez A. Cultivo de maíz morado (*Zea mays L.*) en zona altoandina de Perú: Adaptación e identificación de cultivares de alto rendimiento y contenido de antocianina. *Scientia Agropecuaria*. 2020, 11(3): 291-299. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172020000300291&script=sci_arttext
26. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed*. 2011, 50:586–621. Disponible en :
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21226137/>
27. Cheynier V. Phenolic compounds : from plants to foods. [Internet]. *Phytochemistry Reviews*. [Citado el 16 agosto 2022]. 2012, 11:153-177. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-012-9242-8>
28. Dai J, Mumper R. Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties [Internet]. *Molecules*, 2010 [citado 7 agosto 2022]. Disponible en :
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20966876/>
29. Ugartondo Vanessa (2009) “Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares.” Universidad de Barcelona, España
30. Antolovich M, Prenzle P, Patsalides E, et al. Methods for testing antioxidant activity.. *Analyst*. 2002, 127(1) :183-198. Disponible en :
https://www.researchgate.net/publication/11533760_Methods_for_testing_antioxidant_activity
31. Gómez A, Gómez M, Román D, Segura A, Fernández A. “Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41(4):1220-1234. Disponible en :
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=D73792C0851F9A970A543070DE46B680?doi=10.1.1.379.6033&rep=rep1&type=pdf>
32. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006, 494:161-172. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000100008

33. González I. Radicales libres, Algunas consideraciones clínicas. Gac Méd Caracas. 2006, 114. Disponible en:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622006000200001
34. Vega K. “Actividad antioxidante y antibacteriana determinadas en extractos metanólicos obtenidos desde partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus* (Juss) Moldenke.” [Tesis de pregrado] Universidad de Concepción. Chile. 2019.
<http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/3529/6/Vega%20Belmar%2C%20Katherine.pdf>
35. Gutierrez L. Production of lactobionic acid by oxidation of lactose over gold catalysis supported on mesoporous silicas- Reaction optimization and purification process proposal. Université Laval. 2013. Disponible en :
<https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/24183/1/29991.pdf>
36. Pezzotti F, Therisod M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. Carbohydr Res 2006 ;341 : 2290–2. Disponible en :
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16806132/>
37. Alonso S, Rendueles M, Díaz M. Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. Biotechnol Adv. 2013. Disponible en :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975013000815>
38. Gutierrez L. Production of lactobionic acid by oxidation of lactose over gold catalysis supported on mesoporous silicas- Reaction optimization and purification process proposal. Université Laval. 2013.
Disponible en :
<https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/24183/1/29991.pdf>
39. Yu R, Van Scott E. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. Journal of Cosmetic Dermatology. 2004 (3):76-87. Disponible en :
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1473-2130.2004.00059.x>
40. Sarenkova I, Ciprovica I. The current status and future perspectives of lactobionic acid production : A review. Food Science. 2018(1) : 233-239. Disponible en :
https://llufb.llu.lv/conference/Research-for-Rural-Development/2018/LatviaResRuralDev_24th_2018_vol1-233-239.pdf
41. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Rev elementos.2012, 133-146. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5085347>

42. Mutalib M, Rahman M, Othman M, Ismail A, Jaafar J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy. [Internet]. Membrane Characterization. 2017, 161-179. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444637765000097>

43. Collado M. Caracterización de Nanoestructuras de Quitosano, Fibroína de Seda y Oro como Liberadores de Fármacos. Tesis Doctora. Universidad de Murcia. España. 2017. Disponible en: <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/56705/1/Mar%C3%ADa%20del%20Mar%20Collado%20Gonz%C3%A1lez%20Tesis%20Doctoral.pdf>

44. Berthomieu C, Hienerwadel R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Photosynthesis Research. 2009, 101: 157-170. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11120-009-9439-x>

45. Nasser K, Ali S, Qazi J. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics : a systematic review of the approach using bio-fluids. Applied Spectroscopy Reviews. 2021, 56 :85-97. Disponible en : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704928.2020.1738453>

46. Guillén J, Mori S, Paucar L. Características y propiedades funcionales del maíz morado (Zea mays L.) var. Subnigroviolaceo. Scientia Agropecuaria. 2014 (7): 211-217. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172014000400005#:~:text=El%20ma%C3%ADz%20morado%20adem%C3%A1s%20aporta,asc%C3%B3rbico\)%20concentrados%20en%20el%20endospermo.](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172014000400005#:~:text=El%20ma%C3%ADz%20morado%20adem%C3%A1s%20aporta,asc%C3%B3rbico)%20concentrados%20en%20el%20endospermo.)

47. Huamani D, Paucar P. Determinación del contenido de ácido ascórbico y capacidad antioxidante del fruto liofilizado de Pitahaya Amarilla (Hylocereus megalanthus) y Pitahaya Roja (Hylocereus undatus). Tesis Pregrado. Universidad Católica de Santa María. Perú. 2018. Disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/8275>

48. Daruich C, Ribeiro B, Rostelo M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. Journal of Alloys and Compounds. 2019, 798 : 714-740. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092583881931833X>

49. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. J Phys Chem B. 2006, 110(32). Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16898714/>

50. Balasubramanian S, Yang L, Yung L, Ong C, Ong W, Yu L. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2010, 31 : 9023-9030. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961210010185>
51. Segovia I, Fuentes A, García E. Cálculo del contenido en azúcares totales en alimentos por el método de Berthand. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/29788/C%C3%A1culo%20del%20contenido%20en%20az%C3%BAcares%20totales.pdf?sequence=3#:~:text=El%20m%C3%A9todo%20de%20Bertrand%20se,y%20posterior%20valoraci%C3%B3n%20con%20KMnO4>.
52. Folorunso A, Akintelu S, Kolawole A, Ajayi S, Abiola B, Abdusalam I, Morakinyo A. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of gold nanoparticles from leaf extracts of *Annona muricata*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2019,9: 111-117. Disponible en:
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s40097-019-0301-1.pdf>
53. Pacho H, Valverde J. Determinación de compuestos fenólicos en extractos y fracciones de *Macleania rupestris Kunth*, y su caracterización por espectroscopia infrarroja. Universidad de Cuenca. Ecuador. 2020. Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/34067/1/Proyecto%20de%20titulaci%C3%B3n.pdf>
54. Merck. IR Spectrum Table & Chart. 2022. Disponible en :
<https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>