



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ELECTROHILADA A
BASE DE ZEÍNA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO
UNA PROPUESTA PARA EMPAQUES SOSTENIBLES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN MATERIALES

PRESENTA

JORGE VARGAS ALMARAZ

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

CODIRIGIDA POR

Dra. KAREN MAGALY SOTO MARTÍNEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ELECTROHILADA A
BASE DE ZEÍNA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO
UNA PROPUESTA PARA EMPAQUES SOSTENIBLES”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO EN MATERIALES**

PRESENTA

JORGE VARGAS ALMARAZ

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

CODIRIGIDA POR

Dra. KAREN MAGALY SOTO MARTÍNEZ

SINODALES

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DIAZ
DIRECTORA

Dra. KAREN MAGALY SOTO MARTÍNEZ
CODIRECTORA

Dr. RAFAEL MANUEL RÍOS VERA
SINODAL

Dra. CLAUDIA ELENA PÉREZ GARCÍA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Los polímeros y la sociedad contemporánea	3
II.2 Los polímeros bio-basados y los biopolímeros.....	4
II.3 La nanotecnología y el desarrollo de nuevos materiales.....	5
II.4 Empaquetado sostenible en la industria alimentaria.	5
II.5 Materiales bio-nanocompuestos.....	7
II. 5.1 Métodos de procesamiento de bio-nanocompuestos.....	8
II.6 El electrohilado (<i>electrospinning</i>).....	8
II.6.1 Mecanismo y equipo del electrohilado.	9
II.6.2 Efecto de las propiedades de la solución	11
II.6.3 Efecto de los parámetros de procesamiento.	12
II.7 La zeína y su aplicación en el electrohilado.	13
II.8 Las nanopartículas de plata.....	16
II.8.1 Síntesis de nanopartículas.....	16
II.8.2 Capacidad antioxidante del <i>Schinus molle</i> L.....	17
III. HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS.....	20

IV.1. General	20
IV.2. Específicos.....	20
V. METODOLOGÍA.....	21
V.1 Materiales.....	21
V.2 Métodos	21
V.2.1 Obtención del extracto acuoso de <i>Schinus molle</i> L.	21
V.2.2 Actividad antioxidante del extracto.....	21
V.2.3 Determinación del perfil de metabolitos secundarios del extracto mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-DAD).....	22
V.2.4 Formación y caracterización de las nanopartículas de plata.....	22
V.2.4.1 Efecto del pH	23
V.2.4.2 Efecto de la dilución del extracto de <i>Schinus molle</i> L.....	23
V.2.4.3 Efecto de la concentración del precursor (AgNO_3).	23
V.2.4.4 Espectrofotometría UV-Vis.	24
V.2.4.5 Estabilidad en la formación de las nanopartículas de plata	24
V.2.4.6 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	24
V.2.4.7 Secado de las nanopartículas de plata.....	24
V.2.5 Electrohilado de las películas de zeína-AgNP	25
V.2.5.1 Preparación de las soluciones poliméricas para electrohilado.	25
V.2.5.2 Conductividad eléctrica y viscosidad aparente de las soluciones poliméricas.....	25
V.2.5.3 Parámetros de electrohilado.....	25
V.2.5.4 Electrohilado de las películas a base de zeína-AgNP.	26
V.2.6 Caracterización fisicoquímica de las biopelículas.....	27
V.2.6.1 Espesor	27

V.2.6.2 Contenido de humedad	27
V.2.6.3 Solubilidad en agua.	27
V.2.6.4 Microscopia óptica.	28
V.2.7 Análisis estadístico	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
VI.1 Obtención del extracto.....	29
VI.2 Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS	30
VI.3 Perfil de metabolitos secundarios del extracto mediante HPLC-DAD.	32
VI.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNP).	38
VI.4.1 Efecto del pH.	41
VI.4.2 Efecto de la dilución del extracto de <i>Schinus molle</i> L.	44
VI.4.3 Efecto de la concentración del precursor (AgNO ₃).	46
VI.4.4 Estudios de estabilidad de formación de las nanopartículas de plata (AgNP).	50
VI.4.5 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS)	53
VI.4.6 Centrifugado y secado de las nanopartículas de plata	59
VI.5 Propiedades de la solución para electrohilado.....	60
VI.5.1 Conductividad eléctrica y viscosidad aparente	60
VI.6 Caracterización fisicoquímica de las biopelículas.	62
VI.6.1 Espesor (T), contenido de humedad (H %) y solubilidad (S %).	63
VI.6.2 Microscopia óptica	68
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Sistemas experimentales de electrohilado.	26
2. Rendimiento del extracto acuso de los frutos de pirul.	29
3. Inhibición con el extracto.	31
4. Compuestos identificados en los extractos mediante HPLC-DAD.	33
5. Perfil de metabolitos secundarios identificados en el extracto acuso del fruto de <i>Schinus molle</i> L. a través de HPLC-DAD.	36
6. Comparación de los espectros de absorción UV-Vis de los estándares contra los picos identificados en los extractos de <i>Schinus molle</i> L.	37
7. Constantes de disociación ácida del ácido gálico (pKa).	39
8. Longitud de onda máxima para cada síntesis en función del pH.	43
9. Longitud de onda máxima para cada síntesis en relación con la dilución.	46
10. Longitud de onda máxima para cada síntesis en relación con la concentración de AgNO ₃ y dilución de extracto.	50
11. Cambios de longitud de onda máxima en el primer estudio de estabilidad.	52
12. Cambios de longitud de onda máxima en el segundo estudio de estabilidad.	53
13. Potencial zeta de los diferentes sistemas de síntesis de AgNP.	55
14. Tamaño promedio e índice de polidispersión (PDI) de las AgNP sintetizadas.	56
15. Conductividad eléctrica y viscosidad aparente para los componentes y para la mezcla polimérica empleada en el electrohilado.	61

16.	Valores de espesor, humedad y solubilidad en agua para los diferentes sistemas electrohilados de zeína.	65
17.	Valores de espesor, humedad y solubilidad en agua para las películas con y sin AgNP.	67
18.	Superficies de las biopelículas de zeína bajo el microscopio óptico a 100x y 400x.	68
19.	Detalles superficiales de las biopelículas bajo el microscopio óptico a 40x.	70
20.	Superficies de las biopelículas de zeína-AgNP bajo el microscopio óptico a 40x, 100x y 400x.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema de la formación de materiales bio-nanocompuestos.	7
2.	Representación esquemática del número de publicaciones sobre electrohilado.	9
3.	Ilustración esquemática del sistema para electrohilado.	10
4.	Representación gráfica de la acumulación de cargas electrostáticas y del cono de Taylor.	10
5.	La estructura de α -zeína con tres secciones de triple superhélice y un segmento N-terminal.	14
6.	Representación esquemática de las aplicaciones desarrolladas para las películas de zeína en diferentes áreas.	15
7.	Fruto del <i>Schinus molle</i> L. (Pirul).	17
8.	Proceso de extracción con el procesador ultrasónico.	30
9.	Filtración del extracto.	30
10.	Gráfico de curva de calibración de Trolox.	32
11.	Cromatograma del extracto acuoso de <i>S. molle</i> L. con detección a longitud de onda de A) 280 nm y B) 330 nm.	34
12.	Estructura química del ácido gálico.	39
13.	Mecanismo de formación de las nanopartículas de plata.	40
14.	Etapas en la síntesis de las nanopartículas de plata (AgNP).	41
15.	Espectros UV-Vis para la síntesis de AgNP a diferentes valores de pH.	42
16.	Cambios en la coloración de la solución de síntesis de acuerdo con el valor de pH empleado.	43
17.	Formación de hidróxido de plata en la solución de síntesis.	43
18.	Efecto estabilizador de las biomoléculas sobre las nanopartículas de plata.	44

19.	Espectros UV-Vis para la síntesis de AgNP a diferentes diluciones del extracto de <i>Schinus molle</i> L.	46
20.	Cambios en la coloración de la solución de síntesis de acuerdo con la dilución de extracto empleada.	46
21.	Espectros UV-Vis para la síntesis de AgNP a diferentes concentraciones del precursor (AgNO_3) y diluciones del extracto.	48
22.	Espectros UV-Vis escalados individualmente para el estudio de la concentración del precursor a distintas diluciones.	49
23.	Cambios en la coloración de la solución de síntesis de acuerdo con la concentración del precursor y la dilución de extracto empleada.	50
24.	Espectros UV-Vis de las AgNP obtenidas con diferentes diluciones del extracto, medidos con 30 días de diferencia.	52
25.	Espectros UV-Vis de las AgNP obtenidas con los 3 sistemas seleccionados, medidos con 30 días de diferencia.	53
26.	Potencial zeta por conteo de las AgNP sintetizadas.	55
27.	Distribución de tamaño de las AgNP por intensidad mediante DLS.	57
28.	Distribución de tamaño de las AgNP por número mediante DLS.	58
29.	Precipitación de AgNP posterior al centrifugado.	59
30.	Nanopartículas de plata (AgNP) posterior al secado.	59
31.	Electrohilado de las biopelículas y formación del cono de Taylor.	62
32.	Soluciones de electrohilado.	62
33.	Apariencia física de las biopelículas de zeína en la determinación de solubilidad en agua.	65
34.	Nanocomposito a base de zeína-AgNP.	67

35.	Apariencia física de las biopelículas del nanocomposito posterior al tratamiento de solubilidad.	67
-----	--	----

RESUMEN

En los últimos años, el desarrollo de polímeros ha permitido satisfacer muchas necesidades sociales mediante productos con características especializadas. Sin embargo, la contaminación generada durante todo el ciclo de vida de estos productos es una preocupación creciente. Por lo tanto, la búsqueda de materiales amigables con el medio ambiente que puedan reemplazar a los polímeros en diversas aplicaciones es una de las principales metas de la ciencia y la tecnología actuales. En el campo de la tecnología de alimentos, se busca utilizar materiales de empaque que no solo prolonguen la vida útil y cumplan con los requisitos de seguridad alimentaria, sino que también sean activos, ecológicos y funcionales. En el presente trabajo de tesis se ha desarrollado un nanocompuesto a través de la técnica de electrohilado, empleando zeína como matriz polimérica y la incorporación de nanopartículas de plata (AgNP) en una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las nanopartículas de plata empleadas se obtuvieron mediante un método de síntesis verde utilizando extractos del fruto del pirul (*Schinus molle* L.), logrando un tamaño y potencial Z de 89.03 nm y -28.733 mV, respectivamente. Los extractos fueron evaluados en términos de su capacidad antioxidante y perfil de metabolitos secundarios, donde se identificó al ácido gálico como el compuesto mayoritario, representando el 85.24 % de los compuestos cuantificados y siendo considerado el principal responsable de la biosíntesis. Los nanocompuestos obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente mediante la determinación de su contenido de humedad, solubilidad en agua y espesor, evidenciando un aumento del 3.303 % en humedad, un 23.175 % en solubilidad en agua y un incremento de 0.75 mm en espesor, como resultado de la incorporación de las nanopartículas de plata en la matriz polimérica.

I. INTRODUCCIÓN

Los polímeros han revolucionado la economía mundial, la manufactura y la salud en las últimas décadas con actividades que requieren materiales con características específicas como el empaquetado de alimentos, la administración controlada de medicamentos, la biomédica, los textiles y el cuidado personal. Aunque se ha intentado satisfacer estas necesidades utilizando polímeros fabricados a partir de recursos fósiles, la contaminación resultante de diversas actividades humanas, incluida la producción de polímeros sintéticos, es una realidad preocupante. En 1950, la producción mundial de polímeros era de solo 2 millones de toneladas, mientras que para 2019 esta cifra aumentó a 459.75 millones de toneladas. Además, una cantidad significativa de este plástico termina en los océanos; en 2019, se estimó que en México cada persona emitía en promedio 0.03 kg de plástico al océano. Esta situación obliga a buscar alternativas para desarrollar nuevos materiales que no solo satisfagan las demandas y necesidades actuales, sino que también sean biocompatibles y biodegradables.

Los materiales de empaque utilizados en la industria alimentaria tienen como objetivo preservar la seguridad y la calidad de los productos durante las diferentes etapas de la cadena de suministro, protegiéndolos de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales. Esto se hace para prolongar su vida útil en el envase. Debido a su bajo costo, facilidad de procesamiento y propiedades, los plásticos a base de petróleo se han utilizado ampliamente como materiales de empaque. Los materiales como los nanocompuestos, por otro lado, brindan la posibilidad de utilizar materiales ligeros, innovadores, con buenas propiedades y ecológicos que pueden ser una alternativa viable como materiales de empaque.

Los bio-nanocompuestos son materiales híbridos que combinan componentes biológicos y nanotecnológicos para producir estructuras con propiedades mejoradas o potencial para nuevas aplicaciones. Los componentes biológicos pueden incluir biopolímeros, células, bacterias y enzimas. Los nanomateriales que se integran con

frecuencia incluyen nanotubos, nanopartículas de carbono, nanopartículas metálicas, entre otros.

Las micro y nanofibras a base de polímeros sintéticos y biopolímeros se caracterizan por su versatilidad, facilidad de fabricación y capacidad para controlar sus propiedades físicas, químicas y funcionales. Estas fibras representan una de las muchas estructuras desarrolladas para la fabricación de bio-nanocompuestos. El electrohilado es una técnica que se ha vuelto cada vez más popular para obtener fibras a partir de una amplia variedad de biopolímeros. Sin embargo, mejorar las diversas propiedades de las películas hechas con biopolímeros sigue siendo un gran desafío para la comunidad científica.

Debido a la capacidad de las nanopartículas de plata (AgNP) para reaccionar químicamente con el azufre contenido en ciertas proteínas presentes en la membrana celular, se ha realizado una gran cantidad de investigación sobre su actividad antimicrobiana. Las AgNP se pueden obtener por tres métodos diferentes: físico, químico y biológico. El método químico es el más popular; pero en los últimos años se han estudiado e implementado diversos métodos de “síntesis verde” con el objetivo de reducir el uso de químicos tóxicos para el medio ambiente, mediante el aprovechamiento de recursos naturales o desechos agroindustriales.

En el presente estudio se desarrolló un material nanocompuesto a través del electrohilado, utilizando la zeína como biopolímero. La zeína es una proteína proveniente del maíz que ha sido estudiada minuciosamente y que puede electrohilarse sin reticulación. La zeína se combinó con AgNP sintetizadas mediante una vía verde utilizando extractos de los frutos del pirul (*Schinus molle* L.).

II. ANTECEDENTES

II.1 Los polímeros y la sociedad contemporánea

En los últimos 60 años, los polímeros han transformado la producción agrícola y la tecnología alimentaria, han ayudado al desarrollo de la industria medica gracias a la introducción de dispositivos médicos funcionales y equipos, han reducido el consumo de combustible gracias a la fabricación de vehículos más ligeros y han mejorado el rendimiento de las aeronaves. Las materias primas utilizadas para la producción de los polímeros mencionados son derivados de combustibles/fósiles, principalmente porque son fácilmente producidas a través del petróleo y el gas natural. Sin embargo, hay dos factores que deben contemplarse:

- 1) El petróleo y gas natural son recursos finitos, en algún momento se tendrá escasez y como consecuencia un aumento de los precios.
- 2) El impacto medioambiental que se tiene con su producción y con su uso no controlado (Soares y col., 2018).

Desde la Segunda Guerra Mundial hasta hace pocos años, la industria de los plásticos derivados del petróleo ha impulsado la economía mundial. En la actualidad, la creciente demanda de materias primas derivadas del petróleo amenaza la economía mundial y, lo que es más importante, es responsable del cambio climático. La liberación de carbono de los polímeros derivados del petróleo por incineración u otros métodos de degradación aumenta los gases de efecto invernadero en la atmósfera, lo que a su vez contribuye al calentamiento global (Soares y col., 2018).

Es muy deseable disponer de nuevos recursos y métodos de síntesis y procesamiento para contribuir a la reducción del impacto medioambiental generado por la actual industria de polímeros. Como resultado, el desarrollo de materiales biodegradables y/o de base biológica han recibido una atención cada vez mayor por parte de industrias como la alimentaria (Brandelli, 2024).

II.2 Los polímeros bio-basados y los biopolímeros.

Los polímeros de origen biológico pueden clasificarse en dos grupos, los polímeros bio-basados y los biopolímeros o polímeros naturales. Los polímeros de base biológica (bio-basados) son materiales derivados de la biomasa, esto significa que se componen principalmente de materiales no fósiles y ofrecen una alternativa renovable a los polímeros tradicionales derivados del petróleo. Las materias primas de base biológica pueden encontrarse en diversas fuentes biológicas, como productos agrícolas (maíz, patata o soja), microorganismos, algas o crustáceos (Hottle y col., 2013). También pueden estar parcialmente compuestos por polímeros renovables y sintetizados (Hottle y col., 2013). Algunos de los polímeros bio-basados comercializados son los siguientes:

- a) Poliláctidos (PLA): derivados del azúcar de maíz, que posteriormente se fermenta para obtener ácido láctico y, finalmente, se polimeriza en ácido poliláctico.
- b) Poliamidas: El nailon-11 es un polímero derivado del aceite de ricino;
- c) Bio-PET: el bio-poli (tereftalato de etileno) es una combinación de etileno de origen biológico y otras materias primas derivadas del petróleo. La parte de etileno se obtiene por fermentación del maíz y posteriormente se sintetiza en el mismo proceso que un PET tradicional (Poulat, 2021).

Por otro lado, los polímeros naturales son macromoléculas que se encuentran en la naturaleza. Entre ellas se encuentran las proteínas (p. ej., colágeno, gelatina, zeína, seda), los polisacáridos (p. ej., almidón, celulosa, alginato, quitosano, ácido hialurónico), los terpenos (p. ej., caucho natural) y los lípidos. La ventaja de utilizar polímeros naturales es su capacidad para imitar el entorno químico de la naturaleza, principalmente por su biocompatibilidad. En cambio, presentan propiedades mecánicas débiles, lo que da lugar a materiales frágiles en comparación con los polímeros sintéticos (Soares y col., 2018).

En las últimas décadas, el uso de biopolímeros bio-basados y biopolímeros como biomateriales se ha incrementado en áreas como la ingeniería de tejidos, el vendaje de heridas, los sistemas de administración de fármacos y las alternativas inteligentes para la biotecnología. Cabe mencionar que el uso de un polímero procedente de una fuente renovable para cualquier aplicación en alimentación, farmacia o medicina avanza hacia una tecnología más sostenible, asequible y menos dependiente (Soares y col., 2018).

II.3 La nanotecnología y el desarrollo de nuevos materiales.

La nanociencia y la nanotecnología son áreas muy innovadoras y en las últimas décadas han abordado la síntesis de diferentes materiales con diversas morfologías, así como la construcción/ensamblaje de nanoestructuras. Se ha sintetizado una enorme variedad de nanocomponentes con diferentes estructuras y dimensionalidades al igual que se han investigado ampliamente sus potenciales aplicaciones en los campos de la física, química, biología, medicina, entre otros. La construcción de las nanoestructuras sintetizadas es necesaria ante las crecientes exigencias en los campos de la energía, los materiales y la biomedicina, y los ensamblajes resultantes suelen mostrar un rendimiento novedoso o superior (Zhang y Yu, 2014).

II.4 Empaquetado sostenible en la industria alimentaria.

El envasado o empaquetado de alimentos se considera generalmente como la estrategia principal para proteger los productos alimenticios y mejorar su calidad. El mercado de envasado de alimentos en todo el mundo está creciendo y se espera que alcance un valor de 512 mil millones de dólares para 2028 (Shahbandeh, 2024). En la industria alimentaria mundial, los envases producen alrededor de mil millones de toneladas métricas de emisiones de gases de efecto invernadero y aunque existen otros sectores que tienen mayor emisión, la búsqueda por opciones de envasado más sostenibles es un interés creciente. Actualmente, más del 75 % de los materiales de envasado de alimentos convencionales son materiales plásticos no

biodegradables y solo alrededor de una cuarta parte de estos envases de plástico son reciclables y menos del 1 % son reutilizables (Shahbandeh, 2024; Zhao y col., 2020). Por lo tanto, es urgente producir sistemas de envasado de alimentos activos y sostenibles y alternativas innovadoras con características respetuosas con el medio ambiente y un excelente desempeño en la industria alimentaria (Wang y col., 2022). Los materiales renovables y respetuosos con el medio ambiente que pueden cumplir con los requisitos de la química verde, como los materiales derivados de la biomasa (p. ej., polisacáridos y proteínas (Zubair y Ullah, 2020)) y polímeros de base biológica han sido ampliamente explorados para aplicaciones emergentes en sistemas de envasado de alimentos. La diversificación y las demandas personalizadas de los mercados de consumo han impulsado el desarrollo de materiales de envasado de alimentos multifuncionales con características activas y sostenibles, como actividades de barrera y antibacterianas, control de la frescura y el deterioro, así como la capacidad de eliminación de oxígeno (Ahari y Soufiani, 2021). Entre ellos, las películas derivadas de biomasa han despertado interés para la fabricación de envases para alimentos. Sin embargo, comúnmente no se pueden usar en sistemas de envasado debido a sus malas propiedades fisicoquímicas (p. ej., propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua). Para abordar estos problemas, se han fabricado películas multifuncionales de nanocompuestos derivados de biomasa, en las que se han introducido nanomateriales funcionales en la matriz de biomasa a través de mezcla física y/o modificación química para mejorar su rendimiento de empaque para aplicaciones emergentes (Perera y col., 2022). En este escenario, se han estudiado varios nanomateriales, como nanoarcillas naturales y sintéticas, partículas metálicas y nanopartículas de óxidos metálicos. La incorporación de estos nanomateriales a la matriz de biomasa puede mejorar sus propiedades inherentes, como las propiedades mecánicas, físicas, térmicas, de barrera, antibacterianas y de vida útil, otorgar las funcionalidades enriquecidas de los nanocompuestos resultantes y reducción de la huella de carbono en el ciclo de vida de los productos alimenticios (Shi y col., 2022).

II.5 Materiales bio-nanocompuestos.

Los materiales compuestos constan de al menos dos elementos, uno de estos funciona como una matriz, y si esta matriz es de fibras naturales, entonces forma un biocompuesto. Estos materiales son cada día más populares en la industria debido a sus propiedades únicas, es decir, son reciclables, baratos y más ligeros. Las nanopartículas inorgánicas pueden incorporarse a estos materiales para mejorar sus propiedades de resistencia, formando así bio-nanocompuestos (Shimpi, 2017). Los bio-nanocompuestos son una clase de compuestos muy singular. Consisten en una nanoestructura multifásica en la que una de las fases es de origen biológico y la otra es de naturaleza inorgánica (Figura 1). La parte inorgánica proporciona buenas propiedades térmicas y estabilidad física, que son útiles para mejorar las propiedades funcionales. Estos compuestos son versátiles y muy fiables debido a la facilidad de procesamiento y a la variedad de materiales de partida (Rojas, 2015).

Los biopolímeros en forma de bio-nanocompuestos pueden servir para varias funciones y líneas de aplicación que podrán hacer frente a los retos del futuro. Estos nanomateriales pueden servir mejor como agentes antimicrobianos, pueden utilizarse como buenos biosensores y también pueden emplearse como secuestradores de oxígeno (Akbar y col., 2020).

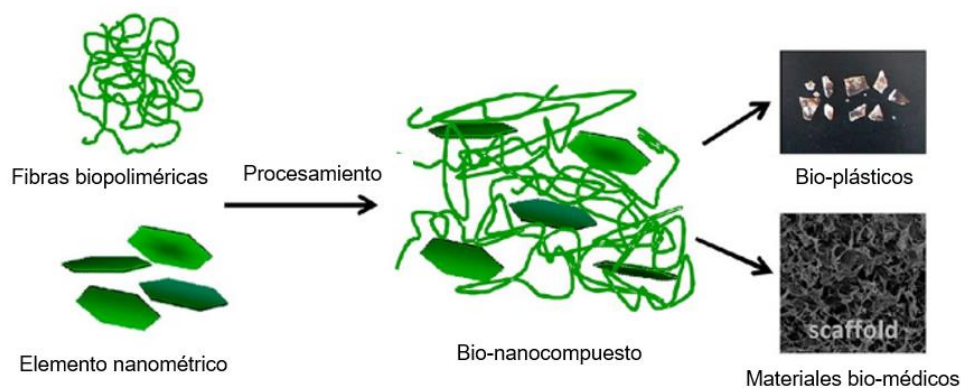


Figura 1. Esquema de la formación de materiales bio-nanocompuestos (Akbar y col., 2020).

II. 5.1 Métodos de procesamiento de bio-nanocompuestos.

El número de métodos empleados para producir bio-nanocompuestos es grande debido a que se han desarrollado a la par de la utilización de distintos polímeros y biopolímeros, sin embargo, los más empleados son los que siguen: pultrusión, bobinado de filamentos, extrusión, electrohilado, fundición de solución, moldeo por compresión, moldeo por transferencia de resina, moldeo de láminas y ultrasonido (Akbar y col., 2020).

El electrohilado es apropiado para permitir que las moléculas más grandes y/o complejas, como los biocompuestos, se fabriquen mediante este proceso. La producción a gran escala de fibras en un corto período de tiempo es difícil con este método, sin embargo, se emplea en campos donde se requieren pequeñas cantidades de fibras. Puede decirse que el método de electrohilado es un método rentable. Sin embargo, las aplicaciones de este método siguen estudiándose con la búsqueda de su implementación en muchas otras áreas (Akbar y col., 2020).

II.6 El electrohilado (*electrospinning*).

Los nanomateriales unidimensionales se han investigado intensamente debido a sus propiedades únicas y a sus fascinantes aplicaciones en muchas áreas. Se han desarrollado varios métodos para fabricar y ensamblar nanoestructuras de este tipo en forma de alambres, cintas, varillas, tubos y anillos a partir de muchos materiales. Entre los métodos, la técnica de electrohilado se ha desarrollado rápidamente en la última década para la preparación sencilla de fibras continuas de diámetro micrométrico a nanométrico. Aunque existen otros métodos para preparar fibras unidimensionales, pocos métodos pueden igualar a esta técnica en cuanto a su flexibilidad, versatilidad y facilidad de producción de fibras. El electrohilado se inventó a principios del siglo pasado (1902), pero no fue hasta mediados de la década de 1990 cuando los investigadores empezaron a darse cuenta de la enorme capacidad del procedimiento para la preparación de fibras. Es notable que la cantidad de publicaciones en este campo (Figura 2) esté aumentando continuamente a una

velocidad vertiginosa en los últimos años, beneficiándose del notable bajo coste, flexibilidad, simplicidad y aplicaciones potenciales de esta técnica. Hasta ahora, el electrohilado se ha utilizado para fabricar una amplia gama de fibras, como polímeros, cerámicas y materiales compuestos (Zhang y Yu., 2014).

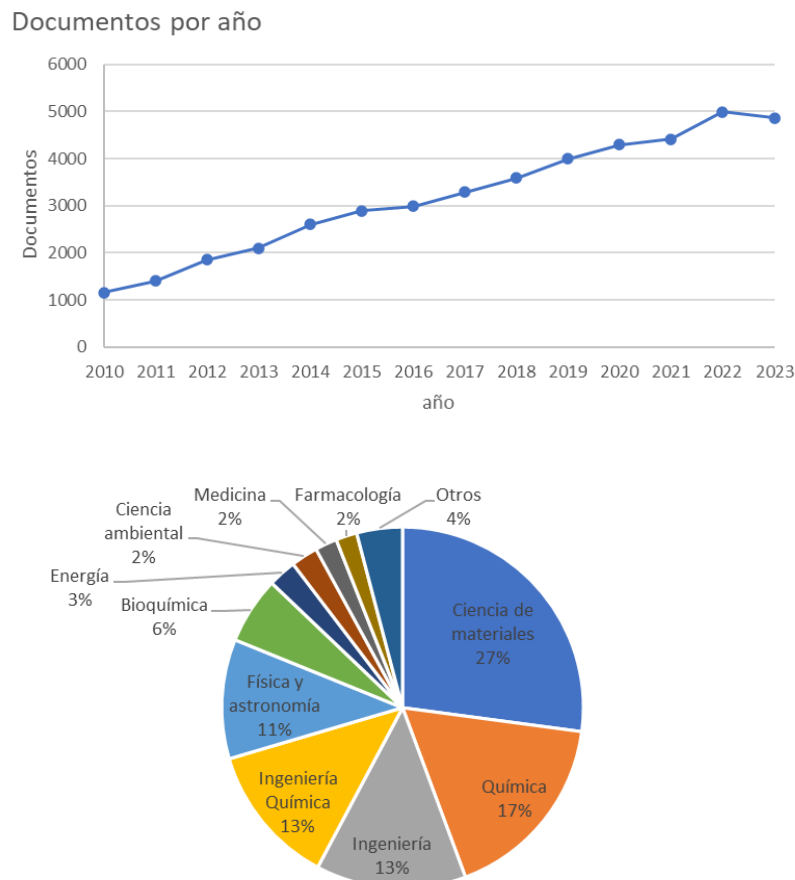


Figura 2. Representación esquemática del número de publicaciones sobre electrohilado (Scopus).

II.6.1 Mecanismo y equipo del electrohilado.

El electrohilado puede producir micro y nanofibras a partir de soluciones poliméricas o polímeros fundidos (Kriegel y col., 2008). El aparato de electrohilado se representa comúnmente por una jeringa con una aguja unida a la punta de la jeringa, que se dirige a una base metálica que actúa como soporte para la recogida de la estera de

fibras. Tanto la aguja como la base metálica están conectadas a una fuente de alimentación de alto voltaje a través de electrodos (Kriegel y col., 2008) (Figura 3).

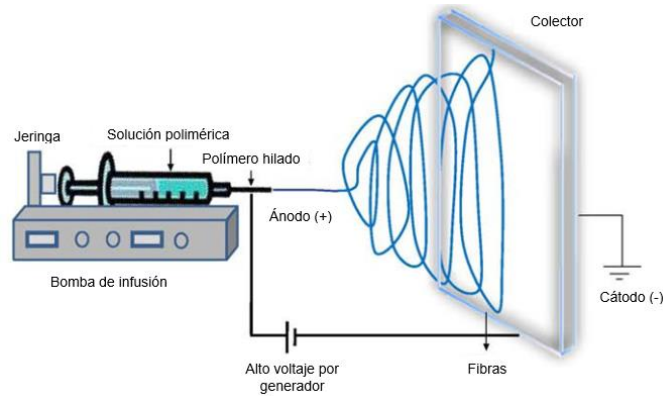


Figura 3. Ilustración esquemática del sistema para electrohilado (Kriegel y col., 2008).

La jeringa almacena el polímero (fundido o en solución) y cuando las fuerzas electrostáticas vencen la tensión superficial del líquido, comienzan a formarse las fibras. En ese momento, la superficie de las fibras sufre la repulsión de las cargas libres; al mismo tiempo, la elasticidad del fluido produce una gota inestable en forma de cono, que se forma en la punta de la aguja (cono de Taylor) (Figura 4). A continuación, un fino chorro de fluido cargado eléctricamente se desprende del cono de Taylor hacia la base del colector que tiene carga opuesta. Este filamento líquido formado es acelerado y estirado y sufre deformaciones o inestabilidades asociadas al fluido, al campo eléctrico, o a la aerodinámica del chorro hasta su llegada al colector metálico, terminando en una red de fibras o matriz tridimensional (Frey y col., 2003).

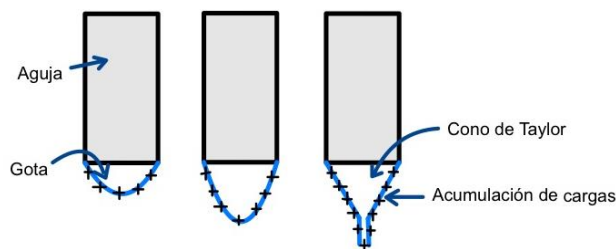


Figura 4. Representación gráfica de la acumulación de cargas electrostáticas y del cono de Taylor (Baila, 2018).

II.6.2 Efecto de las propiedades de la solución

Uno de los principales parámetros que influyen en el proceso de electrohilado es la viscosidad de la solución polimérica, que depende de la concentración de polímero y del tipo de disolvente. La viscosidad es un parámetro clave en la electrohilado porque está relacionada con el grado de entrelazamiento de la cadena de moléculas de polímero dentro de la solución. El entrelazamiento de los polímeros es fundamental para la formación de fibras. Si los polímeros no están enredados, normalmente se depositan perlas o gotitas en lugar de fibras en la placa colectora. Los polímeros con mayor peso molecular (cadenas más grandes) y el aumento de la concentración de polímeros favorecen la formación de fibras (Kriegel y col., 2008).

La tensión superficial de una solución puede favorecer la formación de perlas en lugar de fibras, mientras que las fuerzas electrostáticas debidas a las cargas dentro del chorro tienen tendencia a alargar y mantener el chorro para así favorecer la formación de fibras (Zhang y col., 2006). En consecuencia, los factores que alteran la tensión superficial y/o las fuerzas electrostáticas pueden influir en el proceso de electrohilado. Por ejemplo, se puede obtener un aumento de las cargas mediante la adición de sales iónicas o polielectrolitos (Son y col., 2004). En este caso, se transportan más cargas a lo largo del chorro, lo que provoca mayores fuerzas de elongación debido a la repulsión mutua de cargas dentro del chorro. Como consecuencia, el chorro se estira aún más, reduciendo el diámetro de la fibra y la cantidad de formación de microgotas (Kriegel y col., 2008).

Sin embargo, aumentar la concentración de polímero y, por tanto, la viscosidad de una solución hasta el punto de obstruir el flujo a través del capilar puede impedir de nuevo la formación de fibras. Además, en el caso de altas concentraciones de polímero, puede producirse la desecación de la solución polimérica en la punta de la aguja, lo que conduce a la formación de un gel localizado, impidiendo así la formación de un cono de Taylor adecuado, por último, el punto de ebullición del disolvente debe ser lo suficientemente bajo como para que la evaporación del disolvente se produzca en condiciones atmosféricas convencionales (Kriegel y col., 2008).

II.6.3 Efecto de los parámetros de procesamiento.

El electrohilado se ve influenciado por una serie de parámetros de proceso, como el voltaje aplicado, la distancia entre la punta y la placa colectora, la temperatura, la presión y el flujo. De estos parámetros, el voltaje aplicado es el más importante, ya que determina el grado de fuerzas de interacción electrostática que inducen la expulsión de un chorro de polímero. La expulsión del chorro es provocada si las fuerzas electrostáticas son capaces de superar las fuerzas de tensión superficial. Por lo general, se necesitan voltajes de funcionamiento de entre 6 y 20 kV para provocar una distorsión de la gota y formar el denominado cono de Taylor desde el que se expulsa el chorro de polímero. Un aumento del voltaje aplicado incrementará la densidad de carga haciendo que el chorro se acelere más rápidamente y se estire más debido a las mayores fuerzas coulombicas en el chorro. Esto suele provocar una reducción del diámetro de la fibra (Kriegel y col., 2008).

Un aumento del flujo o una disminución de la distancia entre la punta de la jeringa y la placa colectora suele conducir a la formación de fibras de mayor diámetro (Han y col., 2008). En el caso de la formación de microgotas, el aumento del caudal o la disminución de la distancia entre la punta de la jeringa y la placa colectora también aumentan el tamaño de las microgotas. Los flujos altos que superan un valor crítico pueden dar lugar a la formación de zonas de unión entre las fibras de polímero depositadas. Esto se debe a que no se dispone de tiempo suficiente para que se evapore todo el disolvente, lo que provoca la fusión de las fibras. Por el contrario, a flujos más bajos, el disolvente puede tener tiempo suficiente para evaporarse. Por último, las condiciones ambientales, como la temperatura, la presión y la humedad, pueden afectar tanto a las propiedades de la solución como a la velocidad de evaporación del disolvente. Por ejemplo, el aumento de la temperatura reduce la viscosidad, lo que permite añadir más polímero a la solución. Además, el disolvente puede evaporarse más rápidamente a altas temperaturas. Por el contrario, a mayor humedad, se reduce la fuerza impulsora de la evaporación del disolvente, lo que da

lugar de nuevo a la formación de zonas de unión entre las fibras depositadas (Kriegel y col., 2008).

II.7 La zeína y su aplicación en el electrohilado.

La zeína son una clase de proteínas solubles en alcohol ricas en prolamina, aprobada como excipiente generalmente reconocido como seguro (GRAS) en 1985 por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (US FDA) para el recubrimiento de películas de productos farmacéuticos. En 2019, el tamaño del mercado mundial de fibra de maíz se valoró en 718.9 millones de USD y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta del 6.3 % de 2020 a 2027. Se espera que el creciente uso del maíz en el campo farmacéutico impulse el crecimiento del mercado del mercado durante el periodo de previsión consumo de alimentos y bebidas (Grand View Research, 2019).

Según la solubilidad y la homología de secuencia, podemos clasificar la zeína en 4 grupos: α -zeína (19 y 22 kDa), que incluye el 70-85 % de la fracción total de masa de zeína, β -zeína (14 kDa), γ -zeína (16 y 27 kDa), la segunda fracción más abundante, y δ -zeína (10 kDa) (Rahman y col., 2023). La forma α -zeína es generalmente el grado comercial de la zeína (la estructura se muestra en la Figura 5). Todas las clases de zeína tienen varios aminoácidos hidrófobos y neutros (como la leucina, la prolina y la alanina) y también contienen algunos residuos de aminoácidos polares, como la glutamina. La zeína se distingue de otras proteínas porque carece casi por completo de lisina y triptófano, e incluye unos pocos residuos de arginina e histidina. Esta composición de aminoácidos es la razón de su solubilidad única, restringida principalmente a la acetona, el ácido acético, los alcoholes acuosos y las soluciones alcalinas acuosas (Lawton, 2002).

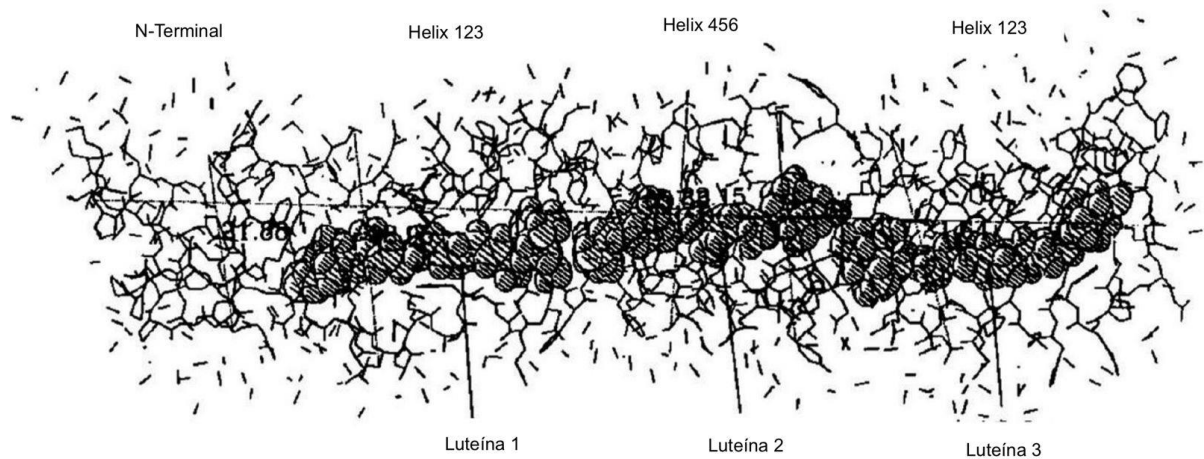


Figura 5. La estructura de α -zeína con tres secciones de triple superhélice y un segmento N-terminal (Rahman y col., 2023).

Las formulaciones a base de zeína se centran en las propiedades que posee este interesante material natural: gran resistencia al calor, al agua, a la abrasión y a la humedad; la proteína zeína del maíz es capaz de potenciar la posibilidad de una mayor vida útil de las biomoléculas (Tortorella, 2021).

Debido a la fuerte hidrofobicidad y la formación de películas que actúan como barrera frente a la humedad y el oxígeno, la zeína se ha utilizado ampliamente como componente de adhesivos, fibras, chicles, recubrimientos para productos alimenticios, así como plásticos biodegradables, polvos cosméticos, o para preparar pesticidas microencapsulados y como matriz de administración de fármacos (Figura 6). La formación de las películas de zeína tradicionalmente es por fundición por solvente, extrusión y fundición por centrifugado (Zhang y col., 2015).

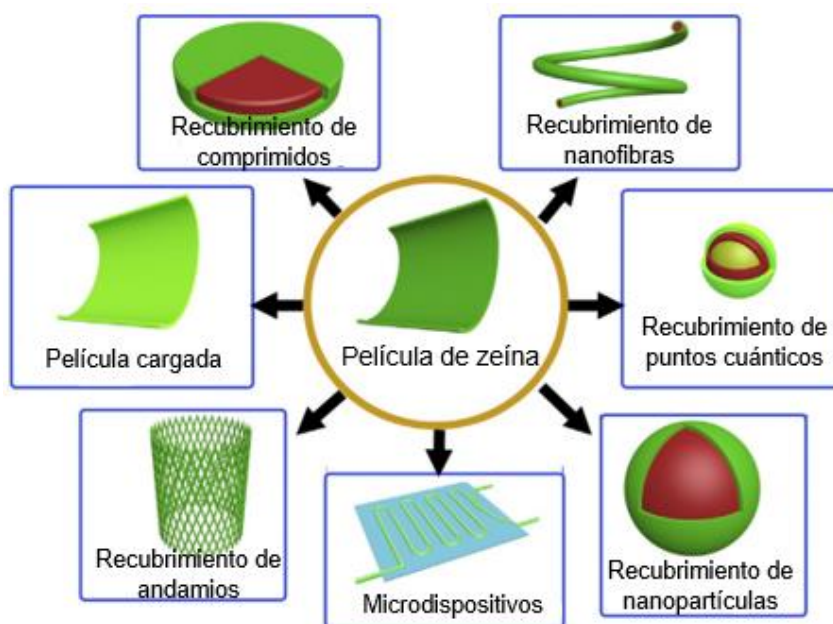


Figura 6. Representación esquemática de las aplicaciones desarrolladas para las películas de zeína en diferentes áreas (Zhang y col., 2015).

En particular, la zeína es un material prometedor para el electrohilado, y se ha estudiado su capacidad para formar fibras (Alehosseini y col., 2019). La gran ventaja de la zeína sobre otras proteínas y carbohidratos es la eliminación de la necesidad de usar un agente reticulante para formar fibras por electrohilado (Soares y col., 2018). Así, Colussi y col. 2021, seleccionaron a la zeína como matriz del isotiocianato de alilo para electrohilar recubrimientos funcionales de envases de alimentos para la conservación de la fresa; Alehosseini y col., 2019 encapsularon curcumina dentro de fibras electrohiladas de zeína y gelatina para generar recubrimientos bioactivos para el envasado de alimentos; Alcantara y col., 2010 prepararon un material bio-nanocompuesto de alginato-zeína como un sistema de administración de fármacos y, Aytac y col., 2017 electrohilieron redes nanofibrosas de zeína con encapsulados de timol-ciclodextrina como material de envasado de alimentos.

II.8 Las nanopartículas de plata.

En la actualidad, la nanoquímica se convierte en una de las principales direcciones de crecimiento de la nanociencia. Con frecuencia, las partículas metálicas de tamaño nanométrico muestran propiedades físicas, químicas y biológicas únicas y considerablemente modificadas en comparación con sus contrapartes a escala macro, debido a su alta relación superficie-volumen. Por ello, estas nanopartículas han sido objeto de importantes investigaciones en los últimos años (Huang y Yang, 2008).

Las nanopartículas metálicas exhiben propiedades que dependen del tamaño y la forma que son de interés para aplicaciones que van desde catalizadores y detección hasta óptica, actividad antibacteriana y almacenamiento de datos. Por ejemplo, la actividad antibacteriana de diferentes nanopartículas metálicas, como los coloides de plata, está estrechamente relacionada con su tamaño; es decir, cuanto más pequeños son los núcleos de plata, mayor es la actividad antibacteriana (Abou El-Nour y col., 2010).

II.8.1 Síntesis de nanopartículas.

Existen tres grandes grupos de métodos para la síntesis de nanopartículas metálicas. Los más comunes y numerosos son los métodos químicos. El segundo grupo son los métodos físicos, basados en el uso de, por ejemplo, radiación de microondas, ultrasonido, irradiación y trituración mecánica. El tercer grupo incluye métodos biológicos, que permiten la síntesis de nanopartículas a partir de extractos naturales de hongos, bacterias y plantas. Los métodos químicos, en relación con los demás, son los más eficientes y no requieren el uso de equipos especializados, y los productos obtenidos pueden almacenarse sin cambios significativos en su estabilidad (Kapuścińska y Nowak, 2016).

Algunos autores suelen nombrar a los métodos biológicos como métodos de síntesis verde. De cualquier forma, está comprobado que los extractos de plantas naturales, hongos y bacterias pueden ser utilizados en la producción de AgNP. Por ejemplo, el

extracto de hoja de magnolia tratado con una solución de AgNO_3 reduce los iones de plata (Song y Kim, 2009).

II.8.2 Capacidad antioxidante del *Schinus molle* L.

Los aceites esenciales y extractos de plantas aromáticas han sido reconocidos durante muchos años como una gran fuente de agentes farmacéuticos y aditivos alimentarios. Se ha demostrado su capacidad antioxidante para actuar en respuesta metabólica a la producción endógena de radicales libres y otras especies oxidantes (Wei y Shibamoto, 2010).

La *Schinus molle* L., comúnmente conocida como pimienta rosa o pimienta americana, es un árbol de la familia *Anacardiaceae* originario de las regiones subtropicales de Sudamérica (Figura 7). En la cocina tradicional, los frutos de *Schinus molle* L. se han utilizado como sustituto de la pimienta negra y también para preparar bebidas alcohólicas. En la medicina popular, *Schinus molle* L., se ha utilizado por sus propiedades antibacterianas, antivirales, antisépticas tópicas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antiespasmódicas, analgésicas, así como estimulantes y antidepresivas (Guala y col., 2009).



Figura 7. Fruto del *Schinus molle* L. (Pirul).

Los resultados de algunos estudios han revelado las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales y extractos de *Schinus molle* L. (Salazar Aranda y col., 2011). En el trabajo por do Rosário Martins y col., 2014 se reporta el estudio de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales

de las hojas y frutos del *Schinus molle* L. mostrando resultados positivos que sugieren un gran potencial para su uso en biotecnología, alimentos e industrias farmacéuticas. Debido a que la capacidad antioxidante es producto de la presencia de compuestos reductores, estos mismos compuestos pueden ser utilizados para la síntesis de nanopartículas de plata como una propuesta de síntesis verde (Wei y Shibamoto, 2010).

III. HIPÓTESIS

La incorporación de nanopartículas de plata (AgNP) en nanofibras electrohiladas a base de zeína resultará en la formación de una biopelícula con propiedades fisicoquímicas mejoradas.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

Desarrollar y caracterizar fisicoquímicamente una biopelícula electrohilada a base de zeína y nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de *Schinus molle* L.

IV.2. Específicos

- Determinar la capacidad antioxidante y perfil de metabolitos secundarios de extractos acuosos obtenidos de los frutos de *Schinus molle* L.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNP) mediante un método de síntesis verde con los extractos de *Schinus molle* L.
- Desarrollar nanocompositos de AgNP mediante el electrohilado de biopelículas a base de zeína.
- Evaluar el efecto de la adición de AgNP sobre las propiedades fisicoquímicas de las biopelículas obtenidas en términos de su espesor, contenido de humedad y solubilidad en agua.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

Zeína (P. Code: 1001214671/Lote: SLBB1867V), materia vegetal de *Schinus molle* L., ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (95 %, Sigma Aldrich), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (97 %, Sigma Aldrich), nitrato de plata (AgNO_3), hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido fórmico, acetonitrilo, etanol absoluto, etanol al 96 %, agua destilada, tridestilada y desionizada.

V.2 Métodos

V.2.1 Obtención del extracto acuoso de *Schinus molle* L.

Los frutos del pirul en etapa madura (frutos rojos) se colectaron de los árboles que se encuentran en el campus principal de la UAQ. La materia vegetal del pirul fue lavada con agua destilada para su posterior secado a 60 °C durante 6 h. La materia vegetal seca se molió en un molinillo cónico automático (Cuisinart DBM-8). Para preparar el extracto se utilizó un procesador ultrasónico (Hielscher UP400St), primero se colocaron 10 g de la semilla de pirul molida en 100 mL de agua desionizada, la mezcla se colocó en un baño de hielo y la punta del sonicador se sumergió a 30 mm aproximadamente, aplicando una amplitud del 25 % por 15 min. Finalmente, el extracto fue filtrado en papel Whatman 1 y refrigerado (Díaz-de-Cerio y col., 2017). La materia vegetal resultante se dejó secar durante tres días para su posterior pesaje y determinación del rendimiento del extracto obtenido.

V.2.2 Actividad antioxidante del extracto

La actividad antioxidante se determinó siguiendo la metodología estándar de estabilización de radicales ABTS. El radical libre se preparó con 16 h de anticipación a su uso en etanol (96 %). Se preparó una solución de Trolox 1 mM, antioxidante de referencia. La curva de calibración se preparó con concentraciones de Trolox entre 50-800 μM a 1 mL en metanol. De cada punto de la curva y del extracto se tomaron

20 µL y se añadieron 230 µL de la solución de ABTS. Se midió la absorbancia a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (SpectraMax 190). Las mediciones se realizaron por triplicado (Maciel y col., 2020). El porcentaje de inhibición se determinó con la fórmula 1:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{ctr} - Abs_{med}}{Abs_{ctr}} \times 100 \quad (1)$$

V.2.3 Determinación del perfil de metabolitos secundarios del extracto mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-DAD).

La identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto se realizó utilizando un sistema HPLC de la serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con un análisis con detector de arreglo de diodos. La separación de los compuestos se realizó con una columna de protección ZORBAX eclipse XBD-C18 (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5 µm) y se estableció un flujo de 0.750 mL/min. Se inyectó un volumen de 10 µL de la muestra diluida en un factor 1:2 y previamente filtrada con filtros de Nylon de 0.45 µm (Waters, USA). La fase móvil consistió en dos disolventes: el disolvente A fue agua tridestilada y el disolvente B fue acetonitrilo, ambos disolventes acidificados al 1 % con ácido fórmico. El gradiente lineal utilizado fue: 0 min [A:B 100/0], 3 min [A:B 95/5], 4 min [A:B 88/12], 7 min [A:B 80/20], 13 min [A:B 78/22], 14 min [A:B 77/23], 15 min [A:B 75/25], 17 min [A:B 74/26], 20 min [A:B 72/28], 22 min [A:B 70/30], 25 min [A:B 50/50], 26 min [A:B 25/75], 27 min [A:B 0/100] y cuatro minutos después de la ejecución. La detección se realizó a 240, 280, 330 y 360 nm. La absorbancia máxima de los picos de interés en el cromatograma se interpoló en las diferentes curvas de calibración de los estándares para obtener la concentración de los compuestos (Sánchez-Quezada y col., 2023).

V.2.4 Formación y caracterización de las nanopartículas de plata.

La formación de las nanopartículas se realizó con base a la metodología propuesta por Tesfaye y col. 2023 con algunas modificaciones. Se estudió el efecto del pH, la concentración del extracto acuoso y la concentración del precursor (AgNO₃) sobre la

formación de las nanopartículas de plata. La síntesis se logró bajo agitación constante durante 60 min a 40 ± 2 °C, empleando una relación de precursor-extracto (v/v) de 8:2 respectivamente. Todas las soluciones se prepararon en agua desionizada (Tsfaye y col., 2023).

V.2.4.1 Efecto del pH

Se estudió el efecto del pH en la síntesis de nanopartículas para los valores de 5, 7, 9 y 11, a una temperatura de 40 ± 2 °C y agitación constante durante 60 min, así como una relación de precursor-extracto (v/v) de 8:2 respectivamente; el precursor se empleó en una concentración de 4 mM y el extracto en una dilución 1:5. El pH se ajustó usando HCl 0.1 M para el sistema ácido y NaOH 0.1 M para los sistemas básicos. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó un pH de 9 y se utilizó para los experimentos posteriores.

V.2.4.2 Efecto de la dilución del extracto de *Schinus molle* L.

El extracto se diluyó en un intervalo de 3 a 11 veces respecto a su concentración original para estudiar su efecto sobre la síntesis de nanopartículas de plata, se empleó una temperatura de 40 ± 2 °C y agitación constante durante 60 min, así como una relación de precursor-extracto (v/v) de 8:2 respectivamente; el precursor se empleó en una concentración 4 mM y el pH se ajustó con una solución de NaOH 0.1 M a un valor de 9 ± 0.05 en base a los resultados del experimento previo.

V.2.4.3 Efecto de la concentración del precursor (AgNO_3).

Para estudiar el efecto de la concentración del precursor sobre la síntesis de las nanopartículas de plata se consideraron los resultados de los experimentos previos, se estudió en una concentración de 0.5 a 2 mM y diluciones del extracto 1:5 y 1:7, los parámetros de temperatura, agitación y relación precursor-extracto se mantuvieron constantes, así como el ajuste del pH a un valor de 9 ± 0.05 .

V.2.4.4 Espectrofotometría UV-Vis.

La biosíntesis de AgNP y la reducción de iones de plata se analizaron a través de la resonancia de plasmon superficial (SPR) mediante el uso de espectrofotómetro (UV-Vis (SpectraMax 190) en el rango de longitud de onda de 300 – 700 nm (Melkamu & Bitew, 2021). Asimismo, los análisis de estabilidad se basaron en los cambios asociados a los espectros de SPR en función del tiempo.

V.2.4.5 Estabilidad en la formación de las nanopartículas de plata

El análisis de la estabilidad de la formación de nanopartículas de plata (AgNP) se fundamentó en dos experimentos. El primero consistió en el análisis de las nanopartículas sintetizadas mediante espectrofotometría UV-Vis, cuyos espectros se registraron inmediatamente después de la síntesis y después de un periodo de 30 días, esto con el propósito de observar los cambios asociados a la estabilidad de las nanopartículas generadas. En un segundo estudio de estabilidad, se caracterizaron las muestras seleccionadas mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) con un Nano Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Asimismo, para estas muestras fueron estudiados sus espectros UV-Vis con una separación temporal de 30 días (Kowsalya y col., 2021)

V.2.4.6 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño hidrodinámico de partícula y el potencial Zeta de las AgNP se determinaron con un Nano Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). El potencial Zeta fue determinado con el modelo de Smoluchowski en agua como medio dispersante (RI: 1.330 y viscosidad (cP): 0.8872) a una temperatura de 25 °C. La determinación del tamaño fue con las mismas características del medio dispersante y cada experimento fue realizado por quintuplicado.

V.2.4.7 Secado de las nanopartículas de plata.

Para llevar a cabo el electrohilado de las películas de zeína-AgNP, fue necesario secar las nanopartículas de plata (AgNP) sintetizadas hasta obtener un estado de

sequedad adecuado. Este proceso se realizó mediante centrifugación a 13520 rcf durante 30 minutos a una temperatura de 10 °C, utilizando una centrifuga de rotor de ángulo (Ohaus, FC5718R). Posteriormente, el precipitado resultante se secó a 60 °C durante 24 horas para su posterior almacenamiento. Una vez secas, las muestras fueron pesadas para determinar el rendimiento obtenido.

V.2.5 Electrohilado de las películas de zeína-AgNP

V.2.5.1 Preparación de las soluciones poliméricas para electrohilado.

La preparación de las soluciones de zeína se realizó con base a la metodología propuesta por Erdogan y col., 2015 con algunas modificaciones. Se preparó una solución al 30 (w/v) de zeína en una mezcla de etanol absoluto (AA) y agua destilada (AD) en proporción 75:25 (AA:AD) (Erdogan y col., 2015).

Las soluciones poliméricas se mantuvieron en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente para lograr homogenizar (Erdogan y col., 2015).

V.2.5.2 Conductividad eléctrica y viscosidad aparente de las soluciones poliméricas.

La conductividad eléctrica de las soluciones se midió usando un medidor de conductividad ORION STAR A212 de Thermo Fisher Scientific. Se midió la conductividad de todas las soluciones poliméricas por triplicado a temperatura ambiente. La viscosidad aparente de las soluciones poliméricas se evaluó utilizando un reómetro digital Brookfield (Modelo DV3T, EUA). Las soluciones (aproximadamente 5 mL) se colocaron en un recipiente de acero inoxidable en el viscosímetro acoplado con un husillo No. 18 (Antunes y col., 2017).

V.2.5.3 Parámetros de electrohilado.

El equipo utilizado para electrohilar cuenta con una fuente de poder de alto voltaje entre 0 y 30 kV y una bomba de infusión para el control del flujo de la solución polimérica. Todo el equipo se encuentra aislado en una cubierta de plástico para el

control de humedad. La solución polimérica se colocó en jeringas de 5 mL y se utilizó una aguja de diámetro interno ($\varnothing_i$) de 1.4 mm para llevar a cabo el proceso. Las condiciones de electrohilado se enlistan en el Cuadro 1 para los diferentes sistemas experimentales (Erdogan y col., 2015).

Cuadro 1. Sistemas experimentales de electrohilado.

Sistema	Flujo (mL h ⁻¹)	Distancia aguja- colector (cm)	Tiempo de electrohilado (h)	Volumen electrohilado (mL)
S1	1	17	4	4
S2	1	15	4	4
S3	0.8	17	2.5	2
S4	1	20	4	4
S5	0.8	17	4	3.2

V.2.5.4 Electrohilado de las películas a base de zeína-AgNP.

Se llevo a cabo el electrohilado de las películas de zeína-AgNP utilizando los parámetros especificados en el S4, tal como se detalla en el Cuadro 1. La incorporación de las nanopartículas de plata (AgNP) en las soluciones de zeína se realizó siguiendo el método propuesto por Kowsalya y col., 2021, con ciertas modificaciones. Inicialmente, se añadieron 2 mg de AgNP secas a 5 mL de agua destilada. Esta mezcla se agitó durante 20 minutos para suspender las AgNP. Posteriormente, se añadieron 15 mL de etanol absoluto a la mezcla y se agitó durante 5 minutos para homogeneizar. A continuación, se añadieron 6 g (30 % w/v) de zeína a la solución. Finalmente, se dejó en agitación constante durante 30 minutos para permitir la mezcla adecuada de todos los componentes antes de proceder con el proceso de electrohilado

V.2.6 Caracterización fisicoquímica de las biopelículas.

V.2.6.1 Espesor

El espesor de las películas se determinó con un micrómetro digital (LCD, Shanrya) con una resolución de 0.001 mm. Se tomaron cinco mediciones de zonas aleatorias de las películas para determinar un espesor promedio (Yao y col., 2022).

V.2.6.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó secando las películas en un horno NAPCO (Vacuum Oven Modelo 5831) a 105 °C durante 24h, las películas fueron pesadas antes y después del secado. Lo anterior basado en la metodología propuesta por Qazanfarzadeh y col., 2016. El porcentaje de humedad se calculó de acuerdo con la fórmula 2 de la norma ASTM D5229.

$$H, \% = \frac{W_i - W_f}{W_f} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

W_i = masa inicial de la película

W_f = masa de la película secada en horno

V.2.6.3 Solubilidad en agua.

La solubilidad de las películas en agua fue determinada de acuerdo con la metodología de Karim y col., 2020. Se tomaron muestras (2 x 2 cm²) de las películas deshidratadas a 105 °C durante 24 h y el peso de estas fue tomado con el peso inicial (W_1). Posteriormente las muestras fueron sumergidas en agua destilada (30 mL) durante 24 h a 25 °C, el resto insoluble de las películas fue secado durante 24 h al aire libre para su posterior pesaje considerado como el peso final (W_2). La solubilidad (%) de las películas fue calculada empleando la fórmula 3.

$$\text{Solubilidad, \%} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

W_1 = masa de la película deshidratada

W_2 = masa de la película insoluble

V.2.6.4 Microscopia óptica.

La inspección superficial de las biopelículas se realizó con un microscopio óptico (Leica Modelo DM750), se utilizó un aumento de 40x para una observación general de la superficie, así como la identificación de defectos y posteriormente se observó a 100x y 400x para observar la calidad de la matriz fibrosa (Alcantara y col., 2010).

V.2.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos se procesaron en Minitab 18 y los gráficos en Origin Pro 9.0. Los resultados se reportan como una media $\pm$ desviación estándar usando una significancia estadística de $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Obtención del extracto

El *Schinus molle* L., comúnmente conocido como pirul en México, es una especie perteneciente al género *Schinus* de la familia *Anacardiaceae*, que comprende alrededor de 30 especies, la mayoría de las cuales son nativas de Sudamérica. Los frutos del pirul han sido valorados por su importancia nutricional, así como por sus propiedades ornamentales y su uso en la medicina tradicional (Tlili y col., 2018). La fructificación de *S. molle* L puede ocurrir durante todo el año y la especie es altamente tolerante a la sequía y a heladas suaves. A pesar de estas cualidades, su aprovechamiento es limitado. Con el propósito de explorar nuevas aplicaciones en la industria alimentaria, que fomenten una economía circular, se desarrolló un extracto acuoso utilizando un procesador ultrasónico (Figura 8). La aplicación de ultrasonido para la extracción suele mejorar el rendimiento, ya que promueve la ruptura de la pared celular de las semillas frutales, facilitando la liberación de los metabolitos de interés (Mushtaq y col., 2020). En el Cuadro 2 se detalla el rendimiento obtenido para el extracto.

Cuadro 2. Rendimiento del extracto acuoso de los frutos de pirul.

	Masa disuelta (g)	Rendimiento (%)
Extracto 1	3.2202 g	32.202
Extracto 2	3.2904 g	32.904
Rendimiento promedio	32.553 ± 0.496	

El porcentaje de rendimiento se define como la relación de masa entre la cantidad de compuesto disuelto en el extracto y la cantidad de muestra seca utilizada. Este valor está influenciado por el método de extracción y el tipo de solvente utilizado, siendo importante su determinación debido a su relación con los costos de extracción asociados al solvente empleado y la energía necesaria para llevar a cabo el proceso

(Soto, 2018). Una ventaja notable del método utilizado es el uso de agua como solvente, lo que reduce significativamente los costos en comparación con extracciones con solventes orgánicos, además de minimizar el impacto ambiental. Además, la extracción se realizó en tan solo 15 minutos en un baño frío, mientras que los métodos tradicionales que implican calentamiento requieren varias horas para obtener resultados comparables, lo que reduce el consumo energético.



Figura 8. Proceso de extracción con el procesador ultrasónico.



Figura 9. Filtración del extracto obtenido con papel Whatman No. 1.

VI.2 Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS

En los últimos años, se ha incrementado la exploración de productos naturales debido a su potencial como fuentes de antioxidantes. Compuestos como polifenoles, vitaminas y carotenoides tienen la capacidad de donar un protón o electrón para inhibir los radicales libres (Feriani y col., 2021). Fue crucial investigar esta capacidad en el extracto de pirul debido a que los compuestos con actividad antioxidante suelen relacionarse con la síntesis de nanopartículas metálicas debido a su capacidad como compuestos reductores.

El ensayo de ABTS implica la transferencia de un electrón desde una molécula natural al radical $ABTS^{\bullet+}$ formado por la reacción entre el ABTS y el persulfato de

sodio. La inhibición de este radical provoca un cambio físico en el cual el color verde característico del radical se ve disminuido a medida que aumenta la capacidad antioxidante (Feriani y col., 2021). Esta capacidad antioxidante puede expresarse como IC₅₀ (la concentración necesaria para inhibir el 50 % del radical) o como el porcentaje de inhibición, como se muestra en los Cuadros 3 y 4.

El extracto de pirul exhibió aproximadamente un 59.95 % de inhibición del radical (Cuadro 3) en comparación con la curva de Trolox (Figura 10). Este porcentaje equivale a una concentración de 0.136 mg/mL equivalentes de Trolox. Este nivel de inhibición es notablemente alto en comparación con otros estudios de extractos de frutos de pirul. En el estudio de Feriani y col., 2021, se preparó un extracto metanólico de frutos de pirul, donde se observó un porcentaje máximo de inhibición del 70 % con una concentración de 0.3 mg/mL de extracto. Para lograr un porcentaje de inhibición del 60 % (muy similar al obtenido en este estudio), se necesitó una concentración de 0.2 mg/mL de extracto, así como la misma concentración de Butilhidroxitolueno (BHT), que fue el control positivo.

En otro estudio realizado por Hmed y col., 2020, se analizaron extractos de hojas, raíces y frutos de pirul. Los tres extractos mostraron capacidad antioxidante, siendo el extracto de frutos el segundo con mejor capacidad, después del extracto de raíces.

Cuadro 3. Inhibición con el extracto.

Muestra	Abs	% Inhibición
Extracto	0.431	59.95 + 3.6

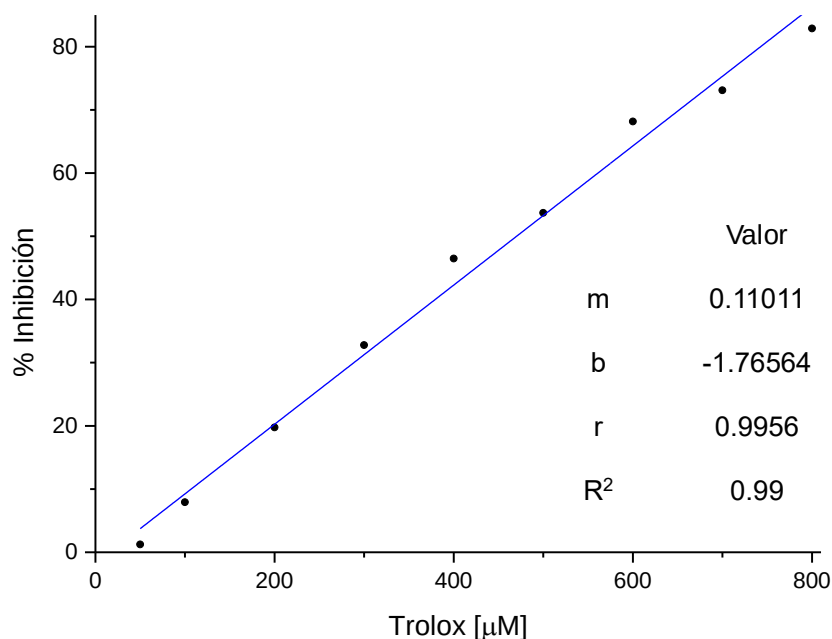


Figura 10. Gráfico de curva de calibración de Trolox.

Los resultados obtenidos por este y otros estudios demuestran la actividad antioxidante de los extractos de los frutos del pirul, esta actividad permite explicar la gran capacidad en la síntesis de nanopartículas debido a los mismos compuestos con capacidad reductora.

VI.3 Perfil de metabolitos secundarios del extracto mediante HPLC-DAD.

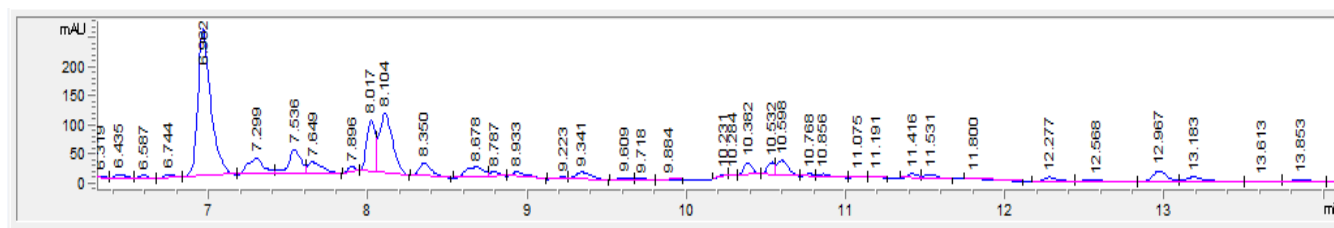
La capacidad de sintetizar nanopartículas por parte de los extractos se atribuye a los metabolitos secundarios extraídos. El uso de agua como solvente de extracción favorece la extracción de compuestos polares, especialmente compuestos fenólicos. La identificación y cuantificación de estos compuestos se logró mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD), utilizando 22 estándares para identificar y cuantificar los picos obtenidos. Se identificaron picos a 280 y 330 nm en el cromatograma del extracto, y la Figura 11 muestra los cromatogramas generales para cada detección. En el Cuadro 4 se reportan los 8 compuestos identificados con sus respectivos tiempos de retención y longitud de onda de detección.

Cuadro 4. Compuestos identificados en los extractos mediante HPLC-DAD.

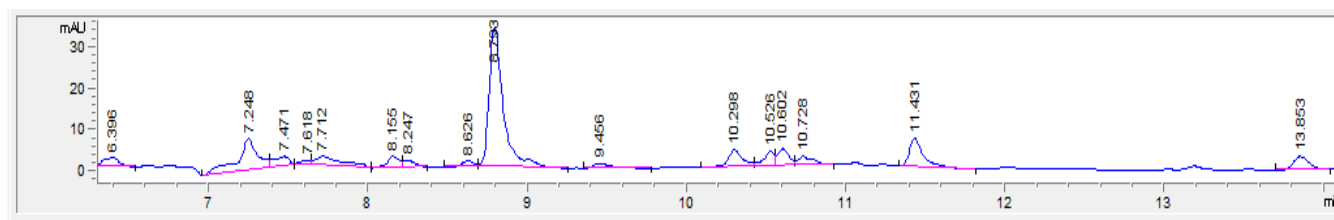
t 280 nm	Compuesto	t 330 nm	Compuesto
6.962	Ácido Gálico		Ácido
8.104	Teobromina	10.298	Clorogénico
10.532	Catequina	11.431	Ácido Cafeico
11.531	Epigallocatequina galato		
11.800	Ácido Siríntrico		
13.853	Ácido Cumárico		

Los compuestos identificados muestran el comportamiento polar esperado debido al método de extracción, y se agrupan en tres categorías principales: ácidos fenólicos (gálico, siríntrico, cumárico, clorogénico y cafeico), flavonoides (catequina y epigallocatequina) y alcaloides (teobromina), siendo los ácidos fenólicos cinco de los ocho compuestos identificados (Cuadro 4). La identificación de un compuesto mediante HPLC se basa principalmente en la comparación de los tiempos de retención de la muestra con respecto al estándar. Sin embargo, los tiempos de retención pueden variar según las condiciones del método empleado, por lo que es indispensable comparar alguna característica única. Para esto, se compararon los espectros UV-Vis de los compuestos identificados en la muestra con los estándares, lo cual se reporta en el Cuadro 6, donde se observa la similitud en los espectros. Se pueden observar cambios espectrales en algunos compuestos como la epigallocatequina, ácido siríntrico y ácido cafeico. Esto puede explicarse considerando que un extracto es una matriz compleja donde las interacciones moleculares entre todos los componentes pueden influir en los resultados.

Figura 11.
Cromatograma del
extracto acuoso de
S. molle L. con
detección a longitud
de onda de A) 280
nm y B) 330 nm



A



B

Respecto a la resolución de los cromatogramas, se puede observar que la epigallocatequina y el ácido sirínico son picos que no están completamente resueltos, lo que puede deberse a la cercanía de los dos compuestos lo que provoca su superposición y, por ende, una deformación de los espectros.

En estudios anteriores, se ha determinado el perfil fenólico del extracto metanólico del fruto del pirul mediante HPLC–DAD–ESI–QTOF–MS, identificando ácido gálico, catequina y otros ácidos fenólicos, flavonoides y azúcares (Feriani y col., 2021). En otro estudio reciente, Tlili y col., 2018 examinaron el perfil fenólico de dos extractos de fruto del pirul, provenientes de diferentes regiones. En uno de los extractos, la luteolina fue identificada como el compuesto mayoritario, seguida por el ácido gálico, mientras que, en el segundo extracto, el ácido gálico fue el principal seguido por la cumarina. Otros compuestos fenólicos y flavonoides también fueron identificados en ambos extractos. Por otro lado, Hmed y col., 2020 informaron sobre el perfil fenólico de un extracto de raíces de pirul, donde el ácido quínico fue el componente mayoritario, seguido por la catequina y el ácido gálico. Además, se identificaron varios componentes minoritarios, como el ácido cafeico, el ácido sirínico y la quercetina, entre otros.

Es evidente que el contenido fenólico varía no solo entre las diferentes partes de la planta, sino también entre muestras de la misma parte cuando provienen de diferentes regiones. Esto se debe a factores bióticos y abióticos que afectan la producción de estos compuestos químicos, adaptándose a los desafíos de supervivencia de la planta. Sin embargo, es importante destacar que los resultados de nuestro estudio coinciden en gran medida con otros trabajos previos, tanto en términos de familias de compuestos como de componentes mayoritarios.

En nuestra investigación, observamos que el ácido gálico (85.24 %) representa la mayor parte de los componentes identificados, seguido por la catequina (12.72 %). Sin embargo, es importante señalar un hallazgo interesante relacionado con la teobromina, cuya presencia se identificó en nuestro estudio. Dado que este compuesto no ha sido reportado en otros estudios sobre pirul y es un alcaloide que

se encuentra comúnmente en el cacao (Cádiz-Gurrea y col., 2014), es crucial verificar su presencia utilizando otras técnicas de elucidación estructural. Aunque los datos de tiempo de retención y espectro de absorción son consistentes con el estándar, la confirmación de su presencia proporcionaría una contribución significativa a la comprensión de la composición química del pirul.

Cuadro 5. Perfil de metabolitos secundarios identificados en el extracto acuso del fruto de *Schinus molle* L. a través de HPLC-DAD.

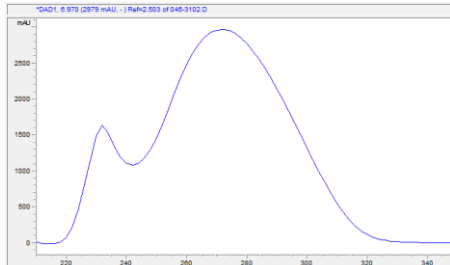
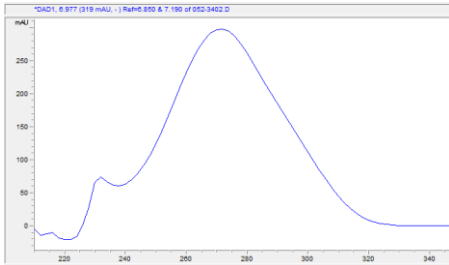
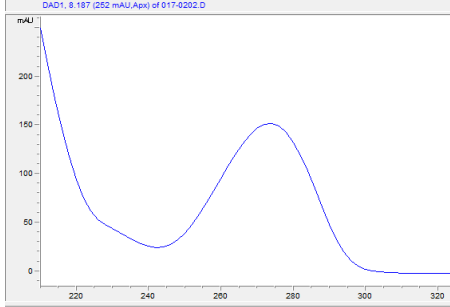
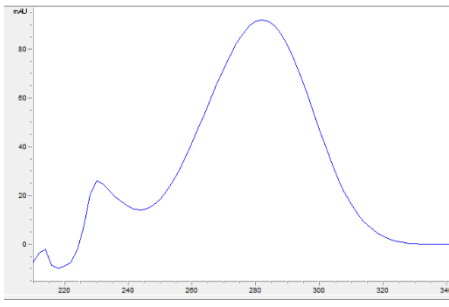
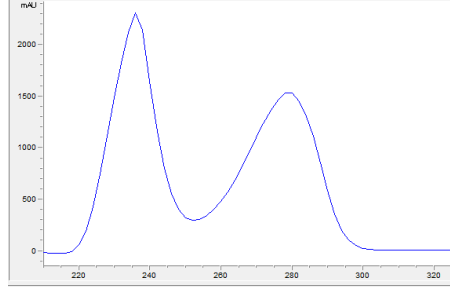
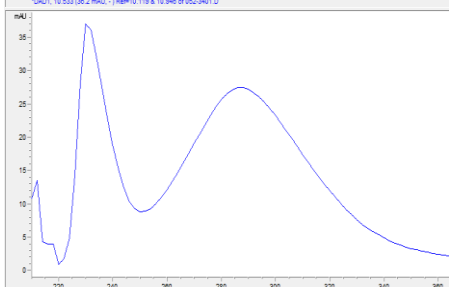
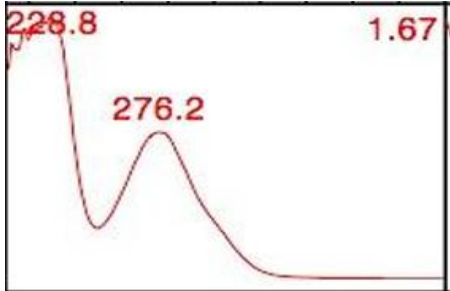
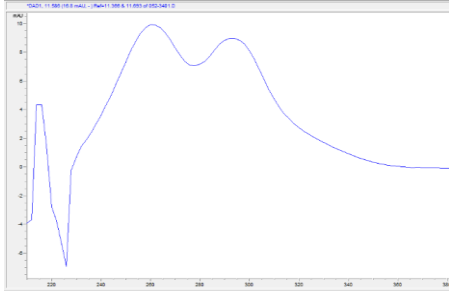
N°	Compuesto	λ_{det} (nm)	t (min) ¹	t _{test} (min) ²	Formula Molecular	Porcentaje (%)	$\mu\text{g/g}$ muestra
1	Ácido Gálico	280	6.989	6.972	C ₇ H ₆ O ₅	85.238	330.138 ± 3.657 ^a
2	Teobromina	280	8.112	8.2	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	0.405	1.504 ± 0.030 ^c
3	Ácido Clorogénico	330	10.324	10.357	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0.388	1.504 ± 0.016 ^c
4	Catequina	280	10.539	10.555	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	12.722	49.272 ± 2.022 ^b
5	Ácido cafeico	330	11.445	11.415	C ₉ H ₈ O ₄	0.639	2.477 ± 0.034 ^c
6	ECG	280	11.535	11.521	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	0.024	0.092 ± 0.003 ^c
7	Ácido Siríngico	280	11.802	11.75	C ₉ H ₁₀ O ₅	0.005	0.019 ± 0.001 ^c
8	Ácido Cumárico	280	13.872	13.877	C ₉ H ₈ O ₃	0.579	2.241 ± 0.128 ^c

^aDiferentes letras minúsculas en la misma columna representan una diferencia significativa entre la media en una prueba de Tukey con una significancia del 5%.

¹ El tiempo reportado corresponde al promedio de las tres replicas realizadas en el equipo HPLC-DAD

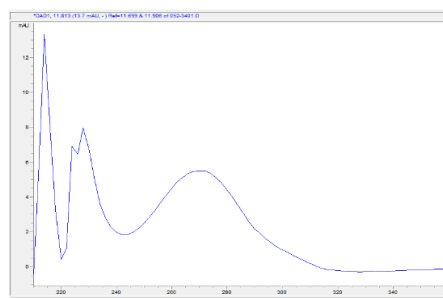
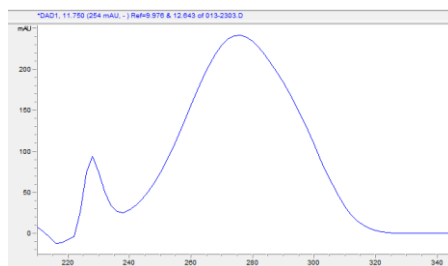
² Tiempo de retención de los estándares

Cuadro 6. Comparación de los espectros de absorción UV-Vis de los estándares contra los compuestos identificados en los extractos de *Schinus molle* L.

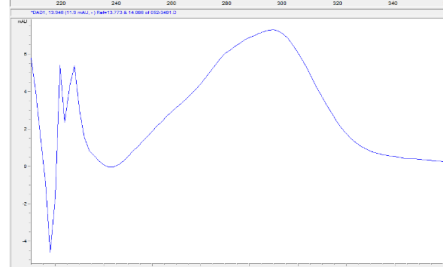
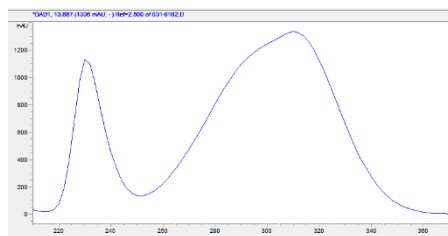
Compuesto	Estándar	Muestra
Ácido gálico		
Teobromina		
Catequina		
ECG ³		

³ Epigallocatequina galato

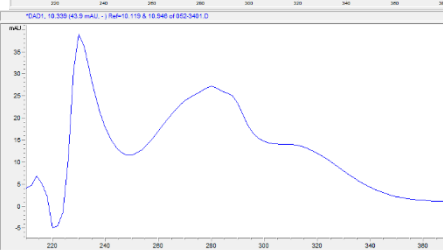
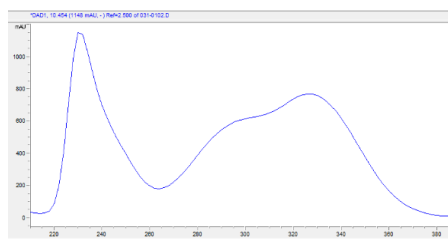
Ácido
siringico



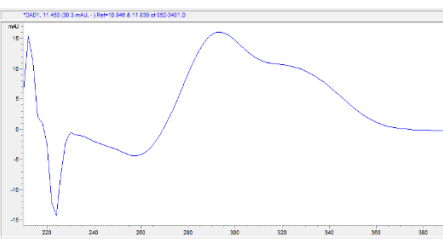
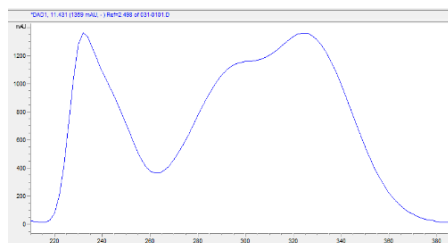
Ácido
cumarico



Ácido
clorogénico



Ácido cafeico



VI.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNP).

El perfil de metabolitos secundarios detallado en el Cuadro 5 no solo identifica a los componentes mayoritarios en el extracto, como el ácido gálico y la catequina, sino que también permite analizar el mecanismo de síntesis de nanopartículas. Dado que el ácido gálico constituye más del 80% del contenido fenólico, se considera el principal responsable de estas propiedades. Su capacidad antioxidante ha sido ampliamente estudiada por varios autores (Molski, 2023), al igual que su comportamiento químico.

El ácido gálico, perteneciente al grupo de los ácidos fenólicos, se comporta como un ácido débil con cuatro funciones hidroxiladas, como se muestra en la Figura 12. Estos hidroxilos pueden desprotonarse en función de sus valores de pKa, los cuales se detallan en el Cuadro 7 (Molski, 2023).

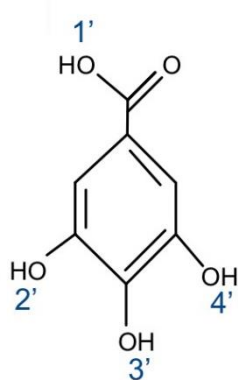


Figura 12. Estructura química del ácido gálico.

Cuadro 7. Constantes de disociación ácida del ácido gálico (pKa)

pKa	Valor
1'	4.2
3'	8.7
4'	11.9
2'	>13

Las constantes de disociación ácida juegan un papel crucial en la explicación de la síntesis de nanopartículas. En este estudio, se emplearon diversos valores de pH, y tras un análisis exhaustivo, se determinó que el pH 9 (Figura 15) sería el más adecuado para llevar a cabo el proceso. Este pH básico promueve la pérdida de dos protones (1' y 3') del ácido gálico. A primera vista, esto podría sugerir la reducción de dos átomos de plata, donde los átomos de oxígeno desprotonados donarían electrones para este propósito.

Sin embargo, investigaciones previas sugieren un mecanismo diferente para la reducción de la plata. En el estudio de Lunkov y col., 2020, se propone un mecanismo de reacción que se ilustra en la Figura 13. Se observa que el protón con el valor de pKa más bajo (1'), perteneciente al grupo carboxilo, no dona su electrón para la reducción de la plata después de la desprotonación debido a su estabilidad en resonancia con la estructura del ácido gálico. En cambio, la reducción de la plata ocurre mediante la pérdida de los protones de los grupos hidroxilo.

Antes de que ocurra esta reducción, se produce la quelación de los iones de plata, como se muestra en el mecanismo. Esta quelación es común en los compuestos fenólicos debido a la presencia de grupos hidroxilo en sus estructuras. Una vez que el pH alcanza un nivel lo suficientemente básico, los protones se pierden, promoviendo así la reducción de la plata y la disociación del complejo metálico. Este proceso permite reducir dos iones de plata, lo que conduce a la formación de un doble enlace entre los átomos de oxígeno y carbono que han perdido el electrón.

Es importante destacar que este tipo de reacción no es exclusivo de la plata. Se han reportado mecanismos de reacción muy similares para otros metales, como el oro (Wang y col., 2007), lo que subraya la aplicabilidad de estos hallazgos en la síntesis de nanopartículas.

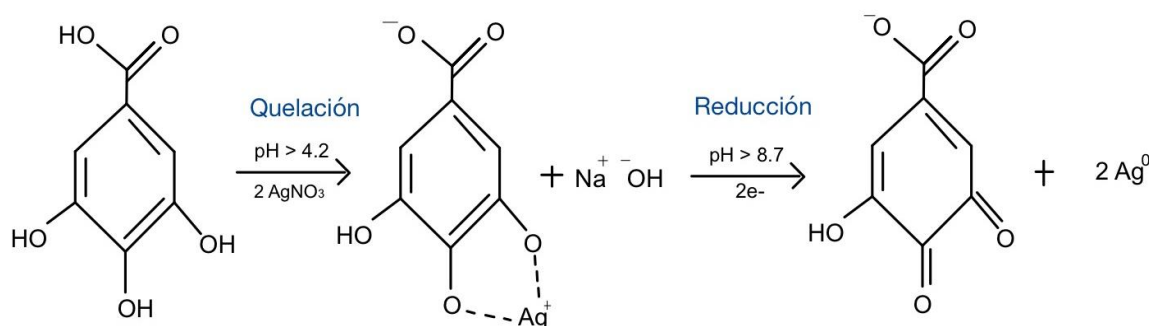


Figura 13. Mecanismo de formación de las nanopartículas de plata.

En la Figura 14A se presenta la evolución visual de la solución en cada etapa de la síntesis. En la primera fotografía, se muestra la solución de nitrato de plata, la cual aparece completamente incolora. En la segunda imagen, después de la adición del extracto de pirul, se observa una ligera turbidez y un tono amarillo pálido en la solución, sin embargo, aún no se han formado nanopartículas. La tercera fotografía muestra la solución después de alcanzar un pH de 9, evidenciando una coloración rojo-canela (Figura 14B) característica de las nanopartículas de plata. Por último, en la cuarta imagen, trascurrida 1 hora de síntesis, se aprecia una

intensificación en la coloración rojo-canela, indicando la formación de un mayor número de nanopartículas.

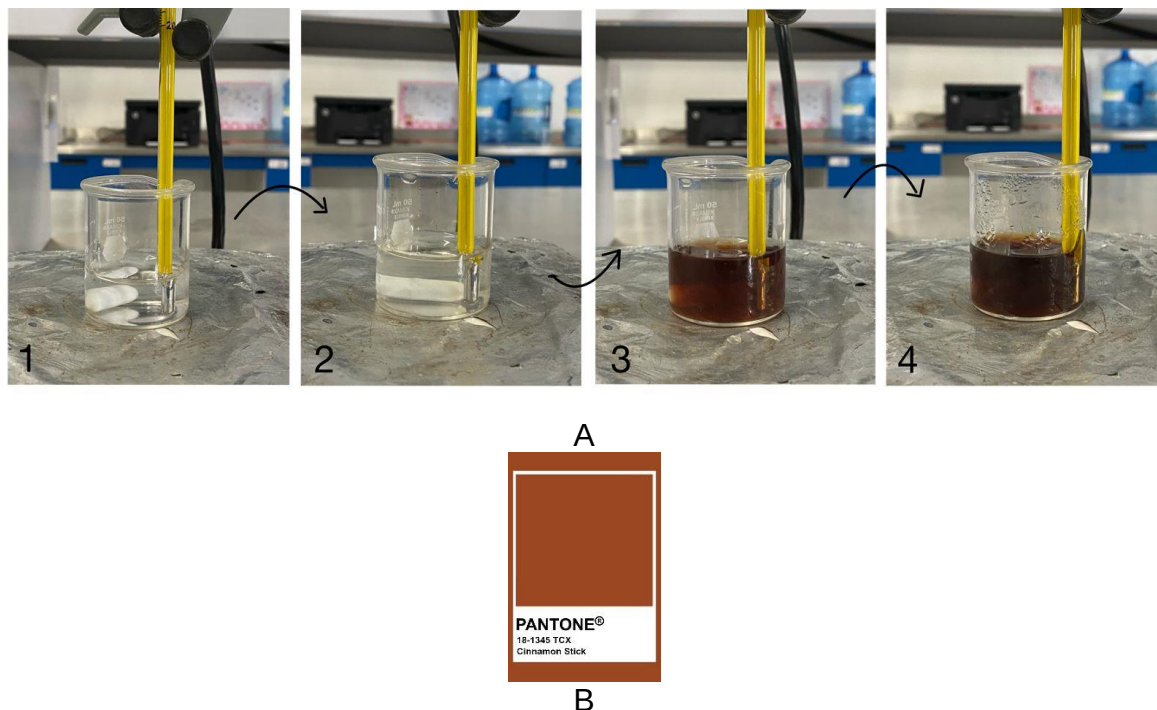


Figura 14. (A) Etapas en la síntesis de las nanopartículas de plata (AgNP) y (B) Pantone del color canela

VI.4.1 Efecto del pH.

Uno de los parámetros de mayor influencia en la química de la solución para la formación de nanopartículas de plata (AgNP) es el pH. En este estudio, se investigaron los efectos de los valores de pH de la solución en 5, 7, 9 y 11. Se observa en la Figura 15 que las bandas de los espectros UV-Vis se incrementaron en consonancia con el aumento del valor de pH, lo que resultó en un cambio notable en la coloración, especialmente evidente en valores más básicos de pH donde se observó una intensificación del color rojo-canela (Figura 16). Además, se encontró que a medida que el pH aumentaba, la longitud de onda máxima de absorción disminuía, como se detalla en el Cuadro 8. Sin embargo, se observó una excepción en el espectro a pH 11, donde el sistema estaba completamente saturado y no era posible observar su máximo de absorción. Este cambio en la longitud de onda podría

atribuirse al tamaño decreciente de las AgNP. Se postula que a medida que el diámetro de la partícula disminuye, la energía necesaria para excitar los electrones del plasmón superficial aumenta, lo que conlleva a un desplazamiento del pico de absorción máxima hacia longitudes de onda más bajas (Tesfaye y col., 2023). Con el análisis de estos resultados se eligió al pH 9 como valor de trabajo para posteriores experimentos.

La relación entre el aumento de absorción y los valores de pH se puede explicar mediante el perfil de metabolitos secundarios previamente documentado. Por ejemplo, el ácido gálico exhibe una mayor capacidad reductora con el incremento del pH debido a sus constantes de disociación ácida. Además, otros compuestos identificados, como ácidos y flavonoides, podrían comportarse de manera similar debido a los grupos hidroxilo presentes en sus estructuras. Algunos autores también sugieren que valores de pH ácido pueden inducir la desnaturalización y/o degradación de los compuestos bioactivos responsables de la reducción (Melkamu & Bitew, 2021).

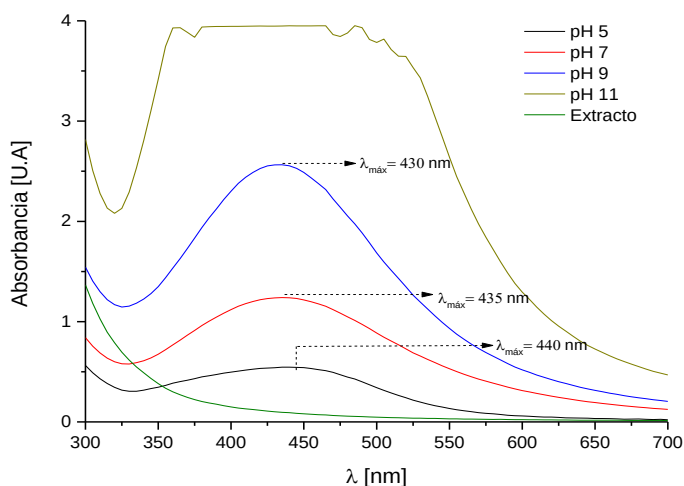


Figura 15. Espectros UV-Vis para la síntesis de AgNP a diferentes valores de pH.

Cuadro 8. Longitud de onda máxima para cada síntesis en función del pH.

pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
5	440
7	435
9	430
11	Saturado

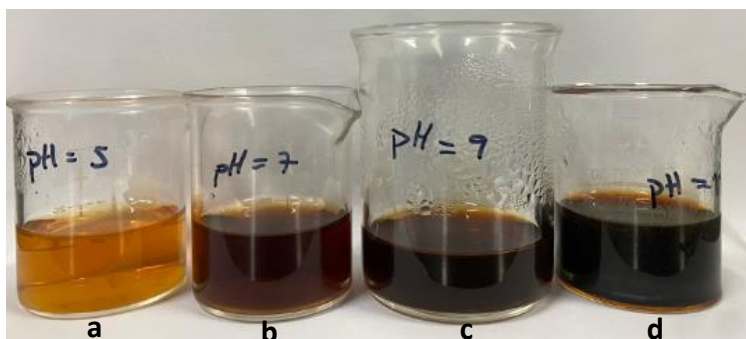


Figura 16. Cambios en la coloración de la solución de síntesis de acuerdo con el valor de pH: 5 (a), 7 (b), 9 (c) y 11 (d).

Ajustar el pH de manera precisa es crucial para el éxito de la síntesis de nanopartículas de plata (AgNP). Elevar el pH de una solución sin la presencia del extracto provoca que los iones de plata reaccionen formando hidróxido de plata, según se muestra en la ecuación 4. Esta reacción resulta en la formación de una sal insoluble, el hidróxido de plata, que se presenta como un precipitado blanco lechoso. Debido a las características de esta sal, su eliminación es casi imposible, lo que desfavorece considerablemente el proceso de síntesis. La reacción se ilustra en la Figura 17.

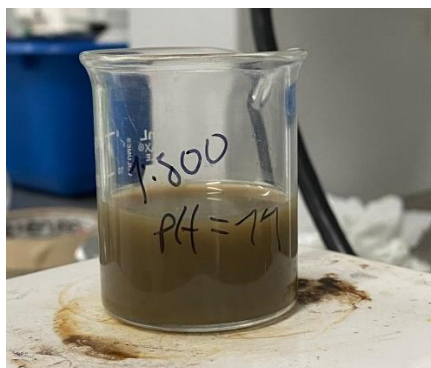
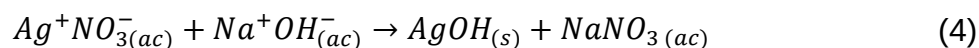


Figura 17. Formación de hidróxido de plata en la solución de síntesis.

VI.4.2 Efecto de la dilución del extracto de *Schinus molle* L.

La síntesis de nanopartículas metálicas implica la utilización de varios componentes clave, principalmente un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizador. El precursor metálico suministra los iones metálicos necesarios, mientras que el agente reductor se oxida para convertirlos en la forma metálica elemental, como la plata en su estado cero. Por último, el agente estabilizador desempeña un papel crucial al prevenir la aglomeración de las nanopartículas debido a la falta de carga, lo que se logra mediante repulsiones electrostáticas entre las moléculas del estabilizador (Soto y col., 2019).

Una ventaja significativa de sintetizar nanopartículas de plata utilizando agentes bio-reductores, como los extractos vegetales, radica en eliminar la necesidad de añadir un agente estabilizador adicional, que es esencial en los métodos químicos convencionales. Las biomoléculas reductoras no solo cumplen la función de reducir el precursor metálico, sino que también actúan como agentes estabilizadores, también conocidos como agentes de recubrimiento. Esto se ilustra en la Figura 18 (Alabdallah y Hasan, 2021).

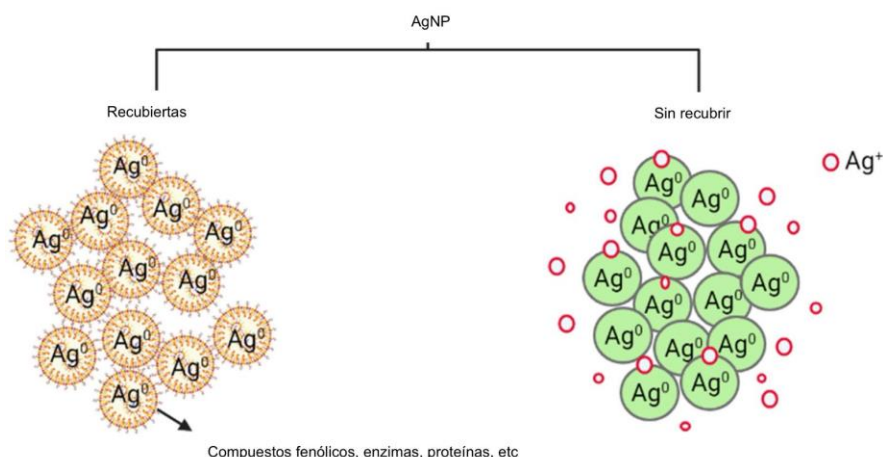


Figura 18. Efecto estabilizador de las biomoléculas sobre las nanopartículas de plata, adaptada de Alabdallah y Hasan., 2021.

Debido a su doble función en las nanopartículas de plata (AgNP), resultó crucial investigar el efecto de la cantidad de extracto en la solución de síntesis. Aunque el

cambio de color en la solución no es muy evidente entre las diferentes diluciones del extracto (Figura 20), se puede apreciar un aumento en la absorbancia en los espectros UV-Vis a medida que la dilución del extracto disminuye (Figura 19), a pesar de que la concentración del precursor se mantiene constante en todas las soluciones. Además, cuanto menor es la dilución, menor es la longitud de onda de absorción máxima, como se muestra en el Cuadro 9. Este comportamiento sugiere que, en diluciones altas del extracto, hay poco agente reductor, lo que resulta en baja formación y poca estabilización, lo que lleva a la aglomeración y crecimiento de las AgNP, absorbiendo a longitudes de onda más altas. En contraste, cuando el extracto se diluye menos, tanto el agente reductor como el estabilizador están presentes en mayor proporción, lo que produce una mayor cantidad de AgNP estables (Melkamu y Bitew, 2021).

Estos resultados están en línea con estudios anteriores, como el realizado por Tesfaye y col., 2023, donde se observó que una mayor cantidad de extracto añadido conduce a la formación de AgNP más estables y en mayor cantidad. La confirmación del papel estabilizador de las biomoléculas se puede lograr mediante técnicas como la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), donde los espectros pueden evidenciar la presencia de estos metabolitos en la estructura de las nanopartículas, como se ha demostrado en numerosos estudios (Soto y col., 2019; Melkamu y Bitew, 2021).

Aunque en este estudio no se llevó a cabo una caracterización por FT-IR, es importante destacar que el ácido gálico, componente mayoritario del extracto utilizado, se ha informado como un excelente agente estabilizador de nanopartículas debido a los grupos hidroxilo que contiene, como señalaron Li y col., 2015. Es probable que los otros componentes del extracto también participen en la reducción y estabilización debido a su naturaleza química. La elección de la dilución más óptima se basó en los estudios de estabilidad que se discuten posteriormente.

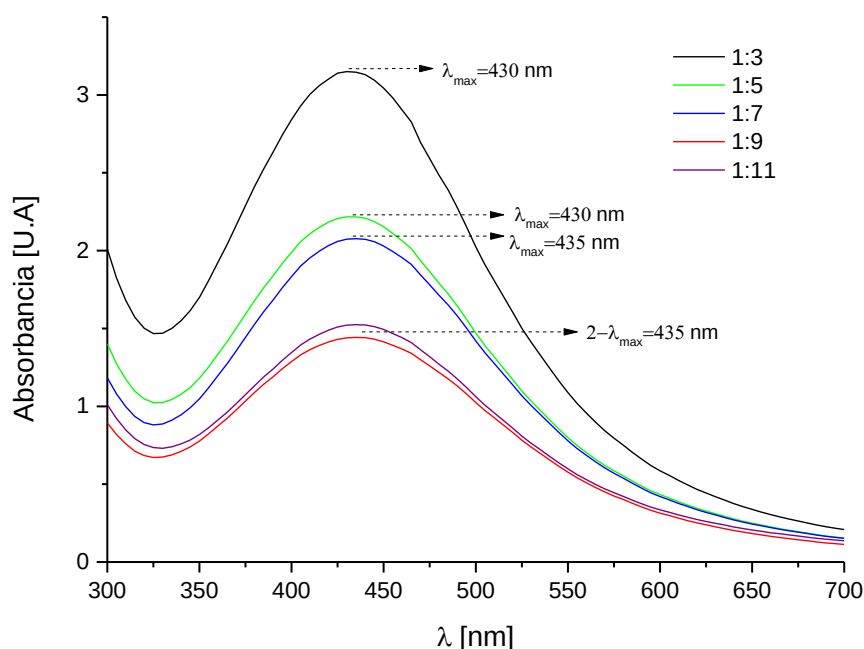


Figura 19. Espectros UV-Vis para la síntesis de AgNP a diferentes diluciones del extracto de *Schinus molle* L.

Cuadro 9. Longitud de onda máxima para cada síntesis en relación con la dilución.

Relación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1:3	430
1:5	430
1:7	435
1:9	435
1:11	435

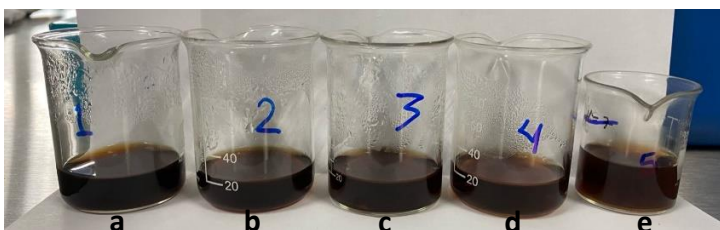


Figura 20. Cambios en la coloración de la solución de síntesis de acuerdo con la dilución de extracto empleada: 1:3 (a), 1:5 (b), 1:7 (c), 1:9 (d) y 1:11 (e).

VI.4.3 Efecto de la concentración del precursor (AgNO_3).

La concentración del precursor metálico (AgNO_3) es un factor crucial que requiere estudio detallado, ya que permite optimizar el proceso de síntesis para encontrar la cantidad óptima que produzca el mayor número de nanopartículas estables. En nuestro estudio, hemos investigado concentraciones del precursor que van desde

0.5 hasta 4 mM, junto con tres diluciones diferentes del extracto, con el fin de observar cómo influyen ambos factores. Como se muestra en la Figura 21, observamos que, en general, al aumentar la concentración del precursor y usar una menor dilución del extracto, aumenta la absorbancia, lo que indica una mayor formación de nanopartículas. Sin embargo, esta tendencia solo se observa en concentraciones de 0.5 a 2 mM; en concentraciones de 4 mM, este aumento no ocurre. Por ejemplo, a una dilución de 1:3 del extracto, obtenemos una absorbancia casi igual a la del sistema 2 mM con una dilución de 1:5, lo que sugiere que podemos producir la misma cantidad de AgNP con menos precursor y extracto. Además, en el sistema con 4 mM de precursor y una dilución de 1:5 del extracto, observamos un decremento en la absorbancia, lo que indica una deficiencia en el estabilizador para la cantidad de precursor utilizada, lo que conduce a la aglomeración y precipitación de las AgNP, reflejándose en una menor concentración en la solución (Wang y Cao, 2020).

Este comportamiento no es único en nuestro estudio; otros investigadores han informado resultados similares en la síntesis de AgNP. Por ejemplo, en los estudios de Tesfaye y col., 2023 y de Melkamu y Bitew, 2021 donde utilizan extractos de *Vernonia amygdalina* y *Hagenia Abyssinica* respectivamente, se observó un aumento general en la absorbancia con el aumento de la concentración del precursor, pero en concentraciones más altas, se observó un descenso significativo debido a la desestabilización y precipitación de las AgNP.

En cuanto a la longitud máxima de absorción, observamos que los sistemas con 1 mM de concentración absorben a una longitud de onda de aproximadamente 420 nm, mientras que los demás sistemas muestran un desplazamiento hacia el rojo, absorbiendo entre 425 y 430 nm (Cuadro 10). Estos valores indican un incremento en el tamaño de las nanopartículas hacia longitudes de absorción mayores, como se ha reportado en numerosos estudios (Wang y Cao, 2020). Para estudiar la estabilidad y analizar el tamaño de las nanopartículas mediante espectroscopía UV-Vis y dispersión dinámica de luz (DLS) fueron seleccionados los sistemas con concentraciones de 1 mM (1:7), 2 mM (1:5) y 2 mM (1:7).

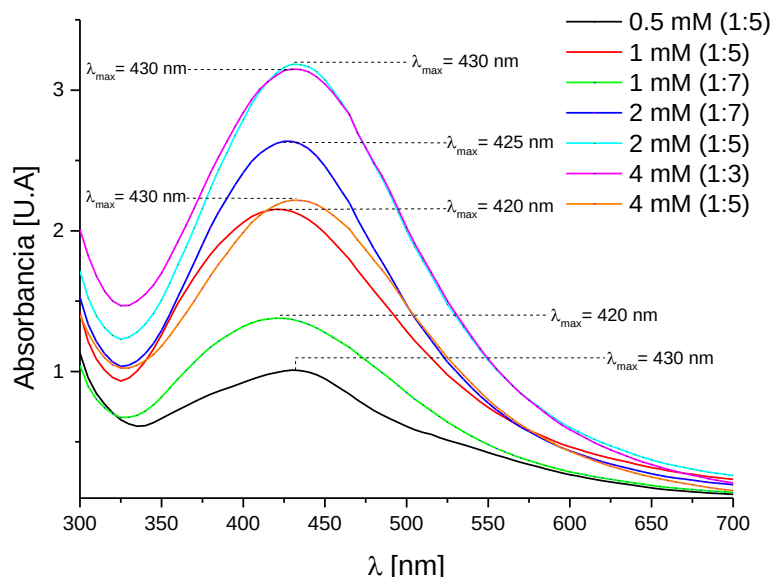
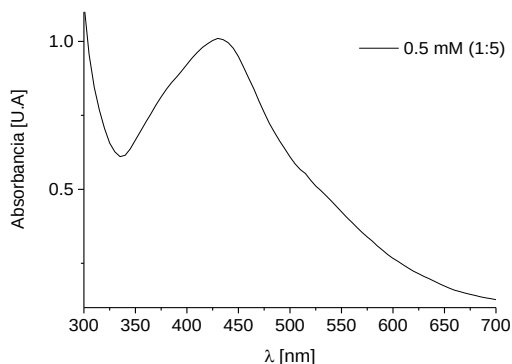
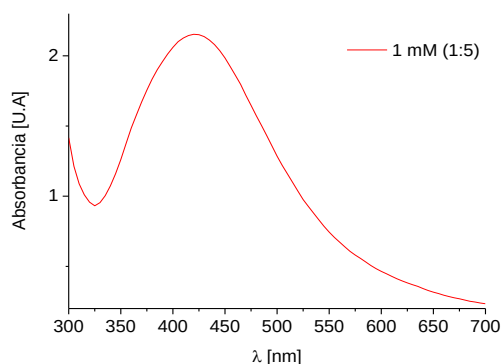


Figura 21. Espectros UV-Vis para la síntesis de AgNP a diferentes concentraciones del precursor (AgNO_3) y diluciones del extracto.

En la Figura 22 se muestra los espectros individuales de los diferentes sistemas, lo cual tiene como objetivo facilitar la visualización del comportamiento de la resonancia del plasmón superficial, ya que a menudo esta puede verse afectada por la escala utilizada. Por ejemplo, en el caso del sistema de 0.5 mM (1:5), el plasmón superficial se muestra notablemente disminuido en el espectro conjunto en comparación con su gráfico individual. Esto permite observar que incluso en concentraciones bajas de formación, las AgNP exhiben un comportamiento observable en relación con su resonancia del plasmón superficial (SPR), lo que indica su presencia.



a



b

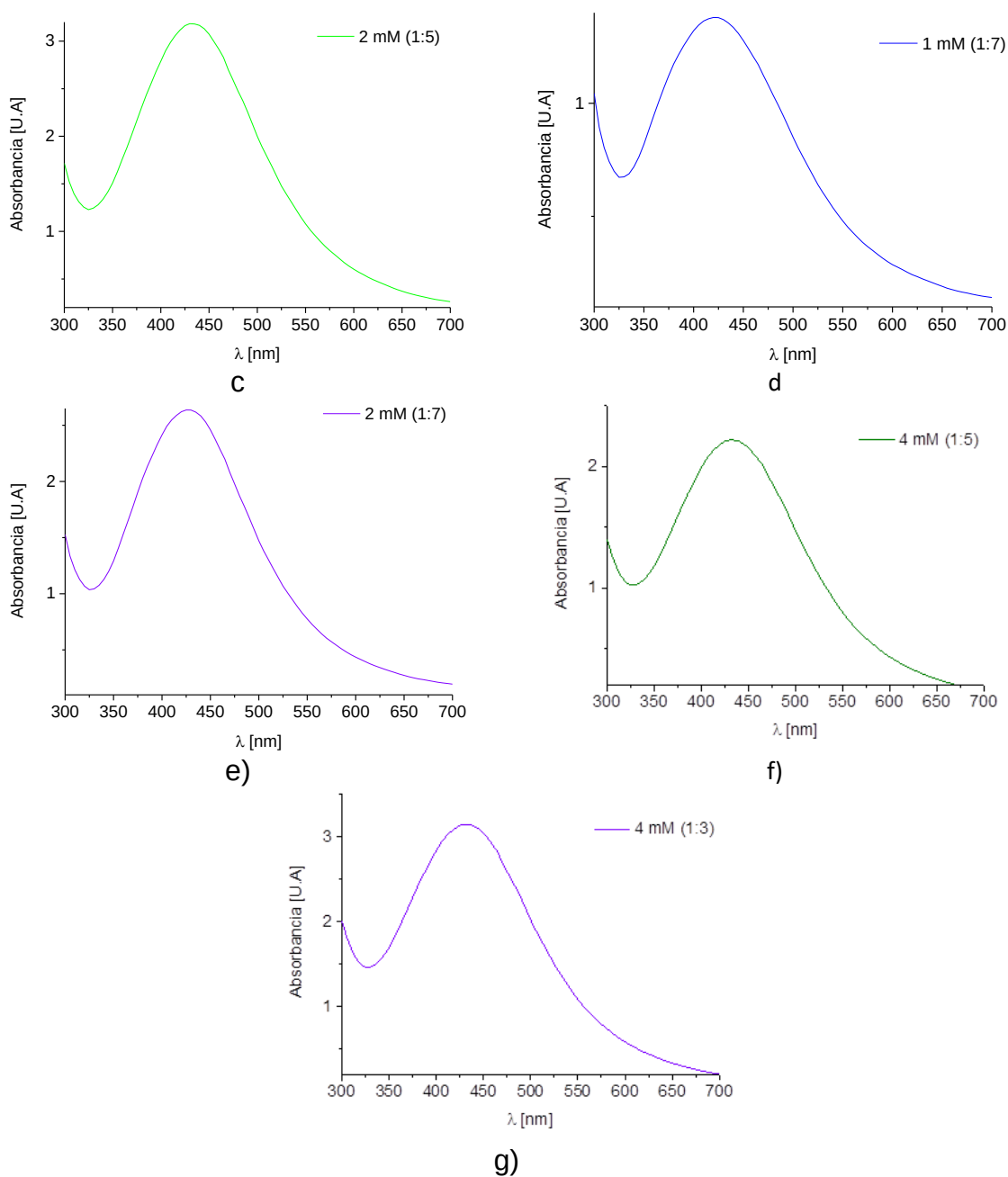


Figura 22. Espectros UV-Vis escalados individualmente para el estudio de la concentración del precursor a distintas diluciones: 0.5 mM-1:5 (a), 1 mM-1:5 (b), 2 mM-1:5 (c), 1 mM-1:7 (d), 2 mM-1:7 (e), 4 mM-1:5 (f) y 4 mM-1:3 (g).

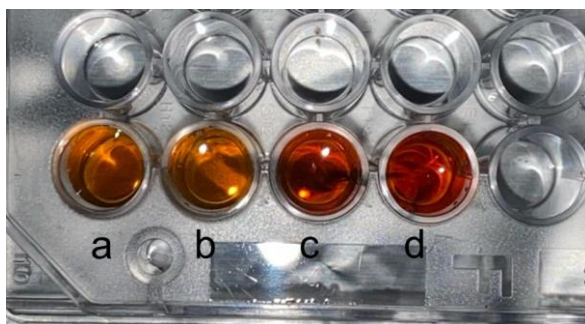


Figura 23. Cambios en la coloración de la solución de síntesis con la concentración del precursor y la dilución de extracto empleada: 1 mM-1:7 (a), 1 mM-1:5 (b), 2 mM-1:7 (c) y 2 mM-1:5 (d).

Cuadro 10. Longitud de onda máxima para cada síntesis en relación con la concentración de AgNO_3 y dilución de extracto.

Concentración (AgNO_3).	Dilución	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
0.5 mM	1:5	430
1 mM	1:5	420
2 mM	1:5	430
1 mM	1:7	420
2 mM	1:7	425
4 mM	1:5	430
4 mM	1:7	430

VI.4.4 Estudios de estabilidad de formación de las nanopartículas de plata (AgNP).

- a) Estabilidad de formación en las AgNP sintetizadas a diferentes diluciones del extracto.

Las nanopartículas (NP) de diversos materiales y tamaños exhiben características distintivas en sus patrones de dispersión y absorción, fenómeno conocido como resonancia del plasmón superficial (SPR), que surge de la oscilación colectiva de los electrones en la nanopartícula (Wang y Cao, 2020). Sin embargo, la explicación de las propiedades ópticas de las NP en suspensión no puede restringirse a una única teoría, sino que requiere la integración de varias para determinar sus tamaños y morfologías (Wang y Cao, 2020). Aunque se han desarrollado numerosos métodos de caracterización a lo largo de los años, las longitudes de onda en los rangos UV-Vis resultan particularmente convenientes debido a la sensibilidad de las propiedades ópticas de las NP en términos de tamaño, forma, agregación y composición (Wang y Cao, 2020).

Dada esta premisa, la espectroscopia se erige como una de las técnicas más empleadas para evaluar la estabilidad de las nanopartículas mediante el seguimiento de los cambios en sus espectros UV-Vis a lo largo del tiempo. En este estudio, se llevaron a cabo dos evaluaciones utilizando esta técnica. En la primera evaluación, se analizaron los espectros de los experimentos de síntesis de AgNP con distintas diluciones del extracto de pirul (Figura 24). Aunque visualmente los espectros mostraron pocos cambios después de un período de 30 días, al determinar la longitud de onda máxima (Cuadro 11), se observó un desplazamiento de 5 nm hacia el rojo en el sistema con una dilución de 1:3, lo que sugiere aglomeración y falta de estabilidad en las nanopartículas. Por otro lado, los sistemas con diluciones de 1:5, 1:7 y 1:11 no presentaron desplazamientos, lo que indica estabilidad. Respecto al sistema con dilución 1:9, se registró un desplazamiento de 5 nm hacia el azul, lo cual, aunque podría sugerir mayor estabilidad, es improbable que las nanopartículas se reduzcan de tamaño una vez sintetizadas. Este cambio podría atribuirse a la precipitación por aglomeración en la solución, donde las partículas más pequeñas quedaron suspendidas y son responsables de la absorción observada.

La segunda evaluación de estabilidad se realizó en los tres sistemas seleccionados en función de los experimentos anteriores (Figura 25). Los espectros UV-Vis muestran cambios más notables, especialmente en los sistemas con dilución 1:7. No obstante, en los tres sistemas se observó un desplazamiento hacia el azul en la longitud de onda máxima (Cuadro 12), atribuido a la precipitación de partículas aglomeradas y, por ende, a la absorción únicamente de las partículas más pequeñas. Este cambio es más pronunciado en el sistema 1 Mm (1:7), con un desplazamiento de 25 nm, lo que indica una alta inestabilidad.

Este tipo de análisis ya ha sido ampliamente documentado. En un estudio realizado por Kowsalya y col., 2021, se examinó la estabilidad de las AgNP mediante espectroscopia UV-Vis durante un período de 6 meses, observándose una buena estabilidad sin desplazamientos significativos y una longitud de absorción máxima de 430 nm. Los autores mencionaron la importancia de la estabilidad de las AgNP para su actividad antimicrobiana. En otro estudio llevado a cabo por Maciel y col., 2020,

se evaluó la estabilidad de AgNP sintetizadas con dos agentes reductores durante 12 semanas. Para uno de los sistemas, se observó una variación poco significativa en la banda SPR indicando buena estabilidad contra la aglomeración, mientras que para el segundo sistema se observó una disminución en la intensidad de la banda y desplazamientos hacia el azul, lo que sugiere aglomeración y coalescencia de las NP. Las AgNP sintetizadas en este estudio mostraron una longitud de onda de absorción máxima entre 430-450 nm (Maciel y col., 2020).

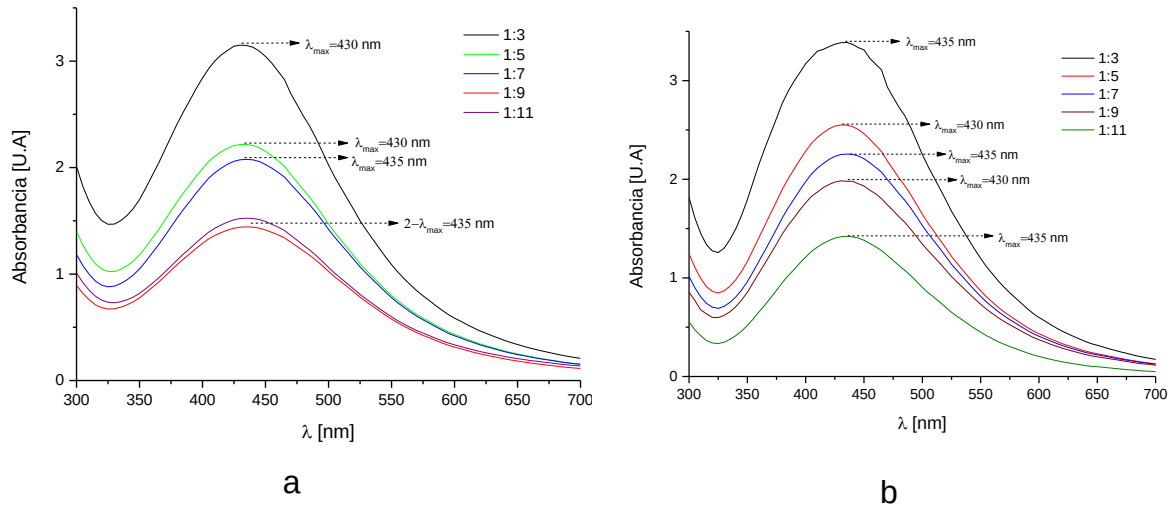


Figura 24. Espectros UV-Vis de las AgNP obtenidas con diferentes diluciones del extracto, medidos con 30 días de diferencia: a (día 1), b (día 30).

Cuadro 11. Cambios de longitud de onda máxima en el primer estudio de estabilidad.

Relación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		Relación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1:3	430	→	1:3	435
1:5	430		1:5	430
1:7	435		1:7	435
1:9	435		1:9	430
1:11	435		1:11	435

b) Estabilidad de formación en las AgNP sintetizadas en los sistemas seleccionados.

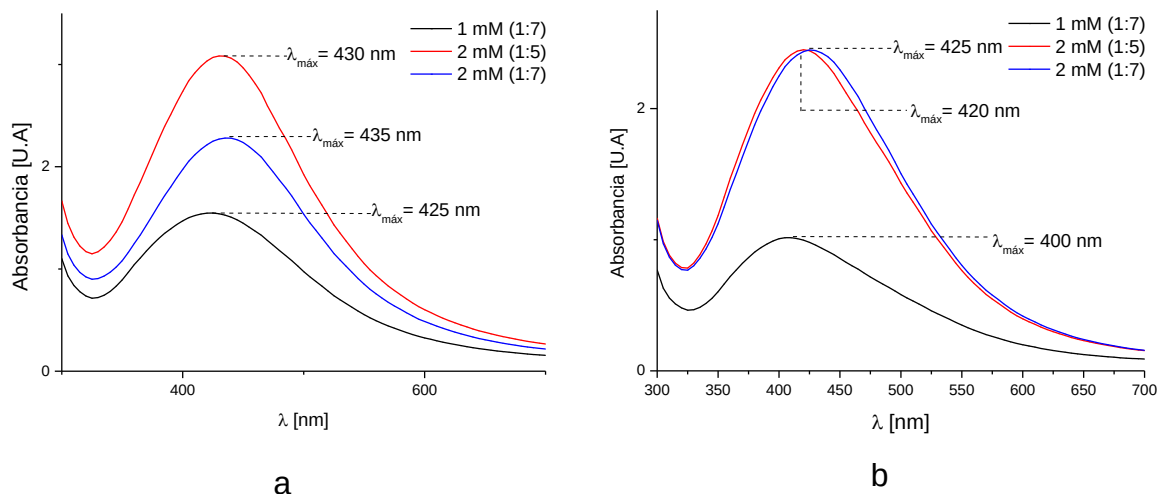


Figura 25. Espectros UV-Vis de las AgNP obtenidas con los 3 sistemas seleccionados, medidos con 30 días de diferencia: a (día 1), b (día 30).

Cuadro 12. Cambios de longitud de onda máxima en el segundo estudio de estabilidad.

Sistema	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		Sistema	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1 mM (1:7)	425	→	1 mM (1:7)	400
2 mM (1:5)	430		2 mM (1:5)	420
2 mM (1:7)	435		2 mM (1:7)	425

VI.4.5 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS)

a) Potencial zeta

El estudio de la estabilidad de las nanopartículas de plata (AgNP) se complementó con la determinación del potencial Z mediante Dispersión Dinámica de luz (DLS), otra técnica basada en la interacción de las nanopartículas con la energía electromagnética. Se asume que el mecanismo de estabilización para las NP es la pasivación o estabilización estérica, que ocurre mediante la coordinación de moléculas en la superficie de la NP mediante enlaces covalentes, las cuales suelen

llevar carga. Este fenómeno detiene o retarda el crecimiento debido a la maduración de Ostwald (Song y col., 2011).

Con esto en mente, la técnica DLS permitió investigar el tamaño (hidrodinámico) y la carga superficial de las NP. Sin embargo, estudiar NP cargadas es complejo debido a las interacciones superficiales, iones y moléculas que conducen a la creación de capas adsorbidas en las NP (Bhattacharjee, 2016). El potencial Z (ZP), también conocido como potencial electrocinético, es el potencial en el plano de deslizamiento o corte de una partícula coloidal que se mueve bajo un campo eléctrico. En términos simples, el ZP refleja la diferencia de potencial entre la Doble Capa Eléctrica (EDL) de partículas electroforéticamente móviles y la capa de dispersante (medio) que las rodea en un plano de deslizamiento (Kaszuba y col., 2010). En nuestro estudio la EDL se esperaba que estuviera constituida por las diferentes moléculas presentes en el extracto empleado, así como los diferentes iones agregados a la solución (Na^+ y Cl^- principalmente). Estudios como el de Li y col., 2015 han demostrado mediante caracterización IR que las biomoléculas del agente reductor quedan adheridas a la superficie de las NP, es decir, son el agente estabilizador.

Uno de los usos más importantes de los valores ZP es relacionarlo con la estabilidad coloidal. Una guía general puede clasificar las dispersiones de NP con valores de ZP de $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV, $\pm 20-30$ mV y $> \pm 30$ mV como altamente inestables, relativamente estables, moderadamente estables y altamente estables, respectivamente (Bhattacharjee, 2016). En el Cuadro 13 se reportan los valores de ZP para los sistemas estudiados, todos pueden considerarse como moderadamente estables y sin diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$). En la Figura 26 se observa el gráfico de ZP considerando un conteo de AgNP, y se puede notar gráficos muy similares para los sistemas. Es importante mencionar que estos valores solo deben considerarse como una guía, ya que el ZP proporciona información sobre las fuerzas electrostáticas de repulsión, pero no informa sobre las fuerzas de atracción de Van der Waals, la suma de ambas es importante para establecer la estabilidad (Bhattacharjee, 2016).

Diversos estudios han reportado diferentes valores del potencial para las AgNP. Ravichandran y col., 2019 reportaron un ZP de -14.9 mV para NP estables; mientras que Maciel y col. 2020 reportaron AgNP con valores de -34.8 y -14.3 mV en ZP, ambas estables, pero las que poseen un mayor valor se comportaron con una estabilidad muy superior. Estos estudios sugieren que a valores más alejados del cero encontraremos AgNP más estables, como la guía de valores sugiere.

Cuadro 13. Potencial zeta de los diferentes sistemas de síntesis de AgNP.

Sistema	ζ (mV)	Condiciones de síntesis
1	-27.700 ± 0.361^a	$[AgNO_3] = 1 \text{ Mm}$ Dil. Extracto = 1:7
2	-27.800 ± 0.361^a	$[AgNO_3] = 2 \text{ Mm}$ Dil. Extracto = 1:7
3	-28.733 ± 0.808^a	$[AgNO_3] = 2 \text{ Mm}$ Dil. Extracto = 1:5

^aDiferentes letras minúsculas en la misma columna representan una diferencia significativa entre la media en una prueba de Tukey con una significancia del 5%.

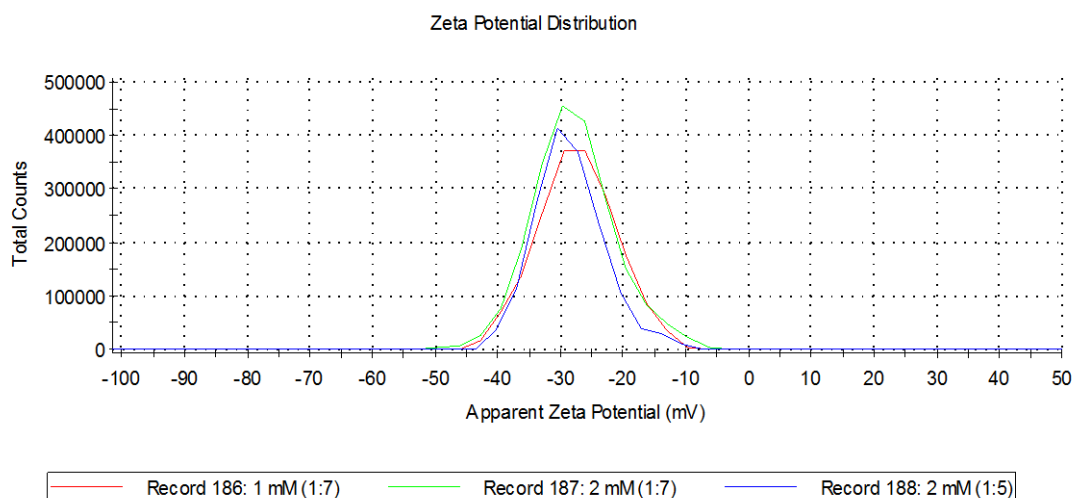


Figura 26. Potencial zeta por conteo de las AgNP sintetizadas.

b) Tamaño

La caracterización mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) proporcionó información sobre el tamaño de las nanopartículas de plata (AgNP). Es fundamental destacar que esta técnica determina lo que se conoce como radio hidrodinámico (R_H), que representa el radio de una esfera dura hipotética que difundiría a la misma velocidad que la partícula examinada. Sin embargo, abordar este concepto es complicado, dado que estas estructuras esféricas raramente existen en dispersiones coloidales. En cambio, las moléculas y partículas en solución no son esféricas, sino dinámicas y solvatadas, adaptándose al medio en el que se encuentran. Por lo tanto, el tamaño calculado mediante DLS indica el tamaño aparente de las partículas hidratadas/solvatadas (Louisiana State University, s.f). En consecuencia, los tamaños informados en el Cuadro 14 representan los radios hidrodinámicos de las AgNP solvatadas por las diversas biomoléculas e iones presentes en la solución.

Cuadro 14. Tamaño promedio e índice de polidispersión (PDI) de las AgNP sintetizadas.

Sistema	Tamaño (nm)		PDI
	Pico 1	Pico 2	
1	51.11 ± 7.48^a	462.00 ± 97.45^a	0.571 ± 0.03^a
2	59.19 ± 8.66^a	423.1 ± 67.61^a	0.529 ± 0.002^a
3	89.03 ± 9.29^b	-	0.290 ± 0.002^b

^aDiferentes letras minúsculas en la misma columna representan una diferencia significativa entre la media en una prueba de Tukey con una significancia del 5%.

En la Figura 27, se puede apreciar la distribución del tamaño por intensidad, revelando un comportamiento bimodal en el tamaño de las nanopartículas de plata (AgNP) sintetizadas con una dilución 1:7 del extracto. En este caso, el segundo pico supera los 100 nm, que es el límite convencional para la consideración de un material como nanométrico (Abou El-Nour y col., 2010). Por otro lado, el sistema con dilución 1:5 solo muestra un pico por debajo de los 100 nm. Esto se atribuye, según lo discutido en los experimentos de síntesis, a una baja concentración de agente

estabilizador, lo que provoca la aglomeración y desestabilización de las AgNP en la solución en los sistemas 1:7.

Además, en el Cuadro 14 se presenta el índice de polidispersión (PDI), un parámetro crucial que indica el grado de dispersión de un sistema nanoparticulado. En términos generales, un $PDI \leq 0.1$ se considera altamente monodisperso, mientras que los valores de 0.1-0.4 y >0.4 se consideran moderada y altamente polidispersos, respectivamente (Bhattacharjee, 2016). Bajo esta premisa, los sistemas 1 y 2 se consideran altamente polidispersos, en contraste con el sistema 3, que se clasifica como moderadamente polidisperso. Tanto en términos de tamaño como de valor de PDI, el sistema 3 presenta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en comparación con los sistemas 1 y 2.

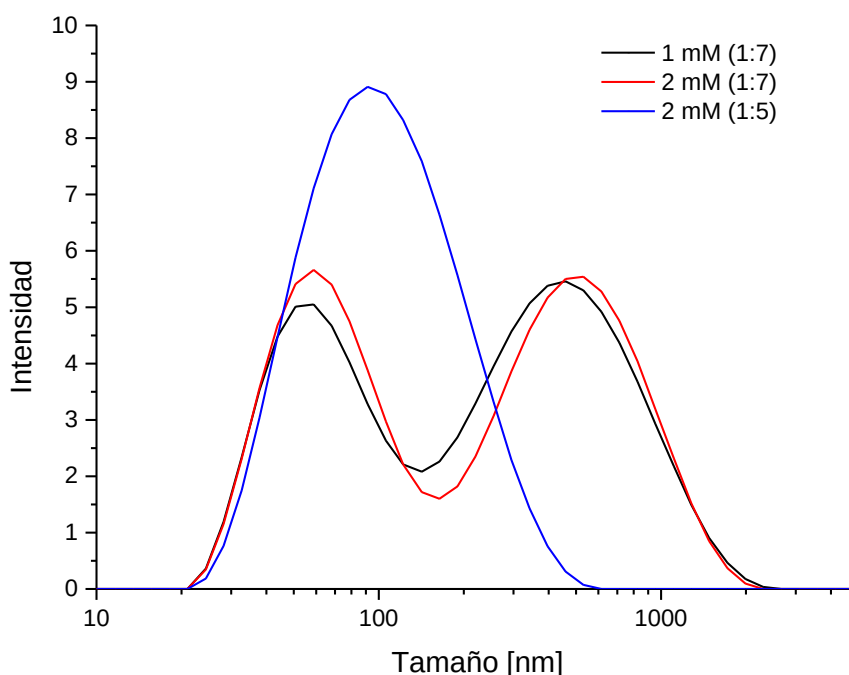


Figura 27. Distribución de tamaño de las AgNP por intensidad mediante DLS.

El software de Malvern permite distribuir el tamaño en comparación con el número o el volumen, y el gráfico puede cambiar, como en la Figura 28, donde los picos de tamaño mayor han desaparecido y se muestra un tamaño más pequeño. Esta transformación se interpreta como que la contribución de volumen del segundo componente es tan pequeña ($<0.001\%$) que ya no se muestra, es decir, su

contribución es insignificante en esa transformación (Nobbmann, 2017). Sin embargo, Malvern informa que el resultado de la intensidad siempre es correcto y debe elegirse casi siempre. Las distribuciones de número y volumen solo ayudan a obtener más detalles (Bhattacharjee, 2016). En el contexto del estudio de las nanopartículas de plata (AgNP), detectar incluso pequeñas cantidades de agregación es importante, por lo que la distribución por intensidad proporciona esta información independientemente del número o volumen de los sistemas aglomerados (Nobbmann, 2017).

Nanopartículas de plata sintetizadas por otros investigadores han obtenido una variedad de tamaños mediante DLS que depende del método de síntesis empleado: 58.2 – 132.1 nm (Lunkov y col., 2020); 55.4 – 57.4 nm (Maciel y col., 2020); y 17.6 nm (Li y col., 2015). Sus respectivas caracterizaciones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) arrojaron tamaños menores, debido al propio fundamento de las técnicas, donde DLS mide el radio hidrodinámico de las partículas dispersas, mientras que TEM proporciona el área de superficie proyectada en función del número de electrones incidentes que se transmitieron a través de la muestra. Así, el tamaño por DLS suele ser mayor; sin embargo, presenta la ventaja de medir una mayor cantidad de partículas (millones) en comparación con TEM (cientos), lo que arroja valores más sólidos de tamaño y PDI (Bhattacharjee, 2016).

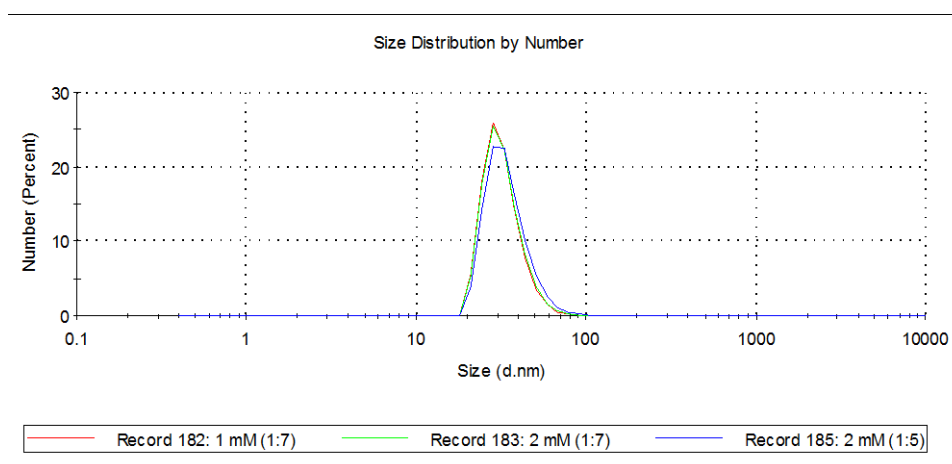


Figura 28. Distribución de tamaño de las AgNP por número mediante DLS.

VI.4.6 Centrifugado y secado de las nanopartículas de plata

La incorporación en seco de las AgNP se decidió en función de experimentos que han destacado la dificultad de incorporarlas en solución (Soto, 2018). Las soluciones posteriores a la centrifugación se presentan en la muestra de la Figura 39, donde se observa un sólido precipitado en el fondo del tubo. En la Figura 30 se muestran las AgNP una vez secas, obteniendo un total de 30.7 mg de AgNP a partir de un volumen inicial de 240 mL de AgNP en solución. No se alcanza un rendimiento del 100 %, ya que, como se puede apreciar en la Figura 29, incluso después del proceso de centrifugación, persiste el color en la solución, indicando la presencia de AgNP sin precipitar, lo cual se atribuye a su estabilidad.

La caracterización de las AgNP después del proceso de centrifugación resultaría interesante, ya que experimentos sugieren una posible disminución en su tamaño, atribuida a un proceso top-down o a la remoción de moléculas superficiales (Soto, 2018).



Figura 29. Precipitación de AgNP posterior al centrifugado (RCF:13520, t: 30 min, T: 10 °C)



Figura 30. Nanopartículas de plata (AgNP) posterior al secado (24 h, 60 °C).

VI.5 Propiedades de la solución para electrohilado

VI.5.1 Conductividad eléctrica y viscosidad aparente

Una técnica como el electrohilado se ve influenciada por diversos factores, y las propiedades de la solución son uno de ellos. En el Cuadro 15, se observa la determinación de la conductividad eléctrica, donde los solventes y su mezcla presentan valores bajos de conductividad, sin diferencia significativa ($p > 0.05$). En contraste, al agregar el 30 % w/v de zeína, se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) hasta alcanzar $669.40 \mu\text{S cm}^{-1}$. Este hallazgo reviste importancia, dado que una alta conductividad eléctrica resulta en una mayor movilidad de los iones, los cuales, al aplicarse un campo eléctrico, tienden a dirigirse mejor (Antunes y col., 2017).

Al añadir AgNP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) se observa un cambio en la coloración de la solución (Figura 32), pero además la conductividad aumenta hasta $712.23 \mu\text{S cm}^{-1}$, siendo esta diferencia significativa respecto a la solución sin AgNP. Este incremento era esperado debido a la adición de nanopartículas metálicas, las cuales se considera estén rodeadas por biomoléculas e iones, lo que supone un aumento de cargas al sistema y, en consecuencia, mayores fuerzas de elongación debido a la repulsión mutua de cargas dentro del chorro de la solución polimérica. Esto provoca un mayor estiramiento del chorro polimérico, reduciendo el diámetro de la fibra y la cantidad de microgotas (Kriegel y col., 2008).

En el Cuadro 15, se presenta la viscosidad aparente de los sistemas con y sin AgNP. En el caso del sistema sin AgNP, se observa un valor cercano al reportado en otros estudios, como el de Antunes y col., 2017, que reporta una viscosidad de 123.4 mPa s^{-1} para una solución de 30 % de zeína en 70 % de etanol. La viscosidad aparente para el sistema con AgNP se ve significativamente disminuida respecto a la solución sin AgNP (Cuadro 15). Este aspecto es relevante, dado que la viscosidad está relacionada con el grado de entrelazamiento de las cadenas de polímero dentro de la solución. Sin embargo, viscosidades muy altas pueden generar un gel localizado

en la punta de la aguja, lo que impide la formación de un cono de Taylor adecuado (Kriegel y col., 2008).

El descenso de la viscosidad con la adición de AgNP puede ser el resultado de la repulsión electrostática entre las cargas adheridas a las redes poliméricas, lo que impide su entrelazamiento. Sin embargo, sería importante variar la concentración de AgNP para observar el comportamiento de la viscosidad.

Cuadro 15. Conductividad eléctrica y viscosidad aparente para los componentes y para la mezcla polimérica empleada en el electrohilado.

Muestra	Conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Viscosidad aparente (mPa s)
Agua destilada (AD)	2.425 ± 0.129^a	-
Etanol absoluto (AA)	0.633 ± 0.003^a	-
Mezcla 75:25 (AA:AD)	0.771 ± 0.012^a	-
Mezcla al 30 % Zeína	669.40 ± 7.80^b	114.36 ± 1.84^a
Mezcla (Zeína + AgNP)	712.23 ± 4.66^c	98.22 ± 2.02^b

^aDiferentes letras minúsculas en la misma columna representan una diferencia significativa entre la media en una prueba de Tukey con una significancia del 5%.



A



B

Figura 31. (A) Electrohilado de las biopelículas, (B) Formación del cono de Taylor

En la Figura 31A se representa el proceso de electrohilado, que promueve la formación de la biopelícula. Mientras tanto, en la Figura 31B se muestra el cono de Taylor, el cual desempeña un papel crucial en el proceso de electrohilado, ya que indica la formación de las fibras.



A B

Figura 32. Soluciones de electrohilado, A) zeína 30 % y B) zeína 30 % + AgNP (100 µg/mL).

VI.6 Caracterización fisicoquímica de las biopelículas.

Los parámetros de procesamiento juegan un papel crucial en el proceso de electrohilado. En los sistemas representados en el Cuadro 1, se han modificado tanto el flujo como la distancia entre la aguja y el colector con el propósito de evaluar su

influencia en la calidad y las características de las fibras obtenidas. Los espesores reportados en el Cuadro 16 muestran que el sistema 2 presenta el mayor espesor, mientras que el sistema 4 muestra el menor. Esta disparidad se atribuye a la diferencia en la distancia de electrohilado, siendo 15 cm para el sistema 2 y 20 cm para el sistema 4. La reducción en la distancia de recolección generalmente conduce a la formación de fibras con mayor diámetro, a diferencia de distancias mayores que permiten un estiramiento más efectivo del flujo polimérico (Han y col., 2008), lo que naturalmente resultaría en un aumento en el espesor de la película.

Este incremento en el diámetro de las fibras es evidente en la inspección visual bajo microscopio óptico del Cuadro 18, donde a 400x se observa que los sistemas con distancias de electrohilado de 15 y 17 cm presentan fibras significativamente más grandes que el sistema electrohilado a 20 cm (S4), confirmando así la influencia de la distancia en el proceso de electrohilado.

En cuanto a la variación del flujo, flujos más altos tienden a producir fibras con mayor diámetro. Además, si se excede un valor crítico, puede ocurrir la unión entre las fibras de polímero depositadas, debido a la falta de tiempo suficiente para que el solvente se evapore, lo que conlleva a la fusión de las fibras (Krigel y col., 2008). En conjunto, un aumento en el flujo y una disminución en la distancia pueden dar lugar a la formación de microgotas que se adhieren a la superficie del colector. Este último fenómeno fue notable en los sistemas 1, 2 y 3, como se ilustra en la Figura 33A, lo cual también es evidente en la inspección visual a 40x y 100x en los Cuadros 18 y 19.

VI.6.1 Espesor (T), contenido de humedad (H %) y solubilidad (S %).

El contenido de humedad de una película proporciona una indicación de su capacidad para absorber y retener agua dentro de su estructura interna (Alizadeh-Sani y col., 2021). Según se muestra en el Cuadro 16, los diferentes sistemas electrohilados basados únicamente en zeína presentan un porcentaje de humedad (H %) que no supera el 2 %. Este valor es considerablemente bajo en comparación con películas obtenidas a partir de otras proteínas, como la gelatina, que pueden

superar el 20 % de humedad (Karim y col., 2020). Esta disparidad se explica por la naturaleza hidrofóbica de la zeína, que impide la incorporación de moléculas de agua en su estructura polimérica (Karim y col., 2020).

En cuanto a la solubilidad en agua, se observa en el Cuadro 16 que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los distintos sistemas. El sistema con la mayor solubilidad es el 5, con un 11.88 %, un valor relativamente bajo en comparación con otros biopolímeros como la gelatina, nuevamente debido a la naturaleza hidrofóbica de la zeína. Esta naturaleza también provoca que, al entrar en contacto con el agua, la película experimente deformaciones en su estructura física, como se ilustra en la Figura 33B. Este hallazgo es consistente con otros estudios que han reportado una disminución en la solubilidad con el aumento del contenido de zeína. Por ejemplo, en el estudio de Karim y col., 2020, se obtuvo una solubilidad del 28.69 % con un contenido de zeína del 14 %, en comparación con el 37.14 % de solubilidad de una biopelícula compuesta enteramente de gelatina.

Finalmente, se seleccionó el sistema 4 para la incorporación de nanopartículas de plata (AgNP). Esta elección se basó en el diámetro de las fibras observado mediante inspección visual con microscopía óptica. Dado que el proyecto tenía como objetivo desarrollar un nanocompuesto con propiedades a escala micro o nanométrica, se consideró importante seleccionar el sistema con fibras de diámetro más pequeño. Además, el sistema 4 mostró pocas imperfecciones superficiales debido a microgotas, y se logró una película más delgada con valores aceptables de humedad y solubilidad en comparación con los demás sistemas.

Cuadro 16. Valores de espesor, humedad y solubilidad en agua para los diferentes sistemas electrohilados de zeína.

Sistema	T (mm)	H (%)	S (%)
S1	0.225 ± 0.064^{bc}	1.112 ± 0.226^{ab}	3.697 ± 0.854^a
S2	0.375 ± 0.070^a	1.637 ± 0.075^a	3.412 ± 0.869^a
S3	0.237 ± 0.062^{bc}	1.246 ± 0.021^{ab}	3.441 ± 1.193^a
S4	0.161 ± 0.027^c	1.404 ± 0.109^a	9.280 ± 4.553^a
S5	0.225 ± 0.059^{ab}	0.688 ± 0.269^b	11.88 ± 0.409^a

^aDiferentes letras minúsculas en la misma columna representan una diferencia significativa entre la media en una prueba de Tukey con una significancia del 5%.

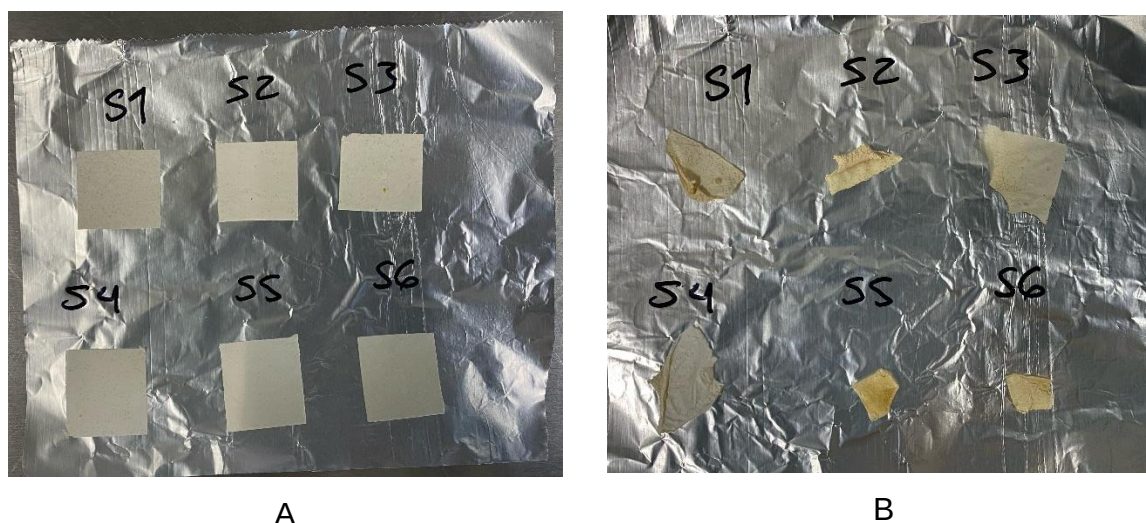


Figura 33. Apariencia física de las biopelículas de zeína en la determinación de solubilidad en agua, (A) antes del tratamiento, (B) posterior al tratamiento.

En el Cuadro 17 se presenta una comparación de las propiedades físicas de las biopelículas en función de la presencia de nanopartículas de plata (AgNP). En primer lugar, se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) en el espesor de las películas con la presencia de AgNP. Este aumento puede explicarse por el incremento de la conductividad previamente reportado, lo que indica un aumento en las cargas en la solución. Este aumento en las cargas mejora la elongación y reduce la formación de microgotas. Estas gotas, consideradas pérdidas de material polimérico, pueden haberse convertido en fibras durante el proceso de electrohilado, lo que resultaría en

una mayor acumulación en la base colectora y, por ende, un aumento en el espesor de la película. La inspección visual de las fibras que componen la película nanocompuesta se muestra en el Cuadro 20, donde el tamaño de las fibras parece ser ligeramente mayor que en el sistema sin AgNP, y no se observan microgotas de manera significativa. La determinación del diámetro de las fibras mediante microscopía electrónica permitiría una comparación más precisa, así como la observación de las AgNP en las redes poliméricas y su distribución.

En cuanto al porcentaje de humedad, se observa un aumento significativo (Cuadro 17) en las películas que contienen AgNP. Algunos autores han sugerido que los grupos polares libres en la estructura pueden interactuar con las moléculas de agua, aumentando así la humedad retenida en la estructura (Qazanfarzadeh y Kadivar, 2016). Esto es posible debido a que las AgNP agregadas están rodeadas por capas de moléculas con carga e iones que pueden retener moléculas de agua. También es importante considerar que un mayor espesor implica una mayor cantidad de material polimérico, lo que naturalmente conlleva a un aumento en la humedad.

La búsqueda de un incremento o disminución en la solubilidad depende de los objetivos del estudio. Para efecto de este proyecto se busca que la película pueda actuar como una barrera protectora durante la vida útil del producto alimenticio, pero posteriormente se desea que se degrade cuando se libere al medio ambiente, una característica de mucho valor en materiales sostenibles (Alizadeh-Sani y col., 2021). En Cuadro 17 se compara el porcentaje de solubilidad de las biopelículas y se determinó un aumento significativo al incorporar las AgNP, esto sugiere que las nanopartículas añadidas cuentan con grupos polares libres que favorecen la interacción de la matriz polimérica con el agua (Qazanfarzadeh y Kadivar, 2016), esto se contrasta con la apariencia física después del tratamiento (Figura 35) donde se observa poca deformación física en comparación con las películas sin AgNP (Figura 33B) que se deformaron notablemente debido a la alta hidrofobicidad de la zeína. Este cambio en su solubilidad lo proyecta como un material con potencial biodegradable ante una liberación al ambiente.

Cuadro 17. Valores de espesor, humedad y solubilidad en agua para las películas con y sin AgNP.

Sistema	T (mm)	H (%)	S (%)
Zeína	0.161 ± 0.027^a	1.404 ± 0.109^a	9.280 ± 4.553^a
Zeína + AgNP	0.236 ± 0.022^b	4.707 ± 0.267^b	32.455 ± 1.240^b

^aDiferentes letras minúsculas en la misma columna representan una diferencia significativa entre la media en una prueba de Tukey con una significancia del 5%.

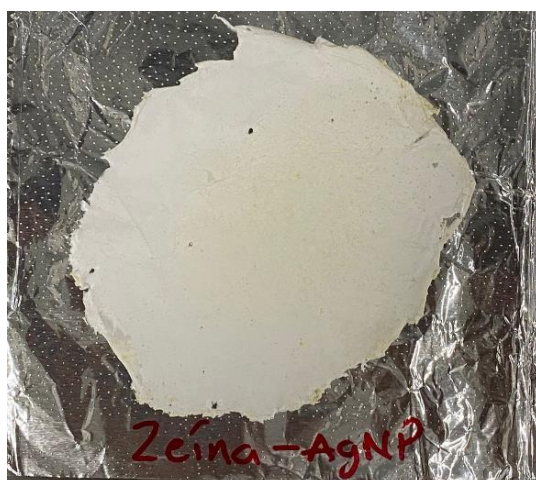


Figura 34. Nanocomposito a base de zeína-AgNP.

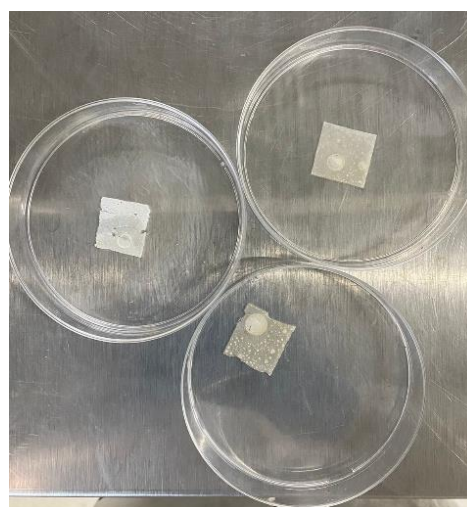
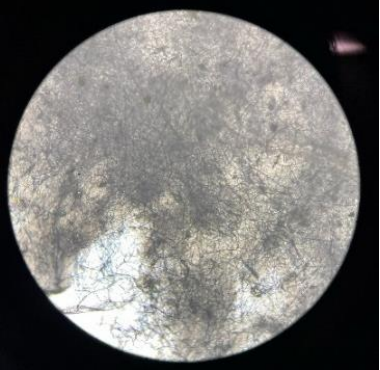
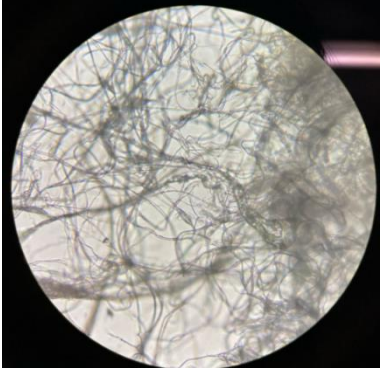
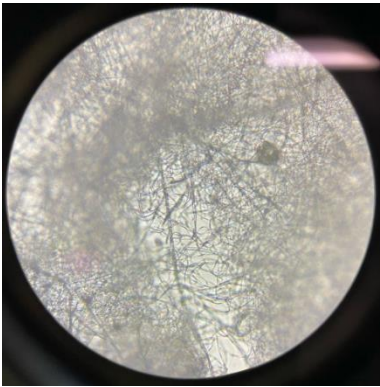


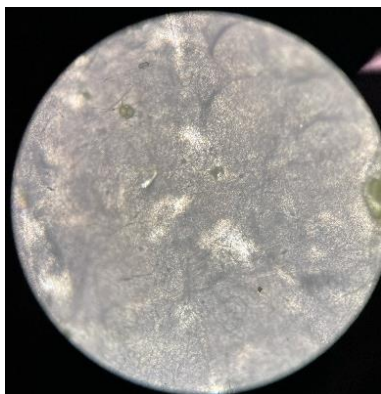
Figura 35. Apariencia física de las biopelículas del nanocomposito zeína-AgNP posterior al tratamiento de solubilidad.

VI.6.2 Microscopia óptica

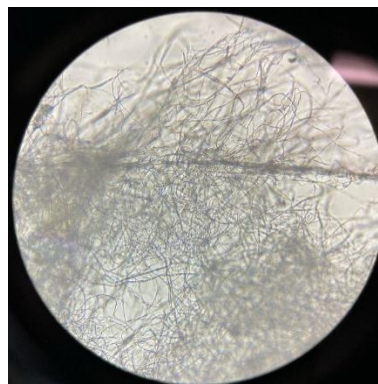
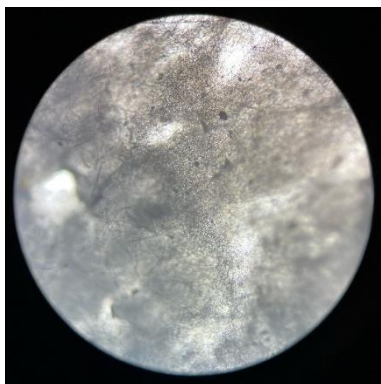
Cuadro 18. Superficies de las biopelículas de zeína bajo el microscopio óptico a 100x y 400x.

Sistema	100X	400X
S1		
S2		
S3		

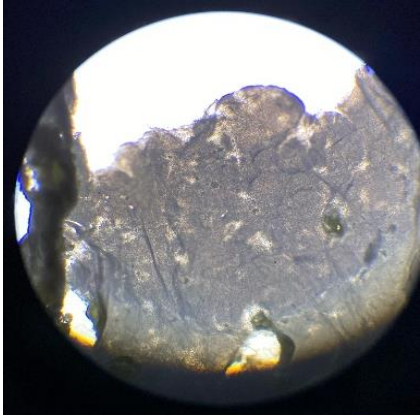
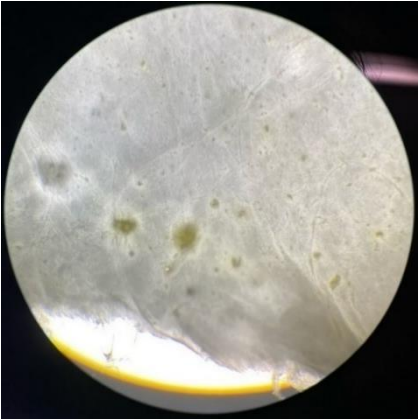
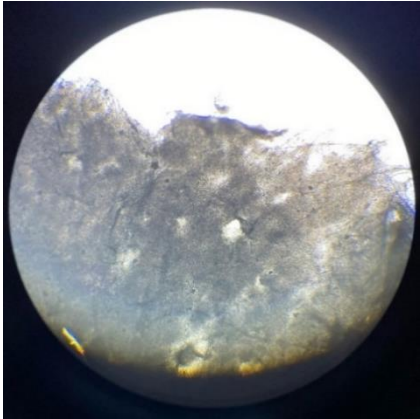
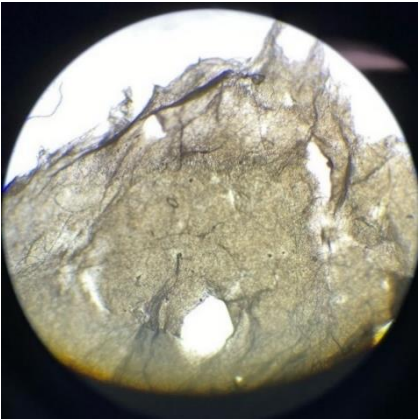
S4



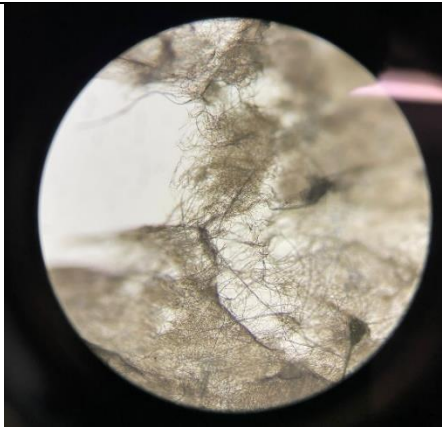
S5



Cuadro 19. Detalles superficiales de las biopelículas bajo el microscopio óptico a 40x

Sistema	40x	Sistema	40x
S1		S4	
S2		S5	
S3			

Cuadro 20. Superficies de las biopelículas de zeína-AgNP bajo el microscopio óptico a 40x, 100x y 400x.

Sistema	40X	100X
Zeína + AgNP		
		

VII. CONCLUSIONES

- Los extractos obtenidos del fruto del pirul exhiben una capacidad antioxidante destacada, alcanzando aproximadamente un 60 % de inhibición, y presentan un perfil de metabolitos secundarios rico en ácidos fenólicos, lo que les confiere la capacidad de formar nanopartículas de plata mediante una reacción de reducción metálica.
- Los extractos presentan una composición química abundante en ácido gálico y otros compuestos fenólicos con lo cual se permite explicar el mecanismo de síntesis y estabilización de nanopartículas de plata.
- La caracterización por DLS permitió determinar la distribución de tamaños de varios sistemas de síntesis, lo que condujo a la elección de una dilución 1:5 del extracto y una concentración de 2 mM de AgNO_3 como condiciones óptimas para obtener nanopartículas de plata con valores de R_H y PDI de calidad.
- La incorporación de nanopartículas de plata a la solución polimérica de zeína mejoró las propiedades conductoras de la solución, lo que promovió una mayor eficiencia en la formación de fibras.
- Las películas que contienen nanopartículas de plata muestran mejoras significativas en términos de espesor, humedad y solubilidad, lo que las hace adecuadas para su consideración en propuestas de empaques sostenibles.
- Una evaluación microbiológica podría proporcionar información relevante sobre la actividad de las nanopartículas sintetizadas frente al crecimiento de microorganismos que afectan la vida útil de los alimentos.
- Una caracterización más exhaustiva ayudaría a confirmar varios de los mecanismos físicos y químicos propuestos para la interacción entre las nanopartículas y la zeína.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 3, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>
- Ahari, H., & Soufiani, S. P. (2021). Smart and Active Food Packaging: Insights in Novel Food Packaging. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657233>
- Akbar, M. U., Huma, Z., Salman, M., Hussain, R., Zahoor, A. F., Mansha, A., Asim, S., & Zuber, M. (2020). Synthetic materials to bionanocomposites: An overview. In *Bionanocomposites: Green Synthesis and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816751-9.00001-5>
- Akbar, M. U., Rehman, F. U., Ibrahim, M., Barikani, M., Mohammadi, M., Sobhani, H., Mohammadi, A., & Farrukh, M. A. (2020). Processing methods of bionanocomposites. In *Bionanocomposites: Green Synthesis and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816751-9.00004-0>
- Alabdallah, N. M., & Hasan, M. M. (2021). Plant-based green synthesis of silver nanoparticles and its effective role in abiotic stress tolerance in crop plants. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 28, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.081>
- Alcântara, A. C. S., Aranda, P., Darder, M., & Ruiz-Hitzky, E. (2010). Bionanocomposites based on alginate-zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems. *Journal of Materials Chemistry*, 20(42). <https://doi.org/10.1039/c0jm01211d>
- Alehosseini, A., Gómez-Mascaraque, L. G., Martínez-Sanz, M., & López-Rubio, A. (2019). Electrospun curcumin-loaded protein nanofiber mats as active/bioactive coatings for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.056>
- Alizadeh-Sani, M., Moghaddas Kia, E., Ghasempour, Z., & Ehsani, A. (2021). Preparation of Active Nanocomposite Film Consisting of Sodium Caseinate, ZnO Nanoparticles and Rosemary Essential Oil for Food Packaging Applications. *Journal*

of Polymers and the Environment, 29(2). <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01906-5>

ASTM, D. (2004). ASTM D5229: Standard test method for moisture absorption properties and equilibrium conditioning of polymer matrix composite materials. Annu. Book ASTM Stand.15: 215-226.

Aytac, Z., Ipek, S., Durgun, E., Tekinay, T., & Uyar, T. (2017). Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging. *Food Chemistry*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.095>

Baila, G. L. (2018). Desarrollo de andamios fibrosos de policaprolactona, condroitín sulfato y ácido hialurónico para regeneración de cartílago. Zaragoza.

ben Hmed, M., Rigane, G., ben Salem, R., Zouari, N., & Cherif, S. (2020). Phytochemical and antioxydant activities of *schinus molle* l. extract. *Revue Roumaine de Chimie*, 65(2). <https://doi.org/10.33224/rrch.2020.65.2.06>

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 235, 337-351.

Brandelli, A. (2024). Nanocomposites and their application in antimicrobial packaging. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1356304>

Cádiz-Gurrea, M. L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gámez, M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of Theobroma cacao extract. *Journal of Functional Foods*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>

Colussi, R., Ferreira da Silva, W. M., Biduski, B., Mello El Halal, S. L., da Rosa Zavareze, E., & Guerra Dias, A. R. (2021). Postharvest quality and antioxidant activity extension of strawberry fruit using allyl isothiocyanate encapsulated by electrospun zein ultrafine fibers. *LWT*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111087>

Dias Antunes, M., da Silva Dannenberg, G., Fiorentini, Â. M., Pinto, V. Z., Lim, L. T., da Rosa Zavareze, E., & Dias, A. R. G. (2017). Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.095>

Díaz-de-Cerio, E., Tylewicz, U., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., & Romani, S. (2017). Design of Sonotrode Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Psidium guajava* L. Leaves. *Food Analytical Methods*, 10(8). <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0836-z>

Dubey, S. P., Thakur, V. K., Krishnaswamy, S., Abhyankar, H. A., Marchante, V., & Brighton, J. L. (2017). Progress in environmental-friendly polymer nanocomposite material from PLA: Synthesis, processing and applications. *Vacuum*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.07.009>

Erdogan, I., Demir, M., & Bayraktar, O. (2015). Olive leaf extract as a crosslinking agent for the preparation of electrospun zein fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(4). <https://doi.org/10.1002/app.41338>

Eryigit, T., Yildirim, B., Ekici, K., & Çirka, M. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Schinus molle* L. Essential Oil from Turkey. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(2). <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1304286>

Feriani, A., Tir, M., Mufti, A., Caravaca, A. M. G., Contreras, M. del M., Taamalli, A., Carretero, A. S., Aldawood, N., Nahdi, S., Alwasel, S., Harrath, A. H., & Tlili, N. (2021). HPLC–ESI–QTOF–MS/MS profiling and therapeutic effects of *Schinus terebinthifolius* and *Schinus mole* fruits: investigation of their antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Inflammopharmacology*, 29(2). <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00791-1>

Frey, M., Y. Joo, Y., Kim, C. W. (2003). New solvents for cellulose electrospinning and preliminary nanofiber spinning results. *Polymer Preprints*. 44(2): 168.

Grand View Research. (2019). Corn Fiber Market Size & Share | Industry Report, 2020-2027.

Guala, M. S., Elder, H. v, Perez, G., & Chiesa, A. (2009). Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por Destilación al Vacío. *Información Tecnológica*, 20(2). <https://doi.org/10.4067/s0718-07642009000200011>

Han, S. O., Son, W. K., Youk, J. H., & Park, W. H. (2008). Electrospinning of ultrafine cellulose fibers and fabrication of poly(butylene succinate) biocomposites reinforced

by them. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(3).
<https://doi.org/10.1002/app.26643>

Hottle, T. A., Bilec, M. M., & Landis, A. E. (2013). Sustainability assessments of bio-based polymers. In *Polymer Degradation and Stability* (Vol. 98, Issue 9).
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.016>

Huang, H., & Yang, Y. (2008). Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions. *Composites Science and Technology*, 68(14).
<https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2007.10.003>

Kapuccinska, A., & Nowak, I. (2016). Silver nanoparticles as a challenge for modern cosmetology and pharmacology. In *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42868-2.00015-2>

Karim, M., Fathi, M., & Soleimanian-Zad, S. (2020). Incorporation of zein nanofibers produced by needle-less electrospinning within the casted gelatin film for improvement of its physical properties. *Food and Bioproducts Processing*, 122.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.006>

Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M. N., & Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1927). <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0175>

Kowsalya, E., MosaChristas, K., Balashanmugam, P., Manivasagan, V., Devasena, T., & Jaqueline, C. R. I. (2021). Sustainable use of biowaste for synthesis of silver nanoparticles and its incorporation into gelatin-based nanocomposite films for antimicrobial food packaging applications. *Journal of Food Process Engineering*, 44(3). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13641>

Kriegel, C., Arrechi, A., Kit, K., McClements, D. J., & Weiss, J. (2008). Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(8).
<https://doi.org/10.1080/10408390802241325>

Lawton, J. W. (2002). Zein: A history of processing and use. In *Cereal Chemistry* (Vol. 79, Issue 1). <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.1>

Li, D., Liu, Z., Yuan, Y., Liu, Y., & Niu, F. (2015). Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells. *Process Biochemistry*, 50(3). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.002>

Lousiana State University. (s.f). What Is The Hydrodynamic Radius?. Macromolecular Studies Group. What is the hydrodynamic radius.pdf (lsu.edu)

Lunkov, A., Shagdarova, B., Konovalova, M., Zhuikova, Y., Drozd, N., Il'ina, A., & Varlamov, V. (2020). Synthesis of silver nanoparticles using gallic acid-conjugated chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115916>

Martins, M. D. R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., & Cruz-Morais, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.063>

Melkamu, W. W., & Bitew, L. T. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel plant leaf extract and their antibacterial and antioxidant activities. *Heliyon*, 7(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08459>

Molski, M. (2023). Theoretical study on the radical scavenging activity of gallic acid. *Heliyon*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12806>

Mushtaq, A., Roobab, U., Denoya, G. I., Inam-Ur-Raheem, M., Gullón, B., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Zeng, X. A., Wali, A., & Aadil, R. M. (2020). Advances in green processing of seed oils using ultrasound-assisted extraction: A review. In *Journal of Food Processing and Preservation* (Vol. 44, Issue 10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14740>

Nobbmann, U. (2017). Intensity-Volume-Number: Which size is correct?. Malvern Panalytical. Intensity-Volume-Number: Which size is correct? | Malvern Panalytical.

Perera, K. Y., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2022). A review on nanomaterials and nanohybrids based bio-nanocomposites for food packaging. In *Food Chemistry* (Vol. 376). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131912>

Poulat, F., Reutenauer, P. (2021). U.S. Patent No. 11,028,221. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Qazanfarzadeh, Z., & Kadivar, M. (2016). Properties of whey protein isolate nanocomposite films reinforced with nanocellulose isolated from oat husk.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.077>

Rahman, M., Dip, T. M., Haase, T., Truong, Y. B., Le, T. C., & Houshyar, S. (2023). Fabrication of Zein-Based Fibrous Scaffolds for Biomedical Applications—A Review. In *Macromolecular Materials and Engineering* (Vol. 308, Issue 12). <https://doi.org/10.1002/mame.202300175>

Ramakrishna, S. (2005). An introduction to electrospinning and nanofibers. World scientific.

Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Shah, S. A. A., Tripathy, M., & Paliwal, N. (2019). Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of *Parkia speciosa* leaves extract mediated silver nanoparticles. *Results in Physics*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102565>

Rojas, J., Bedoya, M., & Ciro, Y. (2015). Current Trends in the Production of Cellulose Nanoparticles and Nanocomposites for Biomedical Applications. In *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends*. <https://doi.org/10.5772/61334>

Salazar-Aranda, R., Pérez-Lopez, L. A., Lopez-Arroyo, J., Alanís-Garza, B. A., Waksman de Torres, N. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>

Sánchez-Quezada, V., Gaytán-Martínez, M., Recio, I., & Loarca-Piña, G. (2023). Avocado seed by-product uses in emulsion-type ingredients with nutraceutical value: Stability, cytotoxicity, nutraceutical properties, and assessment of in vitro oral-gastric digestion. *Food Chemistry*, 421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136118>

Shahbandeh, M. (2024). Food packaging industry worldwide - statistics & facts. Food packaging industry worldwide - statistics & facts | Statista

Shi, J., Zhang, R., Liu, X., Zhang, Y., Du, Y., Dong, H., Ma, Y., Li, X., Cheung, P. C. K., & Chen, F. (2023). Advances in multifunctional biomass-derived nanocomposite films for active and sustainable food packaging. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 301). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120323>

Shimpi, N. G. (2017). Biodegradable and biocompatible polymer composites: Processing, properties and applications. In *Biodegradable and Biocompatible*

Polymer Composites: Processing, Properties and Applications.
<https://doi.org/10.1016/C2015-0-05524-1>

Soares, R. M. D., Siqueira, N. M., Prabhakaram, M. P., & Ramakrishna, S. (2018). Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 92).
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.004>

Son, W. K., Youk, J. H., & Park, W. H. (2004). Preparation of ultrafine oxidized cellulose mats via electrospinning. *Biomacromolecules*, 5(1).
<https://doi.org/10.1021/bm034312g>

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

Song, Y., Li, R., Sun, Q., & Jin, P. (2011). Controlled growth of Cu nanoparticles by a tubular microfluidic reactor. *Chemical Engineering Journal*, 168(1).
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.059>

Soto, K. M. (2018). Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas con amplio espectro antimicrobiano como alternativa de empaque activo. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1129>

Tesfaye, M., Gonfa, Y., Tadesse, G., Temesgen, T., & Periyasamy, S. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles using Vernonia amygdalina plant extract and its antimicrobial activities. *Heliyon*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17356>

Tlili, N., Yahia, Y., Feriani, A., Labidi, A., Ghazouani, L., Nasri, N., Saadaoui, E., & Khaldi, A. (2018). *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. *Industrial Crops and Products*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.080>

Tortorella, S., Maturi, M., Vetri Buratti, V., Vozzolo, G., Locatelli, E., Sambri, L., & Comes Franchini, M. (2021). Zein as a versatile biopolymer: different shapes for different biomedical applications. In *RSC Advances* (Vol. 11, Issue 62).
<https://doi.org/10.1039/d1ra07424e>

Vinicius de Oliveira Brisola Maciel, M., da Rosa Almeida, A., Machado, M. H., Elias, W. C., Gonçalves da Rosa, C., Teixeira, G. L., Noronha, C. M., Bertoldi, F. C., Nunes,

- M. R., Dutra de Armas, R., & Manique Barreto, P. L. (2020). Green synthesis, characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles mediated by essential oils as reducing agents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101746>
- Wang, Q., Chen, W., Zhu, W., McClements, D. J., Liu, X., & Liu, F. (2022). A review of multilayer and composite films and coatings for active biodegradable packaging. In *npj Science of Food* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00132-8>
- Wang, W., Chen, Q., Jiang, C., Yang, D., Liu, X., & Xu, S. (2007). One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.12.037>
- Wang, X., & Cao, Y. (2020). Characterizations of absorption, scattering, and transmission of typical nanoparticles and their suspensions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.10.030>
- Wang, X., Li, X., Xue, J., Zhang, H., Wang, F., & Liu, J. (2022). Mechanistic understanding of the effect of zein–chlorogenic acid interaction on the properties of electrospun nanofiber films. *Food Chemistry: X*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100454>
- Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12). <https://doi.org/10.1021/jf101077s>
- Wen, H. F., Yang, C., Yu, D. G., Li, X. Y., & Zhang, D. F. (2016). Electrospun zein nanoribbons for treatment of lead-contained wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 290. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.055>
- Yao, F., Gao, Y., Chen, F., & Du, Y. (2022). Preparation and properties of electrospun peanut protein isolate/poly-L-lactic acid nanofibers. *LWT*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112418>
- Youssef, A. M., Abdel-Aziz, M. S., & El-Sayed, S. M. (2014). Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by *Bacillus Subtilis* as packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.047>

- Zhang, C. L., & Yu, S. H. (2014). Nanoparticles meet electrospinning: Recent advances and future prospects. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 43, Issue 13). <https://doi.org/10.1039/c3cs60426h>
- Zhang, Y. Z., Feng, Y., Huang, Z. M., Ramakrishna, S., & Lim, C. T. (2006). Fabrication of porous electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 17(3). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/3/047>
- Zhang, Y., Cui, L., Che, X., Zhang, H., Shi, N., Li, C., Chen, Y., & Kong, W. (2015). Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 206). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.030>
- Zhao, X., Cornish, K., & Vodovotz, Y. (2020). Narrowing the Gap for Bioplastic Use in Food Packaging: An Update. In *Environmental science & technology* (Vol. 54, Issue 8). <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03755>
- Zubair, M., & Ullah, A. (2020). Recent advances in protein derived bionanocomposites for food packaging applications. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1534800>