



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Evaluar el efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) en condiciones in vitro
de *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.***

Pintado Jiménez, Julissa Valeria.

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura.

Ingeniería en Biotecnología.

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de ingeniería de
biotecnología.

PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

25 de agosto del 2023

Reporte de Verificación



Plagiarism report

Tesis revision-Julissa Pintado..pdf

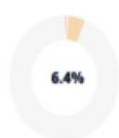
Scan details

Scan time:
August 25th, 2023 at 5:3 UTC

Total Pages:
66

Total Words:
16464

Plagiarism Detection



Types of plagiarism	Words	Percentage
Identical	97	0.6%
Minor Changes	49	0.3%
Paraphrased	860	5.2%
Omitted Words	739	4.5%

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text

🔍 Plagiarism Results: (28)

🌐 Análisis de la síntesis química y verde de nanoparti... 1.3%

<https://docplayer.es/233561419-analisis-de-la-sintesis-quimi...>

[Iniciar la sesión ...](#)



PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

Director



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluar el efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) en condiciones *in vitro* de *Phalaenopsis sp.*, y *Guzmania sp.* ”** fue realizado por la señorita estudiante **Pintado Jiménez Julissa Valeria**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 25 de agosto del 2023

Firma:



PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

C. C.: 1709384422



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Pintado Jiménez Julissa Valeria**, con cédula/cédulas de ciudadanía N° 230012777-2, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Evaluar el efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) en condiciones *in vitro* de *Phalaenopsis sp.*, y *Guzmania sp.*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 25 de agosto del 2023

Firma

.....
Pintado Jiménez Julissa Valeria

C.C.: 2300177272



Departamento de Ciencia de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo Pintado Jiménez Julissa Valeria , con cédula de ciudadanía n° 2300177272, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Evaluar el efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) en condiciones *in vitro* de *Phalaenopsis sp.*, y *Guzmania sp.***" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 25 de agosto del 2023

Firma

Pintado Jiménez Julissa Valeria

C.C.:2300177272

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación va dirigido con mucho cariño a mis padres María de los Ángeles Jiménez Gaona y Daniel Armando Pintado Morales, quienes han trabajado incansablemente por brindarme el mejor regalo que es la educación, su amor y confianza me impulsaron a seguir adelante, a recordar quien soy y quien quiero ser, así que hoy les retribuyo en parte todo lo que ellos han sembrado en mí.

A mis hermanos Cristian Eduardo Quiroz Jiménez y Diego Armando Pintado Jiménez que son la razón de mis alegrías, quienes siempre estuvieron conmigo apoyándome e impulsándome.

A mi abuelita Carmen Gaona Jiménez y mis tíos Víctor Hugo Moreno y Manuel Jiménez que son personas esenciales en mi vida que me han regalado momentos maravillosos y nunca dudaron de mí.

A mi mejor amiga, mi hermana Alisson Daniela Pintado Jiménez quiero darte las gracias por todo el apoyo, ánimos y por esta siempre a mi lado, por cuidarme y estar conmigo ante cualquier circunstancia "te amo mucho" mi muñeca. Al final, las personas que amamos, son lo único que importa en esta vida.

Agradecimiento

Quiero extender mis agradecimientos a los docentes que conforman la ESPE-Santo Domingo por todos los conocimientos impartidos durante el transcurso de mi carrera universitaria para mi formación profesional de ingeniera en biotecnología.

Al laboratorio servicios biotecnológicos “AGROBIOTECH” , Quito-Ecuador a cargo del Ing. Pablo Aníbal Landázuri por abrirme las puertas de su establecimiento en calidad de pasante y tesista extendiendo mis agradecimientos por todo el apoyo, enseñanza, paciencia y sobretodo por impulsar sin limitaciones la investigación a sus estudiantes, así mismo quiero agradecer a la técnica de laboratorio María Alexsandra Castillo Dávalos y al encargado del invernadero Guillermo Velasco Vilaña por brindarme una de las experiencias más gratas, por todos los momentos compartidos y sus conocimientos que fueron fructíferos para finalizar mi trabajo de titulación.

A la empresa “ECOLAC”, Loja-Ecuador y a cada uno de sus miembros de trabajo por permitirme ampliar más mis conocimientos, vivir experiencias, construir amistades y agradecida por la acogida durante mi estancia.

A mi tutora Dra. Naranjo Gaybor, Sandra Judith, Mgtr. Francisco Suasnabas y Dr. Christian Camacho por las asesorías en bases a sus experiencias que me han ayudado a concluir una etapa más en mi vida.

A mis amigos Richard, Lili, Jefferson, Jenny, Katherine, Erika, Carlos, Elvis, Máximo, Miguelito, Melani, Emilio, Alexandra, Geovanny, Marcelo, Mario, Jean Pierre, Zahira, Gabriel y conocidos que me han regalado momentos increíbles llenos de anécdotas y recuerdos maravillosos que nunca olvidare.

Finalmente quiero agradecer a Haider Cuello por sus conocimientos en diseño experimental y sus sabias palabras que han sido muy gratificantes y valiosas para mí.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte de Verificación	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de Tablas	13
Índice de Figuras	15
Lista de abreviaturas	17
Resumen.....	18
Abstract	19
Capítulo I.....	20
Antecedentes.....	20
Planteamiento del problema.....	22
Justificación	23
Objetivos de la investigación.....	25
Objetivos generales.....	25

Objetivos específicos.....	25
Planteamiento de hipótesis	25
Capítulo II	26
Nanociencia y nanotecnología	26
Nanomateriales	26
Nanopartículas metálicas	28
Síntesis de Nanopartículas metálicas	29
Camellia sinensis (té verde).....	30
Nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) características y propiedades.....	32
Aplicaciones de las nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>)	33
Métodos de caracterización de nanomateriales.	34
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	34
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	35
Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis).....	36
Difracción de rayos X (DRX).....	37
Phalaenopsis sp.....	38
Guzmania sp.....	40
Cultivo de tejido vegetal	41
Etapa 0: Selección de la planta madre	42
Etapa 1: Establecimiento del cultivo in vitro	42
Etapa 2: Multiplicación.....	42

	10
Etapa 3: Enraizamiento	43
Etapa 4: Adaptación	43
Componentes del medio de cultivo	43
Reguladores de crecimiento	44
Capítulo III	45
Ubicación del lugar de investigación	45
Ubicación política, geográfica y ecológica	45
Materiales y métodos.	47
Método verde	49
Preparación de la muestra de AgNPs para su caracterización	50
Métodos de caracterización de las nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>).....	51
Micropropagación <i>in vitro</i> "Agrobiotech"	53
Selección y aislamiento de las orquídeas (<i>Phalaenopsis</i> sp.) y bromelias (<i>Guzmania</i> sp.)	53
Método de desinfección superficial de la <i>Phalaenopsis</i> sp., y <i>Guzmania</i> sp.....	53
Polinización de la orquídea <i>Phalaenopsis</i> sp.....	54
Medio de cultivo.....	55
Etapa de germinación de la <i>Phalaenopsis</i> sp y <i>Guzmania</i> sp.....	57
Etapa de multiplicación de las especies <i>Phalaenopsis</i> sp., y <i>Guzmania</i> sp	58
Etapa de enraizamiento de las especies <i>Phalaenopsis</i> sp., y <i>Guzmania</i> sp.	58
Determinación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) en los explantes de <i>Phalaenopsis</i> sp. y <i>Guzmania</i> sp.	58

Preparación de las soluciones de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>).....	58
Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) en explantos de <i>Phalaenopsis</i> sp. y <i>Guzmania</i> sp.	59
Etapa de aclimatación de las <i>Phalaenopsis</i> sp. y <i>Guzmania</i> sp.....	59
Preparación del sustrato.....	59
Diseño experimental	60
Efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>)	60
Factores de estudio y niveles de experimento	62
Comparación de los tratamientos.	63
Tipo de diseño experimental	64
Análisis estadístico	64
Capítulo IV.....	66
Síntesis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>).....	66
Caracterización de (<i>AgNPs</i>) de espectroscopia UV-Vis	66
Difracción de rayos X (XRD).....	67
Microscopía electrónica de barrido (SEM) y (EDS).....	68
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	70
Efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata ((<i>AgNPs</i>)).....	72
Análisis de varianza en el largo de la hoja (mm)	74
Análisis de Krus Kall respecto al # de hoja de las especies de <i>Phalaenopsis</i> sp. y <i>Guzmania</i> sp.....	82

Análisis de Krus Kall respecto al # de raíces de las especies de Phalaenopsis sp. y Guzmania sp	84
Características cualitativas de las especies Guzmania sp., y Phalaenopsis sp.....	86
Capítulo V.....	90
Caracterización morfológica de las (<i>AgNPs</i>).....	90
Determinación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata <i>AgNPs</i>	92
Efecto de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) con respecto al desarrollo fenotípico ..	93
Capítulo VI.....	96
Bibliografía.	98

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los nanomateriales por sus dimensiones.	28
Tabla 2. Equipos, materiales, reactivos y muestras para la síntesis verde de (<i>AgNPs</i>) con su respectiva caracterización, preparación del medio Murashige Skoog y su etapa de aclimatación de las <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>	48
Tabla 3 Componente del medio basal Murashige Skoog para las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>	56
Tabla 4 Fitohormonas aplicadas en los explantes de <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>	58
Tabla 5 Evaluación del desarrollo fenotípico de las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>	59
Tabla 6 Sustratos aplicados en la aclimatación de las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>	60
Tabla 7 Datos obtenidos del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) en la etapa in vitro de los explantes de <i>Guzmania sp.</i> , y <i>Phalaenopsis sp.</i>	61
Tabla 8 Factores de niveles a probar en el estudio de las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i> , dosis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) y desarrollo fenotípico.....	62
Tabla 9 Tratamientos a comparar en el estudio de las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i> , dosis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) y desarrollo fenotípico.....	63
Tabla 10 Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i> , dosis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) y desarrollo fenotípico.	64
Tabla 11 Análisis de varianza para evaluar el largo de la hoja después de 22, 25 y 30 días, ($P < 0,05$).	74
Tabla 12 Tukey ($P < 0,05$) aplicado al tipo de especie.....	75

Tabla 13 Tukey ($P < 0,05$) aplicando las dosis de (<i>AgNPS</i>).	76
Tabla 14 Tukey ($P < 0,05$) aplicando el desarrollo fenotípico.....	78
Tabla 15 Tukey ($P < 0,05$) interacción AB: tipo de especies*dosis de (<i>AgNPS</i>).	79
Tabla 16 Tukey ($P < 0,05$) interacción AC: tipo de especie* desarrollo fenotípico.	80
Tabla 17 Tukey ($P < 0,05$) interacción BC: Dosis de (<i>AgNPS</i>)*desarrollo fenotípico. ...	81
Tabla 18 Krus Kall ($P < 0,05$) con respecto al número de hoja.	82
Tabla 19 Krus Kall ($P < 0,05$) determinación del número de raíces.	84
Tabla 20 Análisis cualitativo respecto a la fisiológica externa de <i>Guzmania sp.</i> , y <i>Phalaenopsis sp.</i>	86

Índice de Figuras

Figura 1. Camelia sinesis.....	32
Figura 2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	35
Figura 3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	36
Figura 4 Espectrofotómetro UV-Vis.....	37
Figura 5 Equipo de difracción de rayos X.....	38
Figura 6 Phalaenopsis sp.....	39
Figura 7 Guzmania sp.....	41
Figura 8 (Google-maps, 2023)	45
Figura 9 (Google-maps, 2023)	46
Figura 10 (Google-maps, 2023).	47
Figura 11 Procesador ultrasonido con un voltaje de 110v.	50
Figura 12 Preparación de muestras para la caracterización de <i>AgNPs</i>	51
Figura 13 Obtencion de los meristemos apicales de <i>Guzmania sp.</i>	54
Figura 14 Polinización de <i>Phaelenopsis sp.</i>	55
Figura 15 Protocolo de germinación de <i>Phalaenopsis sp.</i>	57
Figura 16 Síntesis de nanoparticulas de plata (<i>AgNPs</i>).....	66
Figura 17 Espectrofotometría de Uv-vis.	67
Figura 18. Difracción de rayos X de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>).	68
Figura 19 Micrografía del <i>SEM</i> y análisis químico elemental de (<i>AgNPs</i>)	69
Figura 20 Caracterización de la plata (<i>AgNPs</i>) en el mapeo elemental.....	70
Figura 21 Micrografía usando <i>TEM</i> para la determinar el tamaño de las (<i>AgNPs</i>).	71
Figura 22 Tamaño de las (<i>AgNPs</i>) por <i>TEM</i>	71
Figura 23 Contaminación microbiana de las especies <i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>	73

Figura 24 Análisis del largo de la hoja (mm) con respecto al factor A: tipo de especie (<i>Phalaenopsis sp.</i> y <i>Guzmania sp.</i>).....	75
Figura 25 Análisis del largo de la hoja con respecto al factor B: dosis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>)	77
Figura 26 Análisis del largo de la hoja en el factor C: desarrollo fenotípico.....	78
Figura 27 Análisis de la interacción AB: factor A= tipo de especies * factor B=dosis de (<i>AgNPS</i>).	80
Figura 28 Evaluación del # de hojas de las especies <i>Guzmania sp.</i> , y <i>Phalaenopsis sp.</i> , respecto a la dosis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) y el desarrollo genotípico.....	83
Figura 29 Evaluación del # de raíces en las especies de <i>Guzmania sp.</i> , y <i>Phalaenopsis sp.</i> , respecto a la dosis de nanopartículas de plata (<i>AgNPs</i>) y el desarrollo fenotípico.	85
Figura 30 Fisiología de las hojas de <i>Guzmania sp.</i>	87
Figura 31 Fisiología de las hojas de <i>Phalaenopsis sp.</i>	88
Figura 32 Fisiología de las raíces de <i>Phalaenopsis sp.</i>	89
Figura 33 Fisiología de la especie <i>Guzmania sp.</i>	89

Lista de abreviaturas

NP	Nanopartículas.
SWCNT	Nanotubos de carbono de pared simple.
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
AgNPs	Nanopartículas de plata.
UICN	Unión internacional para la conservación de la naturaleza.
SPR	Resonancia de plasmones superficiales.
EDS	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva.
EELS	Espectroscopia de pérdida de energía de electrones.
Eg	Banda prohibida.
DRX	Difracción de rayos X.
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta visible.
PGR	Regulador de crecimiento en plantas.
IAA	Ácido indolacético.
IBA	Ácido indolebutírico.
NAA	Ácido naftalenacético.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
BA	Benciladenina
CA	Carbón activado.
nm	Nanómetros.
rpm	Revoluciones por minuto
FWHM	anchura a media altura que presenta un determinado pico de emisión.

Resumen

Hoy en día las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) han sido estudiadas por sus propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y antimicrobianas. El presente estudio consiste en evaluar el efecto de las ($AgNP_s$) en explantes de *Guzmania sp.*, y *Phaellenopsis sp.*, en condiciones *in vitro*. Se aplicó una síntesis verde usando el extracto de las hojas de té verde (*Camellia sinensis sp.*) para la obtención de ($AgNP_s$), utilizando los métodos de caracterización: espectrofotometría UV-vis, difracción de rayos (DRX), espectroscopia de rayos x de energía dispersiva (EDS), microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) se comprobó la presencia de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) con un tamaño de diámetro $44,35 \text{ nm} \pm 4,032 \text{ nm}$ y su forma esférica. Para evaluar su efecto antimicrobiano se evaluó mediante un gráfico de dispersión, respecto al desarrollo fenotípico se aplicaron dosis de 25 mg/L^{-1} , 50 mg/L^{-1} , 75 mg/L^{-1} y 100 mg/L^{-1} de ($AgNP_s$), con un diseño trifactorial para determinar el largo de las hojas de las especies *Guzmania sp.*, y *Phaellenopsis sp.*, y la prueba Krus Kall para evaluar el número de hojas y raíces. Las ($AgNP_s$), no presentaron contaminación en las dosis establecidas solo el control. Las dosis de 75 mg/L^{-1} , 25 mg/L^{-1} y 50 mg/L^{-1} tuvieron mejores resultados respecto al largo de la hoja, los brotes y raíces, se concluyó que las ($AgNP_s$) evitan la contaminación de los explantes por microorganismos y influye en el desarrollo fenotipo.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, *Guzmania sp.*, *Phaellenopsis sp.*, té verde, nitrato de plata

Abstract

Today silver nanoparticles (AgNPs), have been studied for their optical, magnetic, electrical and antimicrobial properties. The present study consists of evaluating the effect of (AgNPs), on explants of *Guzmania* sp., and *Phaellenopsis* sp., under in vitro conditions. A green synthesis was applied using the extract of green tea leaves (*Camellia sinensis* sp.) to obtain (AgNPs), using the characterization methods: UV-vis spectrophotometry, ray diffraction (DRX), x-ray spectroscopy. Energy dispersive microscopy (EDS), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) confirmed the presence of silver nanoparticles (AgNPs) with a diameter of $44.35 \text{ nm} \pm 4.032 \text{ nm}$ and its spherical shape. To evaluate its antimicrobial effect, it was evaluated using a scatter graph, regarding phenotypic development, doses of 25 mg/L^{-1} , 50 mg/L^{-1} , 75 mg/L^{-1} and 75 mg/L^{-1} the (AgNPs), with a trifactorial design to determine the length of the leaves of the species *Guzmania* sp., and *Phaellenopsis* sp., and the Krus Kall test to evaluate the number of leaves and roots. The (AgNPs), did not present contamination in the established doses, only the control. The doses of 75 mg/L^{-1} , 25 mg/L^{-1} and 50 mg/L^{-1} had better results regarding the length of the leaf, the shoots and roots, it was concluded that the (AgNPs), prevent contamination of explants by microorganisms and influence phenotype development.

Keywords: Silver nanoparticles, *Guzmania* sp., *Phaellenopsis* sp., green tea, silver nitrate

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

En el siglo IV d.C las nanopartículas han sido utilizadas por los romanos, desencadenando el interés de la nanotecnología en el mundo antiguo “ La copa Lycurgus” (Bayda et al., 2019). En 1990 los científicos utilizaron microscopía electrónica de transmisión (TEM) para explicar el fenómeno de dicroísmo en la cual se identificó la presencia NP_s de 50 a 100 nm de diámetro mientras que el análisis de rayos X determinó la presencia de aleaciones de $AgNP_s$ y $AuNP_s$ que provoca el cambio de color de verde a rojo púrpura al estar en contacto con la luminosidad (Chávez Jácome, 2021).

El físico Richard Feynman es considerado el padre de la nanotecnología moderna por su discurso “Hay mucho espacio en el fondo” en 1959 (Bayda et al., 2019). En el 2002 se reporta el primer estudio de nanopartículas de oro a partir de la alfalfa (*Medicago sativa*) con un tamaño aproximadamente de 2 a 20 nm, otros aportes evidencian que se pueden obtener nanopartículas de plata (AgNPs) de la misma planta al estar expuesta con un precursor metálico (Esquivel, 2021).

El té se descubrió por primera vez en el año 3000 a.C en China tiempo después se extendió a Asia (Wong & Sirisena, 2022). El té chino se conocen seis tipos: blanco, verde, rojo, oolong, oscuro y amarillo, los cuales se diferencian por su color de hojas, sabor y el aroma de infusión que es producido por los compuestos aromáticos que representan alrededor del 0,01% de masa seca (Hu & Lin, 2022). Por medio de embarcaciones se introdujeron las semillas de té en América del Norte a finales del siglo XVIII (D'Auria & Cohen, 2022).

En el siglo XX, el investigador Gottlieb Haberlandt realizó experimentos de células mesófilas a partir de postulados de potencialidad totipotencia de las células vegetales (Hasnain & Hasan Naqvi, 2022). Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten producir plantas libres de enfermedades,

rápida multiplicación, transformación genómica, producción de metabolitos secundarios y conservación de la biodiversidad genética (Espinosa Leal & Puente Garza, 2018).

Las orquídeas pertenecen a la familia de las Orchidaceas, siendo consideradas como las plantas más evolucionadas dentro de las angiospermas, se estiman que poseen 800 géneros y 25 000 especies, las cuales se diferencian por su hábito en: epífitas y terrestres que se han distribuido por todo el mundo (Hsiao et al., 2011). Ecuador es denominado el país de las orquídeas debido a su alta biodiversidad, su distribución comprende las cuatro regiones y 51 áreas protegidas. Se estima que alrededor de 4.300 especies de orquídeas se encuentran en Ecuador, lo que equivale al 18% en todo el mundo (Sánchez Macías & Rodríguez Gutiérrez, 2018). El interés en su estudio se ha intensificado por su historia de vida, síndromes de polinización, variedades exóticas y su morfología floral y vegetativa (Segun Fay & Chase, 2009).

La familia de las bromeliaceae incluye 3403 especies de plantas vasculares las cuales están conformadas por 56 géneros y 2600 especies (Balke & Gómez Zurita, 2008). En el territorio ecuatoriano se han registrado 490 especies repartidas en 17 géneros de las cuales 152 son endémicas según el libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador (Manzanares, 2023). Comúnmente son plantas epífitas sin embargo, para sobrevivir acumulan agua y nutrientes en su roseta lo que ha permitido la formación de microecosistemas acuáticos. La lista roja de especies amenazadas de la UICN en 2017 manifiesta que existen 146 especies de bromelias de las cuales 13 especies están en peligro de extinción, debido especialmente a la pérdida de hábitats forestales (Ladino & Ospina Bautista, 2019). El tiempo de fertilidad de las bromelias está entre los 9 a 18 años de vida dependiendo de la especie por lo tanto se consideran plantas longevas de crecimiento lento (Balke & Gómez Zurita, 2008).

Planteamiento del problema

Comúnmente los métodos más aplicados para la síntesis de nanopartículas son los químicos que involucran el uso de reactivos tóxicos, volátiles y peligrosos, lo que implica un riesgo para el ser humano. Según Quintana San José & Zugasti Macazaga, (2015) considera que las principales vías de exposición son inhalatoria, dérmica y oral. Además a largo plazo estos reactivos pueden desencadenar consecuencias negativas en la salud alterando el sistema inmune, problemas respiratorios, toxicidad y cáncer entre otros. A nivel económico los métodos físicos requieren de una alta inversión para la producción de nanopartículas debido a que se requiere el uso de equipos y tecnología especializada que se considera un recurso limitante (Zanella, 2021). Por esta razón el uso de procesos más amigables con el ambiente como el uso de una matriz orgánica resulta mucho más atractiva.

Para la producción de plantas a gran escala en condiciones *in vitro* se requiere estandarizar protocolos de desinfección, los compuestos químicos que comúnmente se usan son: el hipoclorito de sodio ($NaClO$) y cloruro de mercurio ($HgCl_2$), que resultan poco eficientes y tóxicos. Por otro lado, Bruna & Jara, (2021) manifiesta que el uso de antibióticos como la gentamicina, tetraciclina, estreptomycin y vancomicina ayuda a combatir la contaminación de los explantes, sin embargo las bacterias gram negativas y positivas pueden generar resistencia y finalmente es necesario un buen manejo de esterilización y siembra de explantes para evitar contaminación cruzada que pueda afectar las etapas de crecimientos, desarrollo y producción de plantas en condiciones controladas (Permadi & Nurzaman, 2023).

Para evitar la contaminación microbiana es fundamental una excelente propagación de explantes *in vitro* considerando varios factores como: el medio de cultivo, reguladores de crecimientos, la edad y el tipo de planta (Mohammad & Yadollahi, 2014). Se han registrado grandes pérdidas de contaminación por organismos endófitos y epifitos que causan pérdidas severas en los explantes en la etapa de crecimiento afectando las tasas de multiplicación y enraizamiento (Harleen & Salwan, 2012). La contaminación de explantes produce disminución

en la capacidad regenerativa, reducción del crecimiento de callos, brotes y la mortalidad de explantes que generan pérdidas económicas (Permadi & Nurzaman², 2023).

La aclimatación *ex vitro* es la fase final de las plantas que deben adaptarse para sobrevivir, existen varios parámetros que se deben considerar como: estrés hídrico, cambios de temperatura, intensidad de luz que puede generar marchitez, déficit de nutrientes, tipos sustratos, enfermedades, plagas y el manejo del trasplantes (Kshitij, 2012). Según Teixeira da Silva & Hossain, (2017) describen que un mal manejo de aclimatación puede modificar la morfología, fisiología y teniendo como resultado una alta mortalidad de plántulas en la etapa final. Por lo cual se requiere el uso de protocolos de aclimatación sin embargo el método variaría dependiendo del tipo de especie vegetal a aclimatar (Kshitij, 2012).

Justificación

La nanotecnología ha evolucionado ampliamente en el campo de la investigación con respecto a las propiedades y aplicaciones de los nanomateriales en diferentes áreas como: biomedicina, agricultura, química, textil e industria alimentaria (Esquivel, 2021). La síntesis biológica de nanopartículas se describe como un método eficiente, rápido, sencillo y económico, el cual ha permitido desarrollar procedimientos libres de compuestos tóxicos y peligrosos que son perjudiciales en el ambiente y la salud (Alarcón & Zúñiga, 2022).

Para lograr la biosíntesis de nanopartículas que se caracterizan por poseer una alta solubilidad, rendimiento y estabilidad es necesario utilizar extractos de plantas que cumplan las siguientes características como: ser un buen agente estabilizante, reductor y antioxidante (Bruna & Maldonado Bravo, 2021). Según Pilaquina *et al.*, (2019) en los últimos 30 años se ha estudiado más a profundidad la composición, propiedades, beneficios y aplicaciones que poseen las plantas. Existen varios estudios que, Yin & Zhang, (2020) han evidenciado varios trabajos enfocados en la síntesis de nanopartículas de plata provenientes de la biomasa muerta, en especial de plantas como: té verde (*Camellia sinensis*), nopal (*Opuntia sp.*), manzana (*Malus domestica*), mora de castilla (*Rubus glaucus*), cilantro (*Coriandrum sativum*), ajo (*Allium sativum*)

y guanábana (*Annona muricata*) los cuales varían según su morfología y tamaño (Esquivel, 2021).

García Soqui, (2016) describió que los grupos -OH y -COOH que conforman las estructuras de los polifenoles intervienen en la reducción de los iones metálicos lo cual está relacionado con el tamaño de la partícula y la estabilidad de las nanoestructuras. Las nanopartículas de plata (*AgNPs*) contienen propiedades antimicrobianas y ópticas por lo tanto su efecto va a depender del volumen y el área de superficie. Se ha comprobado que las *AgNPs* poseen una actividad antifúngica, antiinflamatoria, antiviral, antiangiogénica y antiplaquetaria (Loo & Chieng, 2012). Las bacterias gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano que reduce la penetración de las nanopartículas metálicas mientras que las bacterias gram negativas contiene una capa delgada de peptidoglicano lo que las hace más susceptibles, sin embargo es necesario considerar un tamaño menor a 10 nm lo cual puede alterar fácilmente la permeabilidad de la membrana provocando daño celular y la muerte (Yin & Zhang, 2020).

En el proceso de aclimatación se deben considerar muchas pautas con respecto a los explantes con el interés de que puedan desarrollarse en el ambiente sin condiciones controladas (Brighigna & Papini, 2002). La humedad es esencial para mantener el balance hídrico de la planta, el fotoperiodo que permita realizar sus procesos fotosintéticos, la fertilización para mejorar el desarrollo y la etapa de floración, el control de enfermedades para prevenir la presencia de hongos, bacterias, plagas e insectos y el tipo de extracto que va depender de la especie vegetal a trabajar para que pueda absorber los nutrientes esenciales por medio del sistema radicular (Teixeira da Silva & Hossain, 2017).

Objetivos de la investigación

Objetivos generales

- Evaluar el efecto de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) en condiciones *in vitro* y aclimatación en *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Objetivos específicos

- Producir nanopartículas de plata ($AgNP_s$) utilizando hojas de té verde (*Camellia sinensis sp.*).
- Comprobar el efecto de las nanopartículas ($AgNP_s$) con respecto a su actividad antimicrobiana en *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*
- Evaluar el desarrollo fenotípico de los explantes de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Planteamiento de hipótesis

Hipótesis efecto antimicrobiano de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Ho: Las ($AgNP_s$) no generan un efecto antimicrobiano en los explantes de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, en condiciones *in vitro*.

Ha1: Las ($AgNP_s$) generaran un efecto antimicrobiano en los explantes de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, en condiciones *in vitro*.

Hipótesis aclimatación de explantes de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Ho: Las ($AgNP_s$) no influyen en el desarrollo fenotípico de las especies *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, en la etapa de aclimatación.

Ha: Las ($AgNP_s$) influyen en el desarrollo fenotípico de las especies *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.* en la etapa de aclimatación.

Capítulo II

Marco teórico

Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia permite el estudio de la manipulación y propiedades de los nanomateriales en escala nanométrica (10^{-9}), el prefijo "nano" proviene de griego "enano". La nanotecnología se basa en el diseño, caracterización, fabricación y aplicaciones materiales, dispositivos y sistemas con el objetivo de brindar diversos usos para mejorar la calidad de vida (Chávez Jácome, 2021). Según Gutiérrez Coronado, (2018) menciona que en el Ecuador es necesario reforzar las bases educativas profundizando las nuevas ciencias haciendo énfasis en la nanotecnología e impulsando el campo de la investigación con el propósito de fomentar el pensamiento crítico, creativo y contribuir a la formación de investigadores que aporten grandes avances al país. Por otra parte, las regulaciones de los nanomateriales en el ámbito tecnológico tienen varios enfoques con respecto a la seguridad, salud y ambiente (Páez Aguinaga, 2021).

Nanomateriales

Según Alarcón & Zúñiga, (2022) considera que los nanomateriales son la base de la nanociencia los cuales han brindado grandes aportes en la ciencia y tecnología. La clasificación de los nanomateriales es dada por sus características propias a continuación se describen dichas consideraciones (Villamor Sancho, 2021).

La dimensionalidad se relaciona con la forma y el tamaño del nanomaterial los cuales pueden estar dentro de una o más dimensiones, la morfología se basa en las características externas, sus consideraciones están relacionadas con la proporción de la altura y el ancho del material con respecto a su composición puede estar dada por un único material o varios; es decir nanomateriales aglomerados o dispersos provocando cambios en su comportamiento variando sus propiedades y características (Escobar Falconi, 2015).

Nanomateriales de dimensión cero (0D)

Una estructura cero dimensional, se denomina simple debido a que es esencial para el diseño de nanomateriales la cual posee las tres dimensiones que son inferiores a 100 nm, por ejemplo: nanopartículas, nanocristales, fullerenos y puntos cuánticos (Falconí & Estefanía, 2015). El término de nanopartícula define a todas las nanoestructuras (0D) sin importar el tamaño y la morfología, comúnmente las estructuras amorfas están definidas irregularmente. Los nanoclusters y las nanopartículas tienen una estructura amorfa y semicristalinas con un tamaño de 10 nm y 1µm. Con respecto a su fabricación las nanopartículas presentan diferentes tamaños variando un 15%, el nanomaterial varía su forma sin afectar su diseño (Alarcón & Zúñiga, 2022).

Nanomateriales unidimensionales (1D)

Está representado por dos dimensiones que definen su ancho y altura, a continuación, se mencionan los siguientes nanomateriales; los nanohilos son estructuras cristalinas alargadas las cuales se destacan por sus propiedades conductoras y semiconductoras siendo aplicadas en diversas áreas de la nanoelectrónica, optoelectrónica y sensores. Los nanotubos de carbono están conformados por una lámina hexagonal de grafito que se enrolla formando un cilindro además se puede obtener nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y múltiple (MWCNT), (Berlanga Mora, 2013)

Nanomateriales bidimensionales (2D)

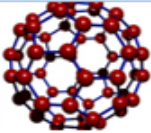
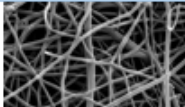

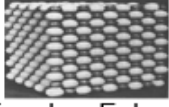
Son aquellos nanomateriales que están formados por capas muy finas denominadas nanocapas o películas delgadas cuyo tamaño es indefinido y su espesor está entre 1 a 100 nm. Por ejemplo, el grafeno ha permitido grandes avances tecnológicos por sus múltiples y excepcionales propiedades en el diseño de dispositivos electrónicos y la fabricación de fármacos para el cáncer (Chávez Jácome, 2021).

Nanomateriales tridimensionales (3D)

Se trata de aquellos nanomateriales que no están dentro de ninguna dimensión (x, y, z). A continuación, se describe la clasificación de los nanomateriales por sus dimensiones de 1 a 100 nm (véase en la tabla 1).

Tabla 1.

Clasificación de los nanomateriales por sus dimensiones.

Dimensión del nanomaterial	Definición	Nanomaterial	Ejemplo
Dimensión (0-D)	Tiene todas sus dimensiones menores a 100 nm.	Fullerenos. Puntos cuánticos. Nanopartículas. Nanoarcillas.	 (Alarcón & Zúñiga, 2022).
Dimensión (1-D)	Contiene dos dimensiones dentro de la nanoescala menores a 100 nm.	Nanotubos. Nanofibras. Nanohilos.	 (Garcia Soqui, 2016)
Dimensión (2-D)	Posee tres dimensiones dentro de la nanoescala.	Grafeno. Nanofilms. Películas delgadas.	 (Alarcón & Zúñiga, 2022)
Dimensión (3-D)	Ninguna dimensión dentro de la nanoescala	Policristales. Óxido de tungsteno.	 (Escobar Falconi, 2015)

Nota: Dimensiones de los nanomateriales y sus aplicaciones (Chávez Jácome, 2021).

Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas han revolucionado la nanotecnología por sus diversas aplicaciones en fármacos, anticuerpos y lignanos. En forma general poseen propiedades conductoras que al estar en contacto con metales u óxidos metálicos semiconductores pueden participar en reacciones físicas y químicas. Por otra parte, contienen un determinado número de electrones confinados enfatizando la resonancia plasmónica que es una de las propiedades

ópticas. La plata (*Ag*) y el oro (*Au*) son metales nobles que han brindando aportes en el desarrollo tecnológico, catálisis, fotografía, agentes anticancerígenos y antimicrobianos. Por otra parte, su relación superficial/volumen permite adherirse a otros nanomateriales de una manera más rápida y factible a menores temperaturas (Guerrero Dimas & Castañeda Facio, 2022)

Síntesis de Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas se pueden obtener a partir de dos métodos: *Top Down* (de arriba hacia abajo) el cual parte de un material macroscópico que es reducido hasta llegar a dimensiones nanométricas logrando obtener múltiples variedades de nanopartículas. A estas se denominan técnicas de fuerte deformación como: abrasión de láser, molienda mecánica, grabado químico y litografía; unas de sus desventajas es que su tamaño y morfología es poco controlado, el costo de producción y su consumo de energía es elevado (Gómez Villarraga, 2016).

El método *bottom-up* (de abajo hacia arriba) denominado autoensamblaje está dado frente a un campo externo considerando: el pH, campo eléctrico y solución química; las nanoestructuras sufren una agregación o modificación de un átomo, una molécula o partículas pequeñas (Alarcón & Zúñiga, 2022). El método químico está conformado por un precursor metálico, agente reductor y agente estabilizante lo cuales son simples y económicos permitiendo la obtención de nanopartículas libres de impurezas, mejorando su eficiencia en el tamaño y morfología, los métodos más utilizados son los siguientes: sol-gel, precipitación química, electroquímica, deposición química de vapor y pirolisis láser (Bayda *et al.*, 2019)

El *método verde* ha desencadenado un gran interés en la investigación permitiendo un gran avance científico-tecnológico en la síntesis de nanomateriales, se denominan métodos biológicos debido al uso de extractos vegetales provenientes de las plantas obtenidos a partir de las hojas, tallos, flores, semillas, frutos y raíces (Alarcón & Zúñiga, 2022). Por otro lado se ha reportado el uso eficiente de microorganismos como: bacterias, hongos y algas para la obtención de nanopartículas (Chávez Jácome, 2021). Este método posee múltiples ventajas: son fáciles de obtener, sus procesos son eficientes, amigables con el ambiente, el empleo de materias primas

renovables, accesibles, ecológicos, bajo costo y su producción a gran escala. Una de las desventajas es que las nanopartículas se pueden inhalar causando problemas graves por su tamaño nanométrico, además de ser un método biológico que no es empleado industrialmente (Farías Mancilla, 2016).

Agente estabilizante

La aglomeración de nanopartículas (NP_s) se produce por la reducción de la energía superficial provocando una desestabilización y desorganización de la nanopartícula que genera pérdida de sus propiedades por lo tanto se ha optado por el uso de agentes estabilizantes "surfactantes" denominados agentes químicos entre sus principales funciones se destacan: emulsificar, humedecer, solubilizar y dispersar (Farías Mancilla, 2016). Estudios han demostrado que los compuestos poliméricos como: poliacrilatos, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, poliacrilonitrilo, poliacrilamida y polietilenglicol son los más eficientes para estabilizar las nanopartículas (Alarcón & Zúñiga, 2022)

Plantas

Las plantas contienen un sinnúmero de compuestos bioactivos los cuales son: alcaloides, terpenoides, fenoles, taninos, cetonas, flavonoides, vitaminas y proteínas entre otros; los cuales actúan como agentes reductores. Según Alarcón & Zúñiga, (2022) menciona que los metabolitos secundarios actúan en calidad de agentes estabilizantes evitando las aglomeraciones de las nanopartículas siendo más estables y homogéneas. Para la síntesis biológica de nanopartículas se deben considerar los siguientes parámetros: la temperatura, el pH, concentración del extracto y el precursor metálico que afectan la estabilidad, tamaño y morfología (Musial & Jankowska, 2020).

***Camellia sinensis* (té verde)**

El té verde se caracteriza por su olor, fragancia y sabor, se cultivan en zonas tropicales y subtropicales, su origen se inclina en el continente asiático específicamente en China, Japón y Taiwán. Es un arbusto que mide hasta 10 m de altura facilitando la cosecha de sus hojas las

cuales poseen un color verde brillante y su forma ovalada pecionalada, la cantidad de compuestos bioactivos es mayor en una planta adulta que en una joven (Alarcón & Zúñiga, 2022). La composición química de las hojas de té verde contiene proteínas, aminoácidos, fibra, lípidos, pigmentos, minerales, compuestos fenólicos, catequinas, ácidos oxiaromaticos, flavonoles, teaflavinas, teagallinas, terarubinas, alcaloides, azúcar, aminoácidos, vitaminas, ácidos dibásicos, taninos, cationes, metales, lignanos, saponinas triterpenoides (Rajput & Paul, 2020).

Dentro de los compuestos polifenólicos están las catequinas (3-flavanoles) que incluyen: epigallocatequina-3-galato (EGCG), epicatequina-3-galato (ECG), epigallocatequina (EGC) y epicatequina (EC). Los grupos hidroxilos (-OH) de los flavonoides les confieren sus propiedades antioxidantes (Musial & Jankowska, 2020). Según Ivanova & Andonova, (2021) menciona que la epigallocatequina-3-galato se encarga de producir el sabor amargo y picante característico del té verde. Las catequinas se caracterizan por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antirradiación además actúa en calidad de agente reductor siendo el responsable de la formación y estabilización de *AgNP_s*, el grupo -OH dona los electrones a los iones de Ag^+ reduciéndose a Ag^0 mientras que el -OH se oxidará a C=O, (Hasri & Dini, 2019). A continuación, se describe la taxonomía de *Camellia sinensis*, (véase en la figura 1).

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Ericales.

Familia: Theaceae.

Tribu: Theeae.

Género: *Camellia*.

Especie: *Camellia sinensis*.

Figura 1.

Camelia sinensis.



Nota: té verde (*Camelia sinensis*) contiene propiedades antioxidantes.

Nanopartículas de plata (AgNP_s) características y propiedades

Las nanopartículas de plata poseen propiedades antiinflamatorias y de cicatrización de heridas con un tamaño de 1 a 100 nm se destacan por sus propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas, físicas, químicas y biológicas. Entre las propiedades ópticas de las *AgNP_s*, se destaca la resonancia de plasmones superficiales (SPR), en la que los electrones que oscilan en la superficie al estar en contacto con la irradiación con luz visible e infrarroja. Debido a que este fenómeno es electromagnético se detecta mediante espectroscopia de UV-Vis visible considerando la manifestación de picos intensos en el color absorbido violeta-azul, (435-480 nm) del espectro visible que indica la presencia de nanoplatina (Ivanova & Andonova, 2021).

Dentro de las propiedades antibacterianas las (*AgNP_s*), actúan sobre las bacterias grampositivas y gramnegativas incluyendo las cepas que son resistentes a los antibióticos. Su eficiencia va a depender del tamaño y la concentración mientras más pequeña sea la nanopartícula mayor será su efectividad por ende el diámetro debe ser menor a 10 nm los cuales

son ideales para penetrar la pared celular de las bacterias. Según Hernández, (2016) menciona que las nanopartículas que tienen un diámetro de 12 nm inhiben el efecto antibacteriano de las cepas *E.coli* acumulándose en la membrana celular de la bacteria ocasionando daños en las células interrumpiendo su crecimiento y sus funciones metabólicas (Singh & Dubey, 2017)

Varios estudios han demostrado que las nanopartículas de plata pueden controlar la presencia de hongos comunes que incluyen *Aspergillus*, *Candida* y *Saccharomyces* aplicando el mismo mecanismo de ataque de las bacterias. Con respecto a las propiedades antivirales es necesario que tengan diámetro de 5 a 20 nm las cuales puede inhibir la presencia de virus en su etapa inicial las *AgNP_s*. En los virus se unen a la glicoproteína bloqueando la infección asociada a las células evitando su replicación (Singh & Dubey, 2017)

Aplicaciones de las nanopartículas de plata (AgNP_s)

Las nanopartículas de plata se han aplicado en diferentes áreas como: biotecnología, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, tratamiento de agua y su aplicabilidad depende de la forma, tamaño y estabilidad (Falconí & Estefanía, 2015). Antes del descubrimiento de los antibióticos se usaba la plata para cicatrizar heridas abiertas y quemaduras actuando como agente antiséptico. A nivel industrial las nanopartículas se han utilizado en la elaboración de diversos productos por su efecto antimicrobiano siendo su principal característica. Se han utilizado en: instrumentos quirúrgicos, dispositivos anticonceptivos, apósitos para heridas y prótesis óseas para prevenir el crecimiento de bacterias (Avalos *et al.*, 2015). Se han reportado varios estudios *in vitro* sobre el efecto de las *AgNP_s*, las cuales son capaces de inhibir el VIH-1, hepatitis B, virus de la viruela del mono y el virus A/H1N1. En la biomédica se han implementado para el diagnóstico, como agente terapéutico, por su eficacia antiparasitaria y la administración de fármacos para el control de enfermedades mortales (Bueno, 2017)

En la industria alimentaria las *AgNP_s* son aplicadas en el envasado de alimentos para prevenir la contaminación, también se usan en los recubrimientos biodegradables de verduras y frutas; los bioformulados han permitido la obtención de nanopesticidas, antibacterianos y

antifúngicos para el control de enfermedades en cultivos a gran escala. En la industria textil se introducen *AgNPs* en las fibras sintéticas para evitar efectos antimicrobianos y malos olores en las prendas de vestir, sus grandes aportes en la vida cotidiana dependen de la forma, tamaño y su estabilidad en la nanopartícula permitiendo la fabricación de electrodomésticos, aerosoles, detergentes, sistemas de purificación de aguas y cosméticos entre otros (Avalos *et al.*, 2015).

Métodos de caracterización de nanomateriales.

Existen un sinnúmero de técnicas que son utilizadas para la caracterización de los nanomateriales con el fin de conocer las propiedades morfológicas, estructurales, ópticas y químicas una vez sintetizado.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Es un equipo que permite visualizar imágenes con una alta resolución de un elemento específico, las imágenes son combinadas con el microanálisis químico elemental y la difracción de electrones. Se ha demostrado una gran eficiencia en el estudio de nanoestructura para analizar la morfología, tamaño, estructura cristalina, composición química e información fisicoquímica de la estructura superficial para comprobar si el nanomaterial cumple con las características esperadas (Berlangu Mora, 2013).

Para el análisis de la composición química se han utilizado diversas técnicas como: Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) y espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS), lo cual ha permitido obtener una mejor información química y electrónica de las muestras, (*véase en la figura 2*). El TEM permite analizar material biológico, metales, nanomateriales, ultraestructura de bacterias y células las cuales deben ser delgadas para poder atravesar el haz de electrones para no afectar la estructura original, con respecto a la preparación de la muestra está es muy compleja haciéndose necesario un tratamiento o tinciones antes de caracterizarlas, las imágenes obtenidas son monocromáticas y planas (Farías Mancilla, 2016).

Figura 2

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).



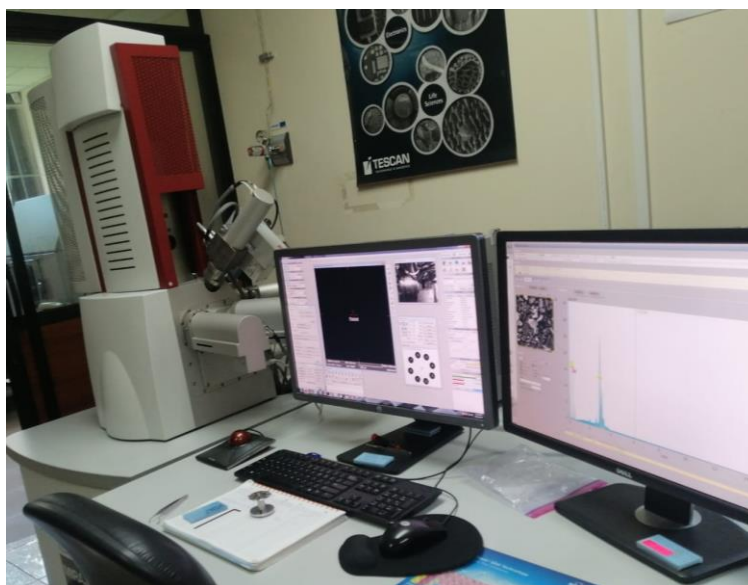
Nota: Determinación del tamaño de los nanomateriales y muestras biológicas.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se describe como una técnica microscópica electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra a partir de interacción electrón-materia el cual está principalmente compuesto por un haz de electrones su funcionamiento está descrito mediante el efecto túnel (García Soqui, 2016). Según Berlanga Mora, (2013) menciona que existen el criosem para la determinación de muestras congeladas, dichos materiales son sensibles a la temperatura un ejemplo muy común es el hielo. Existen dos procedimientos en el SEM dado por electrones secundarios de baja energía los cuales se producen al colisionar el haz incidente con los átomos de la muestra “los más cercanos a la superficie” y electrones retrodispersados que permiten reflejar la muestra, (véase en la figura 3). El SEM permite obtener imágenes en 3D dando una apariencia tridimensional para establecer el tamaño y forma de una muestra obteniendo imágenes denominadas micrografías, además cuenta con una resolución espacial de 1 a 3 mm, el análisis EDX ha permitido determinar la composición química de las fases presentes en una muestra *in situ* (Alarcón & Zúñiga, 2022).

Figura 3

Microscopía electrónica de barrido (SEM).



Nota: SEM permite determinar la composición química elemental y mapeo elemental.

Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)

Se describe como una técnica de caracterización no destructiva que permite evaluar la absorbancia, transmitancia y reflectancia correspondientes a las propiedades ópticas permitiendo medir energías de banda prohibida (E_g) de muestras semiconductoras determinada por el método Tauc para determinar la longitud de onda dada en (~ 190 a 800 nm) sobre una muestra; al estar en contacto con el detector de luz convierte las señales luminosas en señales eléctricas dicho proceso permite que el registrador obtenga los espectros de absorción para determinar la transmitancia (Alarcón & Zúñiga, 2022). La geometría de las bandas de absorbancia como: la simetría, el ancho, intensidad y multiplicidad entre otros; (Véase en la figura 4), permite obtener la morfología de las $AgNP_s$, su agregación y los picos prominentes del espectro UV-Vis permite determinar el tamaño de la partícula (Ivanova & Andonova, 2021).

Figura 4

Espectrofotómetro UV-Vis.



Nota: Permite determinar la longitud de onda de una muestra.

Difracción de rayos X (DRX)

Es una técnica no destructiva permite identificar planos cristalinos y el índice miller de las muestras a analizar, es muy utilizada para analizar las propiedades estructurales de nuevos nanomateriales fabricados por métodos físicos, químicos y biológicos. El haz de rayos X se encargan de atravesar una rendija que está en contacto con la superficie del material cristalino, los cuales son captados por un detector que traduce la información de la muestra hacia el difractograma cuya función es identificar la cristalinidad del material. Cada pico o máximo de difracción son los planos atómicos de la fase cristalina siendo única para cada material además se puede obtener un análisis estructural completo y calcular el tamaño de los cristales por medio de la ecuación de Scherrer (Alarcón & Zúñiga, 2022), (véase en la figura 5).

Figura 5

Equipo de difracción de rayos X.



Nota: Se describen las partes principales de un difractómetro está conformado por: El tubo de rayos x, un goniómetro y un detector.

En el tubo de rayos X, el cátodo al ponerse incandescente un filamento de wolframio (W) emiten electrones que son acelerados por una diferencia de potencial entre 40 a 50 Kv para colisionar con el ánodo de Cu, lugar donde se producen los rayos X siendo colimados por la rendija y un monocromador antes de incidir sobre la muestra que está situada en el portamuestras adherida al goniómetro. Los rayos X difractados por la muestra se dirigen hacia el detector el cual libera energía en forma de fotones y se convierten en pulsos eléctricos (Reyes Rodríguez, 2017).

Phalaenopsis sp

El género *Phalaenopsis* fue acuñado por el botánico holandés, Dr. Karl Lud-wing Blume en 1825, su flor se asemeja a una mariposa nocturna (*moth orchid*), en griego *phalaina* significa "mariposa", *opsis* "parecido". Este género se encuentra distribuido desde la India, Indonesia, Filipinas y Australia en una altitud de 200 a 400 msnm. Las orquídeas se han clasificado por su

morfología y sus características propias entre las cuales se destaca el polen. A continuación se describe su taxonomía de *Phalaenopsis sp.*, (American Orchid Society, 2022), (véase en la figura 6).

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Liliopsida.

Orden: Asparagales.

Familia: Orchidaceae.

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Vandeeae

Género: *Phalaenopsis*.

Figura 6

Phalaenopsis sp.



Las *Phalaenopsis sp.*, comúnmente se encuentran en los árboles se denominan plantas monopodiales de tallo corto que poseen de 3 a 6 hojas anchas y carnosas, sus flores están conformadas por labio, columna, sepalos y pétalos que varían según la variedad y por ende en el color: moradas, amarillas, blancas, rosadas, rojas y violetas entre otros. Además poseen prolongadas floraciones que duran de 4 a 6 meses aproximadamente antes de marchitarse (Enoki et al., 2022). El crecimiento, desarrollo y floración de la *Phalaenopsis sp.*, va a depender

de varios factores: el riego debe ser dos veces a la semana de preferencia en la mañana para eliminar el exceso de agua, hojas y ápice evaporándose durante el día con la finalidad de prevenir la proliferación de hongos y la pudrición de raíces. Con respecto al sustrato que está compuesto de fibra de coco, cáscara de pino, piedra pómez y musgo "*sphagnum*". (Kshitij, 2012). El trasplante se realiza una vez que haya finalizado su etapa de floración y comiencen a salir nuevas raíces y brotes. Finalmente es necesario un control riguroso en la etapa de la floración para evitar que los botones florales sequen considerando: demasiada temperatura, muy poca luz, sequía, demasiada humedad y exceso de fertilizante por lo tanto es necesario controlar las condiciones ambientales (Portilla, 2011).

Guzmania sp

El género *Guzmania* ha sido estudiado más a fondo en el siglo XVIII pertenece a la subfamilia Tillandsioideae que comprende aproximadamente 1000 especies, son plantas nativas de regiones tropicales y subtropicales extendiéndose por todo el territorio americano, su nombre es otorgado por el botánico español Anastasio Guzmán quien dedicó parte de su vida al estudio de dicha especie (Gaviria & Mejía, 2016). A continuación se describe la taxonomía de *Guzmania sp.*, (véase en la figura 7).

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Liliopsida.

Orden: Poales

Familia: Bromeliaceae

Subfamilia: Tillandsioideae

Género: *Guzmania*.

Figura 7

Guzmania sp.



El género *Guzmania* se caracterizan comúnmente por ser plantas epífitas que se impregnan en las ramas y troncos de los árboles; la luz, agua y humedad es ideal para que puedan sobrevivir, sin embargo existen bromelias terrestres que crecen en el suelo del sotobosque y requieren de menos luz (Betancur, 2003). Con respecto a su morfología poseen un tallo con hojas en forma de roseta que en el centro forman una copa, la cual acumula o reserva agua en épocas de lluvia, su inflorescencia se presenta en las axilas de sus brácteas que son hojas modificadas de color rojo, amarillo, púrpura, rosado y anaranjado. Por otra parte dicha especie no es muy propensa a presentar plagas, sin embargo la araña roja puede atacar a la planta en ambientes secos, el riego debe ser controlado, el exceso de agua provoca la pudrición de la raíz por lo tanto se recomienda regar cada 15 días (Pereira Zaldívar, 2022).

Cultivo de tejido vegetal

El cultivo *in vitro* es un conjunto de técnicas que permiten el desarrollo de una planta completa a partir de las hojas, raíz, tallo, tejidos, apicales, callos, órganos y células; las cuales son sembradas en un medio artificial, dicho procedimiento se realiza de una forma rápida y eficaz en el laboratorio en condiciones controladas con la finalidad de propagar y multiplicar una especie vegetal (Garzón Gutiérrez & Ramírez Moreno, 2018). Las condiciones del laboratorio son

esenciales para el desarrollo de explantes una vez sembrados son llevados al cuarto de crecimiento ajustados a un temperatura y aire de acondicionamiento de 23 a 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz para su proceso fotosintético aplicando en varias especies (Phillips & Garda, 2019). Los medios de cultivo contienen nutrientes esenciales, minerales, vitaminas y fitohormonas que estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta. Desde el siglo XX se han investigado formulaciones y protocolos únicos para cada especie vegetal de interés (Haberlandt, 2020). Las etapas de micropropagación del cultivo *in vitro*, se basan en etapas, las cuales se detallan a continuación:

Etapas 0: Selección de la planta madre

Esta etapa consiste en la selección de la planta para obtener los explantes por ende se recomienda que la planta esté en óptimas condiciones, libre de enfermedades que garantice un riguroso control fitosanitario libre de plagas e insectos; comúnmente se encuentran cultivadas en los invernaderos, el riego va estar definido por el tipo de especie (Garzón Gutiérrez & Ramírez Moreno, 2018).

Etapas 1: Establecimiento del cultivo in vitro

Se inicia con la desinfección del explante para evitar contaminación en la siembra, se requiere un implante estéril por lo cual se realiza un lavado con agua esterilizada y usando reactivos como: detergentes, hipoclorito de sodio, etanol y el tiempo específico. Existen diversos métodos de desinfección de explantes su variación va depender del tipo de especie vegetal y el material disponible (Roca & Mroginski, 1991).

Etapas 2: Multiplicación

La fase de multiplicación de explantes en esta etapa se evidencia el apareamiento de brotes, hojas, el crecimiento del tallo en diámetro y altura. Por lo tanto, es ideal aplicar fitohormonas en el medio de cultivo entre los más conocidos tenemos: auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico que estimulan a la planta generando una respuesta (Haberlandt, 2020).

Etapa 3: Enraizamiento

Las auxinas es el regulador que comúnmente se aplica para el desarrollo del sistema radicular su objetivo principal es estimular el crecimiento de la raíz permitiendo que la planta pueda sostenerse y absorber los nutrientes en condiciones *ex vitro* .Con respeto a sus concentraciones varían según la especie vegetal (Roca & Mroginski, 1991).

Etapa 4: Adaptación

Es la etapa de aclimatación donde la planta pasa de un medio artificial a ser adaptada en sustrato como: pomina, arena, coco, sphagnum y turba. Es esencial que el sistema radicular sea óptimo para la siembra debido a que las condiciones del laboratorio son diferentes a las del ambiente (Garzón Gutiérrez & Ramírez Moreno, 2018).

Componentes del medio de cultivo

El agua esterilizada o ultrapura libre de impurezas es indispensable en el medio de cultivo el cual comprende aproximadamente más del 90% de su composición (Molina Cabrera, 2012). Las sales nutritivas son esenciales para el desarrollo de las plantas dentro de los macronutrientes se encuentran: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre mientras que los micronutrientes son: hierro, manganeso, zinc, boro, cobre cobalto y yodo en dosis pequeñas. Adicionalmente se añade: nitrato de calcio, cloruro de potasio y sulfato de magnesio; con respecto a los quelantes más comunes son el: EDTA y EDDHA, (Haberlandt, 2020).

Las vitaminas son esenciales para suplementar las necesidades que requieren las plantas en su etapa *in vitro* para sus procesos metabólicos entre las que se incluyen: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y mioinositol (Molina Cabrera, 2012). Los aminoácidos son aquellos que aportan al crecimiento de las células vegetales por su gran fuente de nitrógeno los más utilizados son: glicina, glutamina, adenina e hidrolizado de caseína en una concentración 2 y 1000 mg/L^{-1} . Las plantas *in vitro* no son capaces de producir carbohidratos por ende se administra sacarosa el más común en el medio de cultivo sin embargo existen otros: glucosa, fructosa y maltosa con una dosis de 20 a 30 g/L^{-1} , (Garzón Gutiérrez & Ramírez Moreno, 2018). Los agentes

gelificantes son aquellos que brindan un soporte a la planta una vez sembrada, el agar se obtiene del alga roja *Gracilaria* siendo el más utilizado, también se usa la goma gellan, proveniente de la bacteria *Sphingomonas*, se usa sólo o combinado con el agar y la agarosa que se extrae varios tipos de algas rojas. Los compuestos orgánicos son suplementos que debe contener el medio de cultivo los cuales son: extracto de malta, hidrolizados de proteínas y carbón activado (Colorado State University Publishing, 2019).

Reguladores de crecimiento

Son aquellos que aportan beneficios al explante para su desarrollo morfológico y fisiológico existen 4 grupos principales de reguladores de crecimiento de plantas (PGR) lo cuales son: **auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico**, (Phillips & Garda, 2019). Las auxinas sirven para estimular la iniciación celular además aporta al crecimiento de raíces y callos, los más comunes son: ácido indolacético (IAA), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las **citoquininas** favorecen el crecimiento de brotes en los apicales axilares y adventicios se aplican: benciladenina (BA), cinetina y zeatina. El **ácido giberélico** promueve el alargamiento de brotes y el **ácido abscísico** mejora la calidad de los embriones somáticos, la mayoría de PGR se disuelven en etanol, hidróxido de potasio y ácido clorhídrico entre otros, (Molina Cabrera, 2012).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del lugar de investigación

Ubicación política, geográfica y ecológica

El presente trabajo se ejecutó en varias instalaciones las cuales se mencionan a continuación: La obtención de nanopartículas de plata ($AgNP_s$), por el método verde se realizó en el Laboratorio Ciencias Químicas, del departamento de ciencias exactas a cargo de la Mgtr. Sandra Armijos y el técnico de laboratorio Mgtr Francisco Suasnabas perteneciente a la Universidad de la Fuerzas Armadas Espe sede Santo Domingo. Av. Quevedo Km 24, Hacienda Zoila Luz, Parroquia Luz de América.

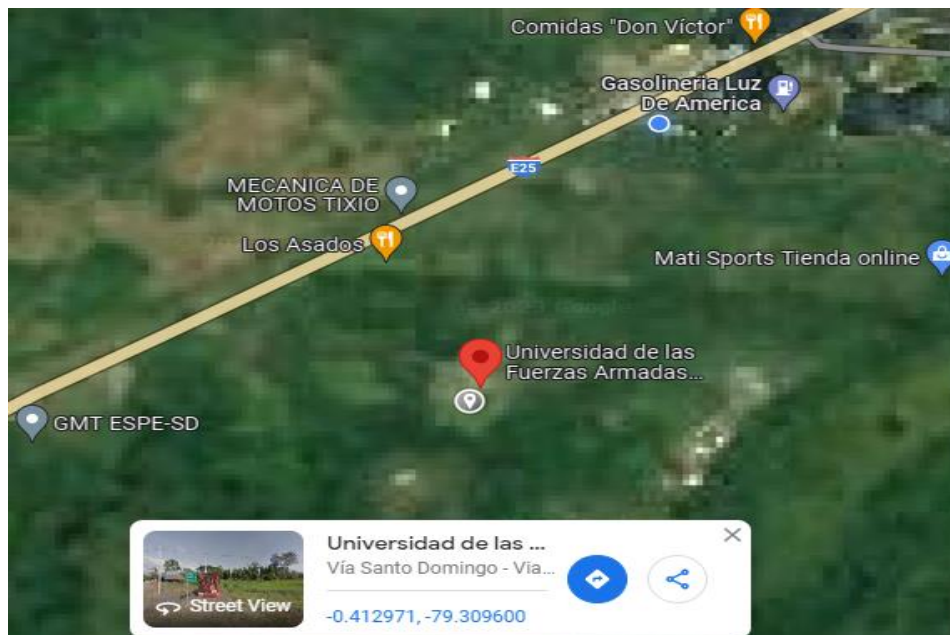
Altitud:550 msnm

Latitud:0°41'29"S

Longitud:79°30'96"O

Figura 8

(Google-maps, 2023)



La caracterización de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) se llevó a cabo en el Campus Matriz de la Escuela Politécnica del Ejército "ESPE" en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología "CENCINAT" a cargo del PhD. Alexis Debut, jefe del laboratorio de caracterización de nanomateriales y la técnica de laboratorio, Mgtr Karla Vizuete, ubicado en el Valle de los Chillos Sangolqui. Av. General Rumiñahui, Pichincha-Ecuador, a continuación, se detallan las siguientes coordenadas.

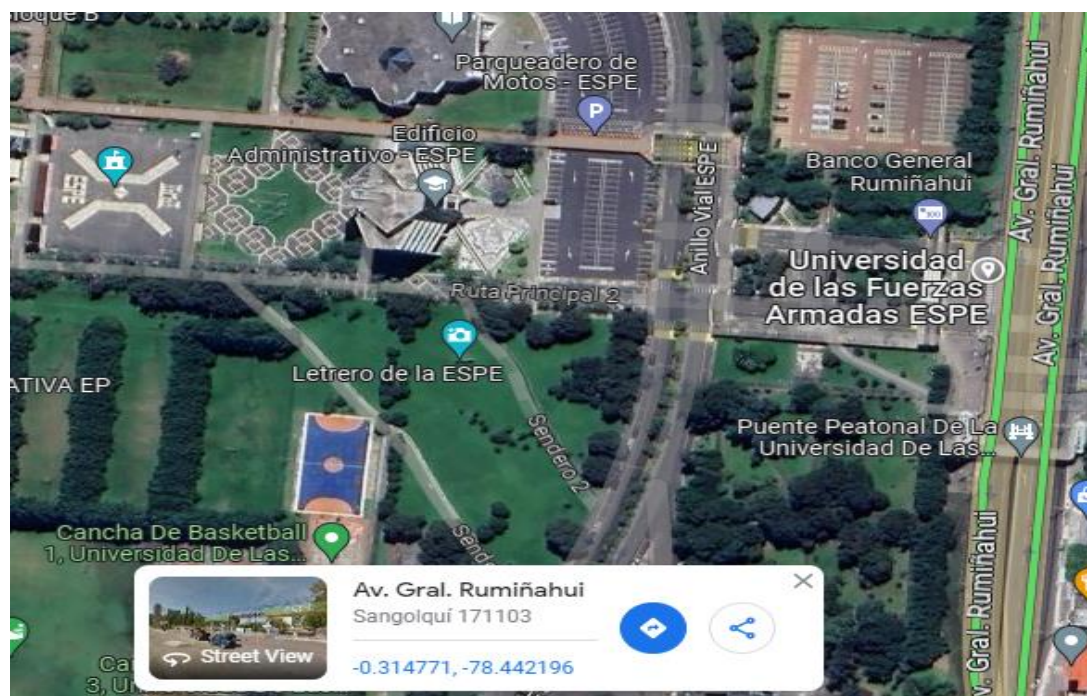
Altitud: 2510 msnm.

Latitud: 0°31'48"S

Longitud: 78°44'21"O

Figura 9

(Google-maps, 2023)



La ejecución de la prueba de actividad antimicrobiana y su fase de aclimatación usando explantes de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.* se realizó en la empresa de Servicios agrobiotecnológicos "Agrobiotech"; que es una empresa que se dedica a la micropropagación de especies vegetales a gran escala a cargo de Ing. Pablo Landázuri y la técnica de laboratorio

Lcda. Alexandra Castillo. Ubicado en la Av. José Plaza, E2369 y Av. Aurelio Dávila. Pichincha-Tumbaco.

Altitud: 2355 msnm.

Latitud: 0°18'61"S

Longitud: 78°38'04"O

Figura 10

(Google-maps, 2023).



Materiales y métodos.

A continuación, se describen los equipos, materiales, reactivos e insumos en los cuales se llevó a cabo el presente trabajo.

Tabla 2.

Equipos, materiales, reactivos y muestras para la síntesis verde de (AgNP_s) con su respectiva caracterización, preparación del medio Murashige Skoog y su etapa de aclimatación de las Phalaenopsis sp. y Guzmania sp.

Cantidad	Equipos
1	SEM: Microscopio electrónico de barrido.
1	TEM: Microscopía electrónica de transmisión.
1	UV-Vis: Espectroscopia ultravioleta visible.
1	EDS: Energía dispersiva de rayos x.
1	XRD: Difracción de rayos x.
1	Centrifugadora.
1	Autoclave.
1	Cámara de flujo laminar.
1	Plancha de calentamiento.
1	Disecador.
1	Peachimetro.
1	Vortex.
1	Bomba al vacío.
1	Balanza.
Cantidad	Materiales
2	Vaso de precipitación
1	Agitador magnético.
2	Erlenmeyer.
1	Termómetro.
15	Tubos de ensayo.
3	Vidrio reloj.
2	Probeta de 100 ml y 500 ml.
4	Pipetas.
2	Embudo buchner.
80	Filtros de 0,20 y 045 μ m.
20	Papel filtro.
2	Mecheros.
10	Bisturí.
50	Gelatineros.
2	Plástico film.
4	Pinzas.
Cantidad	Reactivos.
50%	Acetona.
0,1M	Nitrato de plata.
0,1M	Hidróxido de sodio.
1 litro	Agua ultra pura.
70% y 100%	Alcohol.
0,1 M	Hidróxido de potasio.
0,1M	Ácido fosfórico.
50	Etiquetas.
0, 807g/ml	Nitrógeno líquido.

Cantidad	Muestras
100 mg/L ⁻¹	Nanopartículas de plata (<i>AgNP_s</i>).
25	<i>Phalaenopsis sp.</i>
25	<i>Guzmania sp.</i>
200 g	Té verde (<i>Camellia sinensis sp.</i>).
4 fundas de sustrato	<i>Sphagnum</i> , turba, fibra de coco y pomina.

Método verde

Material de la muestra

El té verde (*Camellia sinensis sp.*) se adquirió de la casa comercial el “Arbolito” con un contenido de 100g usando 2 paquetes. En la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas-Ecuador.

Preparación del agente reductor

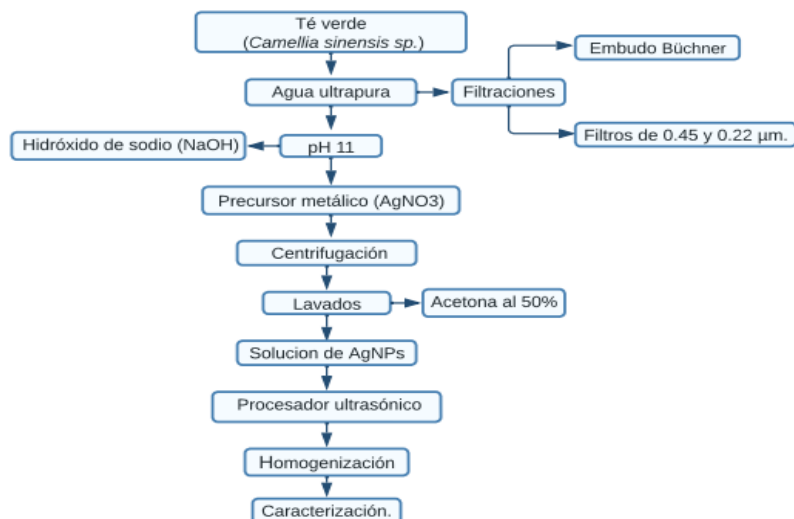
Se pesó 10 g de té verde (*Camellia sinensis sp.*) se calentó en 100 ml de agua ultra pura procedente de la empresa ASCARBI BIOSYSTEMS, se trabajó a una temperatura de 90°C por 10 minutos. Finalmente se realizaron múltiples filtraciones al vacío usando el embudo Büchner y filtros de 0.45 y 0.22 μm .

Síntesis de AgNPs

Según Widatalla et al., (2022) para mejorar la estabilidad y rendimiento se tomó 5 ml del agente reductor ajustando el pH a 11 con hidróxido de sodio (0,1M) y el precursor metálico nitrato de plata (0,1M) en constante agitación. Se calentó durante 30 minutos a 50°C; luego se separa por centrifugación en una centrífuga marca Hettich a 6000 rpm. Se realizaron tres lavados con acetona al 50% y se dejó secar a temperatura ambiente, (véase en la figura 11).

Figuran 11

Síntesis de nanopartículas de (AgNP_s).



Nota: Nanopartículas de plata ($AgNP_s$) a partir de *Camellia sinensis sp.*

Preparación de la muestra de AgNPs para su caracterización

Se realizó una suspensión con etanol para no destruir la morfología de la ($AgNP_s$) con la finalidad de evitar aglomerados en la muestra por lo tanto se usó un procesador ultrasónico VCX-130PB cuya amplitud del 75% a 2 pulsos por cada 15 segundos, (véase en la figura 12). Para la muestra líquida se utilizó una alícuota de 1 ml sobre el portaobjetos la cual se dejó secar en una estufa Memmert a 50°C por 30 minutos.

Figura 12

Procesador ultrasonido con un voltaje de 110v.

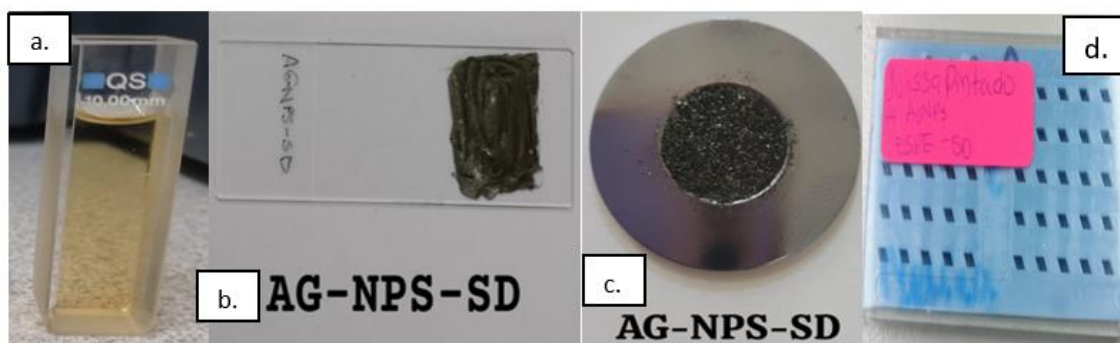


Nota: Homogenizar muestras en especial nanopartículas metálicas aglomeradas.

El *pin stud* es un disco metálico que contiene un \emptyset de 1 centímetro el cual está compuesto de aluminio lo que le permite conducir la electricidad. Para la fijación de la muestra se colocó una cinta de carbono de doble capa, luego se liberó nitrógeno líquido sobre la muestra para eliminar las ($AgNP_s$) que no estén bien pegadas. Con respecto al *TEM* se agregó la muestra a un circulito que tiene un diámetro de 3 milímetros, (véase en la figura 13) la preparación de muestras por diferentes técnicas de caracterización.

Figura 13

Preparación de muestras para la caracterización de $AgNP_s$



Nota: (a) Solución de $AgNP_s$ /agua 1:9, (b) muestra para difracción de rayos X,(XRD) , (c) pin stud para SEM, (d) muestra para visualizar imágenes en TEM.

Métodos de caracterización de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$)

Espectroscopia UV-Vis

Las soluciones de nanopartículas de plata se analizaron en el espectrofotómetro UV-VIS71280 Shimadzu el cual ofrece un escaneo de longitud de onda de 190 a 1100 nm, el análisis se llevó a cabo 2h después de sus síntesis con una disolución de $AgNP_s$ -agua (1:9) usando celdas de cuarzo. Se calibró con agua destilada para poder analizar las muestras de $AgNP_s$, considerando que el máximo de absorción UV-Visible está en el rango de 400 a 500 nm.

Difracción de rayos X (XRD)

El análisis de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Empyrean Panalytical utilizando una irradiación de $\text{CuK}\alpha$ a 40 mA y 45 Kv en un rango de 2θ desde 5° - 90° con pasos de 0.02° (2s por paso) para obtener un tamaño aproximado de las AgNP_s . El equipo contiene 4 repeticiones por cada 7 minutos con un límite de detección de un 3%. La identificación se realizó en el software EVA (*versión 4.1*) y la base de datos PDF2 ICDD. Para la determinación aproximada de la AgNP_s , se usó XRD Crystallite (grain) Size Calculator (Scherrer Equation).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la morfología de la nanopartículas de plata (AgNP_s) se realizó en el microscopio (Tescan Mira 3, Brno, Moravia del Sur, República Checa) equipado con un cañón de emisión de campo Schottky a un voltaje de aceleración de 20 kV. El sistema de vacío del SEM está conformado por dos detectores: detector de electrones secundarios (*SE*) y detector de electrones retrodispersados (*BSE*) y el porta muestras.

Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Para determinar la composición química elemental semicuantitativa se evaluó por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X, (*EDS*) en la cámara del *SEM* utilizando un detector Bruker XFlash 6|30, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Alemania) con una resolución de 123 eV en $\text{Mn K}\alpha$ con un voltaje de aceleración de 25 kV y 25 mm de WD.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para obtener una mejor resolución de imagen se usó el microscopio (FEI Tecnai G2 Spirit Twin, Eindhoven, North Brabant, Países Bajos) operando 80 kV. Las muestras se prepararon mediante dispersión ultrasónica de una pequeña cantidad de polvo en etanol. El área de superficie específica se midió por N_2 adsorción a través del enfoque de BrunauerEmmett-Teller (*BET*), utilizando un analizador de sorción de gases (Quantachrome Instruments Novatouch LX-1, Boynton Beach, FL, EE. UU.). Las muestras fueron pretratadas a 100°C al vacío de 5 Torr, durante 24 h. Los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,9999 para todos los análisis.

Para definir tamaño de la ($AgNP_s$), se usó el programa imageJ con 64-bit Java 8 windows versión gratuita para obtener el diámetro de cada partícula ajustando la escala a 50 nm para realizar el histograma mediante programa Origin 2023b.

Micropropagación *in vitro* “Agrobiotech”

Selección y aislamiento de las orquídeas (Phaelenopsis sp.) y bromelias (Guzmania sp.)

Se consideraron plantas en óptimas condiciones libres de agentes infecciosos y enfermedades. Para la especie *Phaelenopsis sp.*, se obtuvieron los explantes a partir de la cápsula previamente polinizada. En el caso de la especie *Guzmania sp.*, se usaron explantes foliares obtenidos en Bogotá.

Condiciones de laboratorio

Las condiciones del cuarto de crecimiento para los explantes de *Phaelenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, en su etapa de introducción, enraizamiento y aclimatación fueron: Temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, humedad relativa 65% y fotoperiodo de 12 horas e irradiancia de $16,85 \mu\text{mol m}^2.\text{s}^{-1}$, medidos con un sensor de flujo de fotones PA, Decagon, modelo QSO-S. $\text{m}^2. \text{s}^{-1}$.

Método de desinfección superficial de la Phaelenopsis sp., y Guzmania sp

Se aplicó el mismo método de desinfección para las especies de *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, a continuación, el siguiente protocolo: Con un cepillo se raspó la parte exterior denominada cápsula para eliminar impurezas usando jabón líquido WEIR y 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml, al finalizar se realizaron dos lavados con agua esterilizada. A posterior se preparó una solución de 80 ml de agua esterilizada y 20 ml de hipoclorito de sodio (NaClO), sumergiendo la cápsula con agitación constante por 6 minutos y finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua esterilizada.

Los meristemos apicales de la especie *Guzmania sp.*, (véase en la figura 14), se lavaron con agua y jabón líquido antes de ser separados del tallo mientras que sus hojas fueron removidas para extraer los apicales lo cuales fueron cortados y sumergidos en una solución

estéril de hipoclorito de sodio al 20% y 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml por 10 minutos en agitación constante y finalmente se realizaron tres lavados con agua esterilizada.

Figura 14

Obtencion de los meristemos apicales de Guzmania sp.



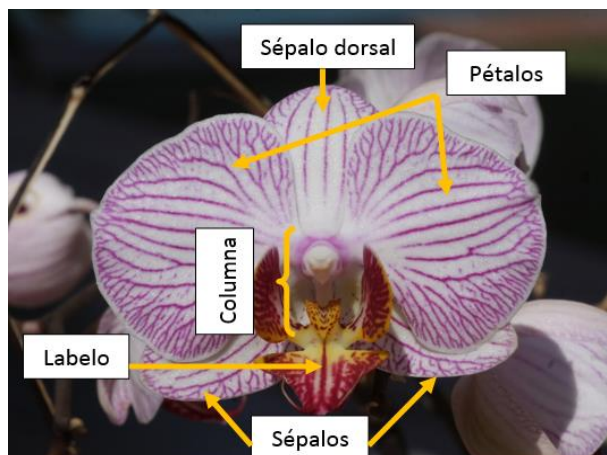
Nota: Brotes jóvenes de la especie *Guzmania sp.*, para la obtención de meristemos apicales.

Polinización de la orquídea Phaelenopsis sp

El proceso de polinización de la *Phaelenopsis sp.*, se realizó en condiciones estériles. Inicialmente se parte con la identificación de las flores maduras de preferencia que su estambre y pistilo estén completamente desarrollados. Dicha especie comúnmente contiene dos sacos polínicos que están incrustados en la parte superior de la columna con ayuda de una pinza se retiran las polinias para ser insertados dentro del estigma el cual se va encapsular y cerrar en el transcurso de los días, mientras que la flor se marchitará iniciando su proceso de fecundación. La vara floral se engrosa denominada el ovario, lugar donde se va formar la cápsula. A continuación, en la (véase en la figura 15), se describen las partes de la orquídea *Phaelenopsis sp.*

Figura 15

Polinización de Phalaenopsis sp.



Nota: Partes de la flor en la especie *Phalaenopsis sp.*, que se debe considerar para su proceso de polinización.

Medio de cultivo

Para la especie *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, se trabajó con el medio basal Murashige Skoog al 100% y 50% usando los mismos componentes stock descritos en la *tabla 3*, expresado en unidades de mg/L^{-1} . Para la esterilización del medio se realizaron en frascos de vidrio en el autoclave Ls-B75L a 120 ° C por 20 minutos.

Tabla 3

Componente del medio basal Murashige Skoog para las especies *Phalaenopsis* sp. y *Guzmania* sp.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L⁻¹
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1900.000
Macroelementos	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	180,700
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	16,900
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de zinc Heptahidratado.	8,600
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado.	0,025
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloruro de calcio dihidratado.	332.000
	KI	Yoduro de potasio	0,830
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0,025
Microelementos	$KH_2 \cdot PO_4$	Fosfato monopotásico.	170.000
	$H_3 \cdot BO_8$	Ácido bórico.	6,200
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Molibdato de sodio dihidratado.	0,250
	$FeSO_4$	Sulfato de hierro.	27.000
	$EDTA$	Ácido etilendiaminotetraacético.	37.000
Vitaminas		Glicina	2.000
		Tiamina	1.000
		Piridoxina	1.000
		Ácido nicotínico	0,500
		Inositol	100.000
		Carbón activado.	2.000
Carbohidratos		Ácido ascórbico	50.000
		Sacarosa	20000.000
Agar		Agente gelificante	6000.000
pH		potencial de hidrógeno	5.0 6,5

Nota: Se aplicó en la etapa de germinación, introducción, multiplicación y enraizamiento.

En una cámara de flujo laminar BIOBASE se dispensó el medio Murashige Skoog al 100% y 50% de las especies *Phalaenopsis* sp., y *Guzmania* sp., en 20 tarrinas de 6x6 cm para la fase

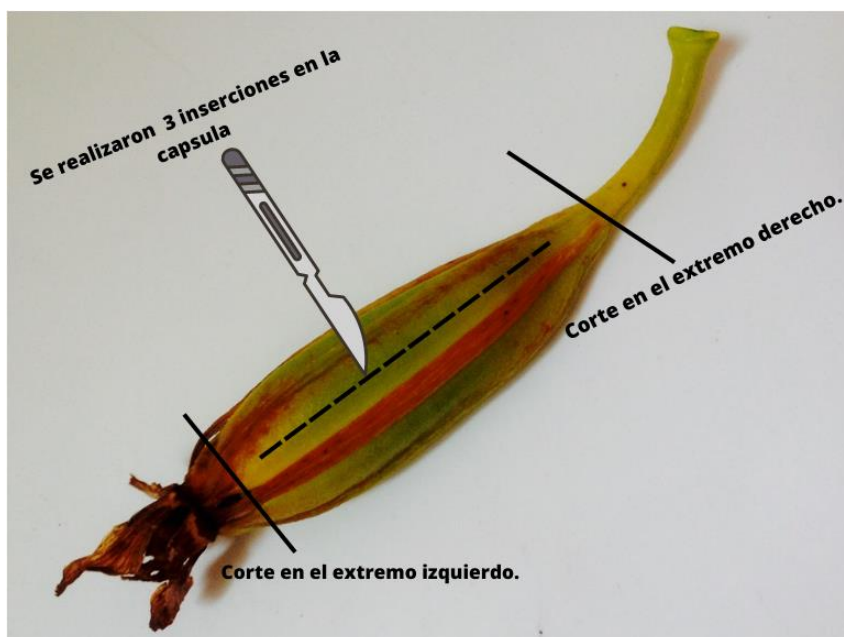
de germinación. En la fase de multiplicación y enraizamiento se usaron 50 vasitos transparentes de 6x9 cm, las cuales fueron tapadas y sellados con plástico film y almacenados previamente para la siembra.

Etapas de germinación de la Phalaenopsis sp y Guzmania sp.

En una cámara de flujo laminar BIOBASE previamente esterilizada con UV por 15 minutos se aplicó el protocolo de germinación de la especie *Phalaenopsis sp.*, realizando cortes en cada extremo de la cápsula (véase en la *figura 16*), luego se dividieron en 3 secciones liberando las esporas mediante un ligero raspado con el bisturí cubriendo por completo el medio *MS* las cuales fueron tapadas y selladas. Con respecto a la especie *Guzmania sp.*, los meristemos apicales provenientes de los brotes jóvenes en el transcurso de los 35 días se evidenció su crecimiento y desarrollo permitió la formación de nuevos brotes en la parte aérea del ápice, los mismos que se almacenaron en el cuarto de crecimiento.

Figura 16

Protocolo de germinación de Phalaenopsis sp.



Nota: Inserciones que se realizan para la siembra *in vitro* de las esporas de la especie *Phalaenopsis sp.*

Etapa de multiplicación de las especies *Phalaenopsis sp.*, y *Guzmania sp*

La fase de la multiplicación concierne al uso de fitohormonas para mejorar la fisiología del explante tanto en el crecimiento y desarrollo vegetativo. Se usó el medio basal Murashige Skoog aplicando los mismos componentes stock, (véase en la tabla 4). A continuación (véase en la tabla 3), las hormonas que se aplicaron en los explantes de *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Tabla 4

*Fitohormonas aplicadas en los explantes de *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.**

	Fitohormona	Dosis (mg/L^{-1})
Auxinas	ANA: Ácido 1-naftalenacético	1,860
	AIA: Ácido indol acético.	0.100
	IBA: Ácido indol-3-butírico.	0.500
Citoquininas	BAP: 6-Bencilaminopurina	2.000

Nota: protocolo de servicios agrobiotecnológicos "AGROBIOTECH".

Etapa de enraizamiento de las especies *Phalaenopsis sp.*, y *Guzmania sp.*

Se usó el medio basal Murashige Skoog (véase en la tabla 2), suplementado con auxinas para mejorar y estimular el sistema radicular (véase en la tabla 3), las cuales fueron aplicadas a las especies *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Determinación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) en los explantes de *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Preparación de las soluciones de nanopartículas de plata ($AgNP_s$)

En una balanza analítica de la marca Labolan se pesó 100 mg de $AgNP_s$ en estado sólido para preparar la solución madre de 50 ml con agua ultra pura. Con ayuda de un procesador ultrasónico VCX-130PB cuya amplitud del 75% a 2 pulsos por cada 15 segundos se homogenizo las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) para evitar aglomerados. Las concentraciones de $25mg/L^{-1}$, $50mg/L^{-1}$, $75mg/L^{-1}$ de ($AgNP_s$), se obtuvieron a partir de la solución madre de $100mg/L^{-1}$, para ser envasadas en frascos ámbar evitando su degradación y conservadas a una temperatura de 8 a 10 °C.

Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) en explantes de *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

En la fase de enraizamiento se evaluaron las cuatro dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) con sus respectivas concentraciones de 25mg/L^{-1} , 50mg/L^{-1} , 75mg/L^{-1} y 100mg/L^{-1} . Con una pipeta automática se tomó una alícuota de $1000\mu\text{l}$ de cada tratamiento con tres repeticiones cubriendo por completo el medio Murashige Skoog una vez solidificado. En cada gelatinero se realizó la siembra de un explante de las especies *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, con su respectivo testigo general para los tratamientos y su efecto antimicrobiano se evaluó por 22 días (véase en la tabla 5), los parámetros de evaluación corresponden al desarrollo fenotipo de ambas especies.

Tabla 5

*Evaluación del desarrollo fenotípico de las especies *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.**

Desarrollo fenotípico		
Siembra <i>in vitro</i> (enraizamiento)	Aclimatación <i>in vitro</i>	Aclimatación <i>ex vitro</i>
22 días.	25 días.	30 días.
Largo de hoja Número de hojas Raíces	Largo de hoja Número de hojas Raíces	Largo de hoja Número de hojas Raíces

Nota: Aplicando las dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$).

Para la medición del largo de la hoja de las especies *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, se utilizó un calibrador digital stainless hardened en unidades milimétricas (mm). El número de hojas y raíces se evaluaron en las diferentes etapas (véase en la tabla 4).

Etapas de aclimatación de las *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*

Preparación del sustrato

Los sustratos fueron adquiridos de la casa comercial Horticoop Andina y Agrobiotec, se esterilizaron en el autoclave a $120\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos y se dejó enfriar, (véase en la tabla 6), los sustratos que se utilizaron en el protocolo de aclimatación.

Tabla 6

Sustratos aplicados en la aclimatación de las especies Phalaenopsis sp. y Guzmania sp.

Sustrato	Cantidad	Beneficio
Sphagnum	3 kg	Humedad
Turba	3 kg	Sustrato suelto.
Fibra de coco	3 kg	Libre de compactación.
Pomina	6 kg	Drenante

Nota: Protocolos de aclimatación de "AGROBIOTECH".

Se mezclaron los sustratos en un $1L^{-1}$ de agua esteril, los envases que se utilizaron en la *Phalaenopsis sp.*, fueron de 9 x 15 cm y la especie *Guzmania sp.*, fueron de 7 x 5 cm. Para evaluar el crecimiento y desarrollo del explante se midió nuevamente el ancho x largo de la hoja, número de hojas y raíces a los 22 días, 25 días y 30 días.

Diseño experimental

Efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (AgNP_s)

Porcentaje y presencia de contaminación *in vitro*

El porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica se evaluó con el número de envases contaminados por microorganismos aplicando la siguiente formula:

Figura 17

Porcentaje de contaminación.

$$\% \text{ de contaminación (tratamiento)} = \frac{\# \text{ de envases contaminados}}{\# \text{ de envases totales}} \times 100$$

Nota: Contaminación microbiana.

Tabla 7

Datos obtenidos del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) en la etapa *in vitro* de los explantes de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp*

Tipo de especie	Dosis de ($AgNP_s$)	Contaminación microbiana
<i>Guzmania sp.</i>	0 mg/L ⁻¹	60%
<i>Guzmania sp.</i>	0 mg/L ⁻¹	60%
<i>Guzmania sp.</i>	0 mg/L ⁻¹	60%
<i>Guzmania sp.</i>	25 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	25 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	25 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	50 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	50 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	50 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	75 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	75 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	75 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	100 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	100 mg/L ⁻¹	0%
<i>Guzmania sp.</i>	100 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	0 mg/L ⁻¹	80%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	0 mg/L ⁻¹	80%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	0 mg/L ⁻¹	80%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	25 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	25 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	25 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	50 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	50 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	50 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	75 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	75 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	75 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	100 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	100 mg/L ⁻¹	0%
<i>Phalaenopsis sp.</i>	100 mg/L ⁻¹	0%

Nota: Evaluación del efecto antimicrobiano durante 22 días.

Factores de estudio y niveles de experimento

Tabla 8

Factores de niveles a probar en el estudio de las especies *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y desarrollo fenotípico.

Factores	Simbología	Niveles
Especies (A)	a_0	<i>Phalaenopsis sp.</i>
	a_1	<i>Guzmania sp.</i>
Nanopartículas de plata (B)	b_0	$0mg/L^{-1}$
	b_1	$25mg/L^{-1}$
	b_2	$50mg/L^{-1}$
	b_3	$75mg/L^{-1}$
	b_4	$100mg/L^{-1}$
Desarrollo fenotípico (C)	c_0	siembra <i>in vitro</i>
	c_1	aclimatación <i>in vitro</i>
	c_2	aclimatación <i>ex vitro</i>

Nota: Autoría propia.

Comparación de los tratamientos.

Tabla 9

Tratamientos a comparar en el estudio de las especies *Phalaenopsis* sp. y *Guzmania* sp., dosis de nanopartículas de plata (AgNP_s) y desarrollo fenotípico.

<i>N</i> ^o	Interacciones	Niveles
T1	$a_0b_0c_0$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 0mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T2	$a_0b_0c_1$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 0mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T3	$a_0b_0c_2$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 0mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T4	$a_0b_1c_0$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 25mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T5	$a_0b_1c_1$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 25mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T6	$a_0b_1c_2$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 25mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T7	$a_0b_2c_0$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 50mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T8	$a_0b_2c_1$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 50mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T9	$a_0b_2c_2$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 50mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T10	$a_0b_3c_0$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 75mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T11	$a_0b_3c_1$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 75mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T12	$a_0b_3c_2$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 75mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T13	$a_0b_4c_0$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 100mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T14	$a_0b_4c_1$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 100mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T15	$a_0b_4c_2$	<i>Phalaenopsis</i> sp. + 100mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T16	$a_1b_0c_0$	<i>Guzmania</i> sp. + 0mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T17	$a_1b_0c_1$	<i>Guzmania</i> sp. + 0mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T18	$a_1b_0c_2$	<i>Guzmania</i> sp. + 0mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T19	$a_1b_1c_0$	<i>Guzmania</i> sp. + 25mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T20	$a_1b_1c_1$	<i>Guzmania</i> sp. + 25mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T21	$a_1b_1c_2$	<i>Guzmania</i> sp. + 25mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T22	$a_1b_2c_0$	<i>Guzmania</i> sp. + 50mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T23	$a_1b_2c_1$	<i>Guzmania</i> sp. + 50mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T24	$a_1b_2c_2$	<i>Guzmania</i> sp. + 50mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T25	$a_1b_3c_0$	<i>Guzmania</i> sp. + 75mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T26	$a_0b_3c_1$	<i>Guzmania</i> sp. + 75mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T27	$a_1b_3c_2$	<i>Guzmania</i> sp. + 75mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>
T28	$a_1b_4c_0$	<i>Guzmania</i> sp. + 100mg/L ⁻¹ + siembra <i>in vitro</i>
T29	$a_1b_4c_1$	<i>Guzmania</i> sp. + 100mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>in vitro</i>
T30	$a_1b_4c_2$	<i>Guzmania</i> sp. + 100mg/L ⁻¹ + aclimatación <i>ex vitro</i>

Nota: Autoría propia.

Tipo de diseño experimental

Se aplicó un ANOVA trifactorial AXBXC (2X4X3), donde el factor *A* son las especies, factor *B* las distintas dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y el factor *C*, el desarrollo fenotípico.

Repeticiones

En el diseño experimental se aplicaron 3 repeticiones por cada tratamiento obteniendo un total de 30 unidades experimentales.

Análisis estadístico

Tabla 10

Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de las especies Phalaenopsis sp. y Guzmania sp., dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y desarrollo fenotípico.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Tipo de especies	$a - 1$	1
Dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$)	$b - 1$	3
Desarrollo fenotípico	$c - 1$	2
Tipo de especies + Dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$)	$(a - 1)(b - 1)$	3
Tipo de especies + Desarrollo fenotípico	$(a - 1)(c - 1)$	2
Dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) + desarrollo fenotípico	$(b - 1)(c - 1)$	6
Tipo de especies + Dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) + Desarrollo fenotípico.	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	6
Réplicas	$R - 1$	2
Error experimental	$gt - \sum gl$	58
Total		89

Análisis funcional

Para las variables que presentaron diferencia significativa en los análisis de varianza se aplicó la prueba de significancia Tukey ($P < 0,05$).

Análisis de Krus Kall

Para la determinación del número de hojas y raíces se aplicó la prueba no paramétrica de Krus Kall con la interacción AxBxC.

Programas estadísticos

Se usaron los programas infostat y RStudio.

Capítulo IV

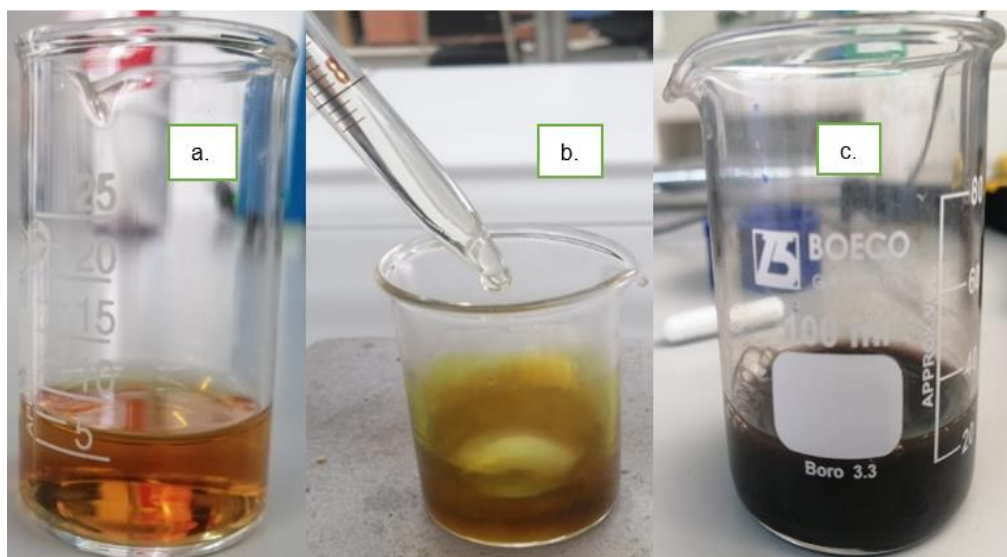
Resultados

Síntesis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$)

El extracto de la hojas de té verde (*Camellia sinensis sp.*), presenta un color café-rojizo que al ajustar el pH a 11 su coloración cambio a amarillo y finalmente al estar en contacto con el precursor metálico ($AgNO_3$) se visualizó un color marrón-negruzco que indica la formación de nanopartículas de plata ($AgNP_s$), (véase en la figura 18).

Figura 18

Síntesis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$)



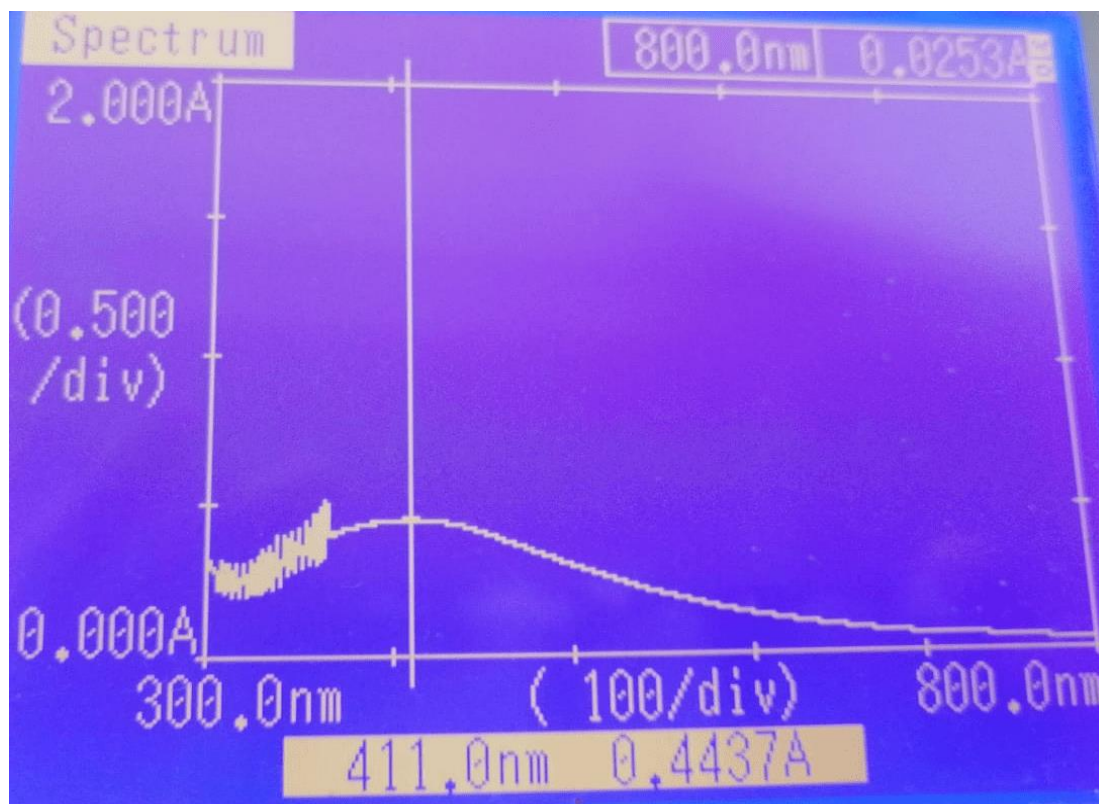
Nota: (a). Extracto del Té verde (*Camellia sinensis sp.*), (b). Ajuste de pH del agente reductor, (c), Agente reductor- precursor metálico ($AgNO_3$).

Caracterización de ($AgNP_s$) de espectroscopia UV-Vis

Dicha técnica nos permitió obtener el primer análisis de la formación de $AgNP_s$ estableciendo una relación 1:9 corroborada por Widatalla et al., (2022) obteniendo una absorbancia de 411,0 nm, (véase en la figura 19). Por otro parte no se evidencio la presencia de más picos lo cual indica que la síntesis fue eficiente y presenta estabilidad.

Figura 19

Espectrofotometría de Uv-vis.



Nota: Espectro UV-Vis nanopartículas de plata ($AgNP_s$), sintetizadas por el método verde.

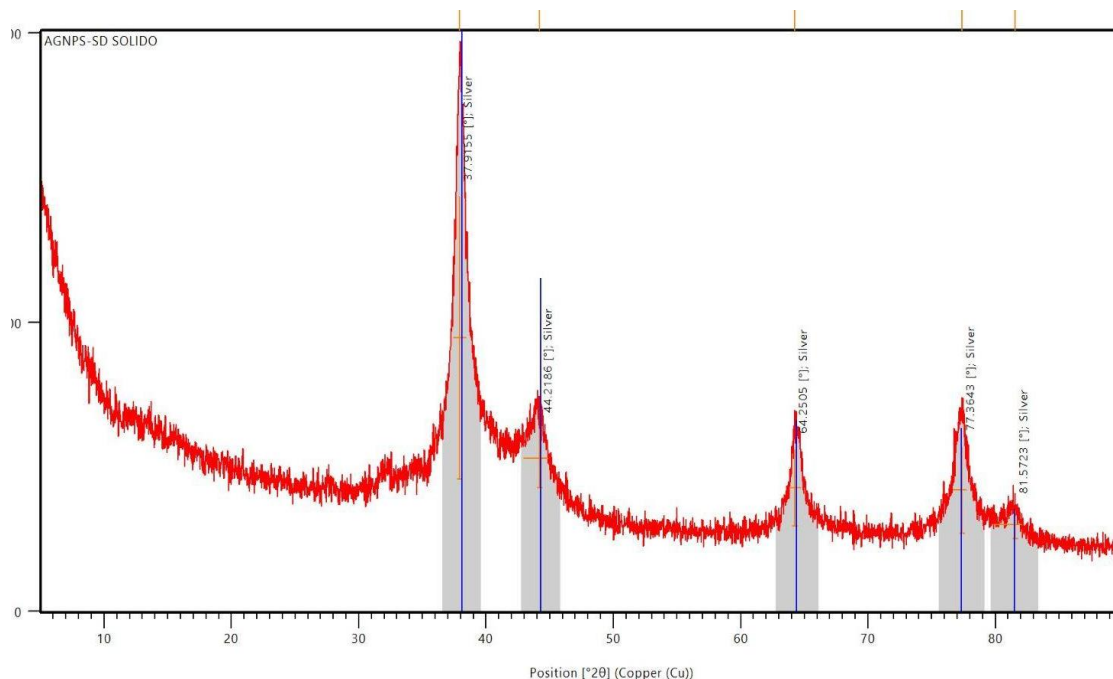
Difracción de rayos X (XRD)

Los patrones de XRD para las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) sintetizados por hojas de té verde (*Camelias sinensis*) alcanzaron la formación de cinco picos de difracción característicos principales de la plata (Ag) en $2\theta = 38^\circ, 43^\circ, 68^\circ, 77^\circ$ y 81° de naturaleza cristalina. Para definir el tamaño de la nanopartícula se usó la ecuación de Sherrer para determinar el diámetro promedio de los cristalitos a partir de la mitad del ancho de los picos de difracción: $D = (k\lambda)/(\beta \cos \theta)$; en donde, D es el tamaño medio de los cristalitos del polvo, λ es la longitud de onda de $Cu \alpha$, β es el ancho completo a la mitad del máximo y θ es el ángulo de difracción de Bragg y K es una constante; considerando la posición máxima (2θ) de 38° , FWHM (2θ) en 1.0396

y λ es la longitud de onda de $\text{Cu } \alpha$ en 0,15418, se obtuvo un tamaño 8,44 nm, (véase en la figura 20).

Figura 20.

Difracción de rayos X de nanopartículas de plata (AgNP_s).



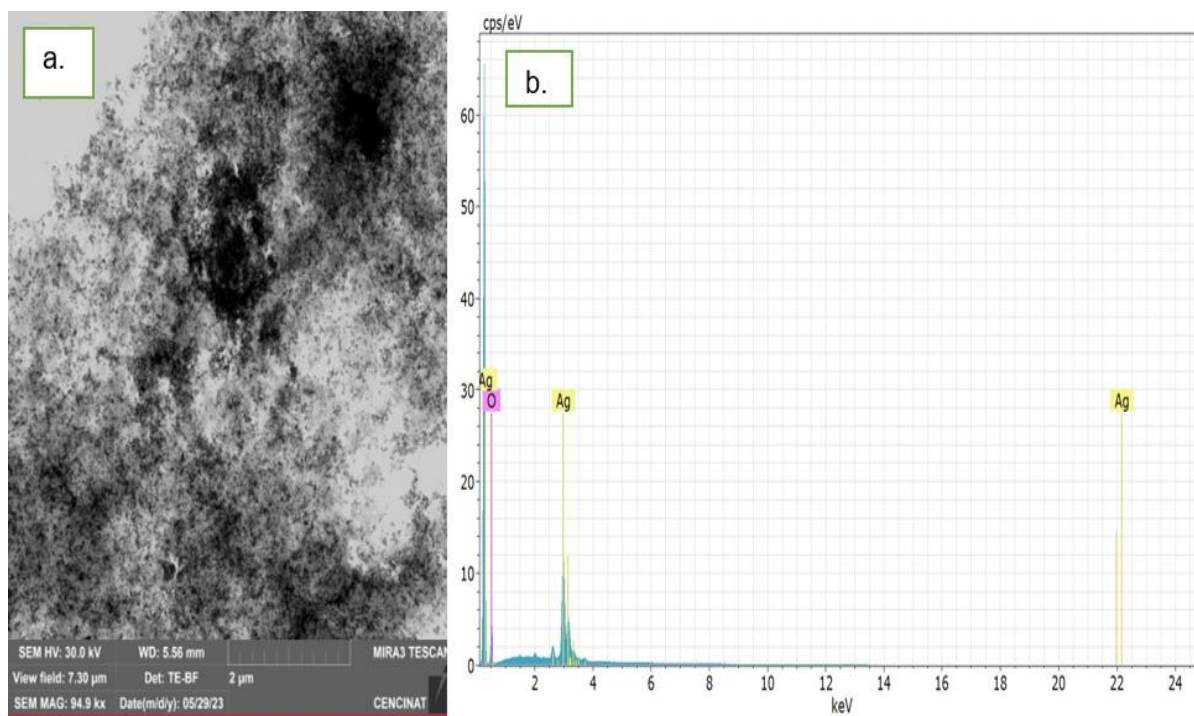
Nota: El pico 38° determinan la presencia de plata (Ag)

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y (EDS)

Las imágenes obtenidas del SEM tenían una baja resolución que no permitió visualizar correctamente el tamaño y la morfológica de las nanopartículas de plata (AgNP_s) a una escala de $2 \mu\text{m}$, (véase en la figura 21). Con respecto al análisis de la composición química elemental por EDS, la plata (Ag) fue el más prominente con una alta diferencia significativa al oxígeno (O_2), siendo el componente principal de la formación de la nanopartículas (AgNP_s). El mapeo elemental (véase en la figura 22) determinó el patrón de difracción gris brillante que confirma la estructura cristalina de las (AgNP_s) y la cinta de carbono con un color negro para distinguir que ($\text{Ag} > \text{c}$) y finalmente con un color rojo se diferenció la plata (Ag^0) y un color verde el oxígeno (O_2) con una escala de $5 \mu\text{m}$.

Figura 21

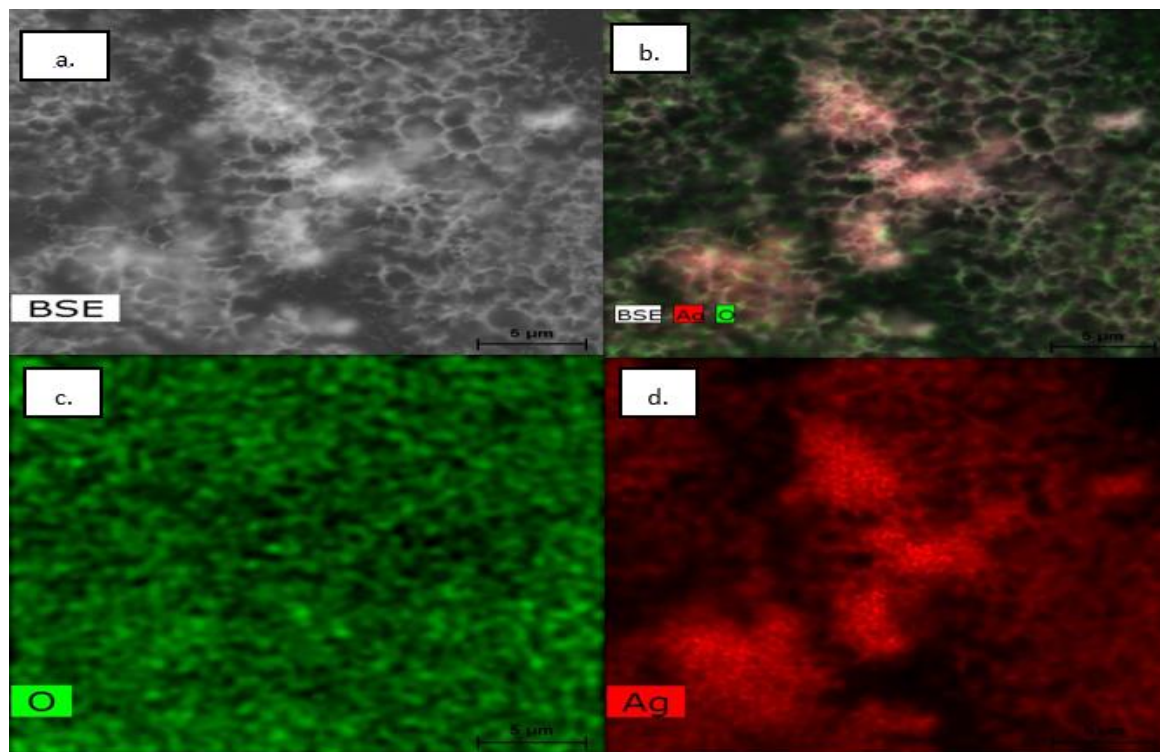
Micrografía del SEM y análisis químico elemental de (AgNP_s)



Nota: Determinación de Ag⁰ indicando la formación de (AgNP_s)

Figura 22

Caracterización de la plata ($AgNP_s$) en el mapeo elemental.



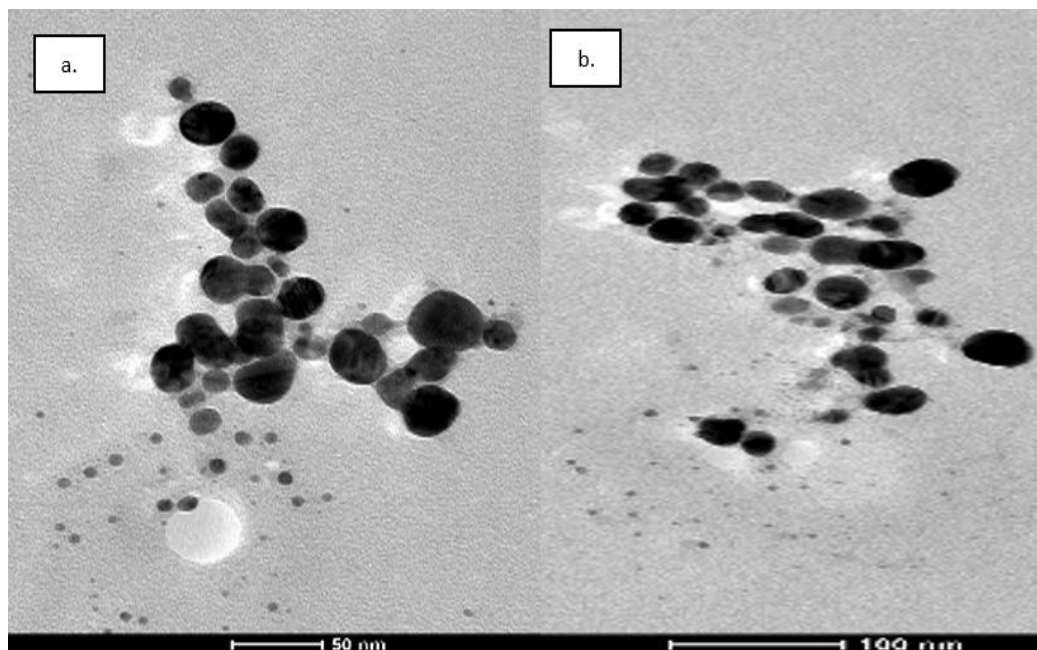
Nota: (a) Mapeo de la plata (Ag) y la cinta de carbono; (b) Mapeo de la plata (Ag) y el oxígeno (O_2); (c) Mapeo del oxígeno (O_2); (d) Mapeo de la plata (Ag).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) en su mayoría fueron esferoides u ovaladas con un diámetro de $44,35 \text{ nm} \pm 4,032 \text{ nm}$ estableciendo una \bar{X} de $17,58 \text{ nm}$ en una escala de 50 nm , (véase en la figura 23), a partir de 38 datos en el programa Origin 2023b, (véase en la figura 24). Por otro lado, aplicando el modelo gaussiano se obtuvo un tamaño $9,38 \text{ nm}$ que se asemeja al tamaño obtenido en (XRD) con una media de $7,42 \text{ nm}$.

Figura 23

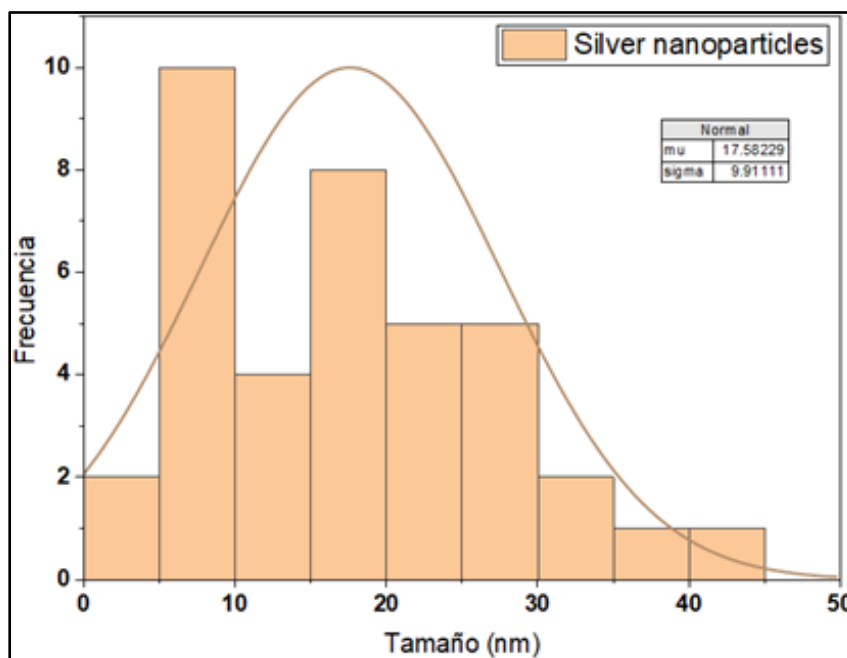
Micrografía usando TEM para la determinar el tamaño de las (AgNPs).



Nota: (a) micrografía de (AgNPs) en una escala de 50nm, (b) escala de 100 nm.

Figura 24

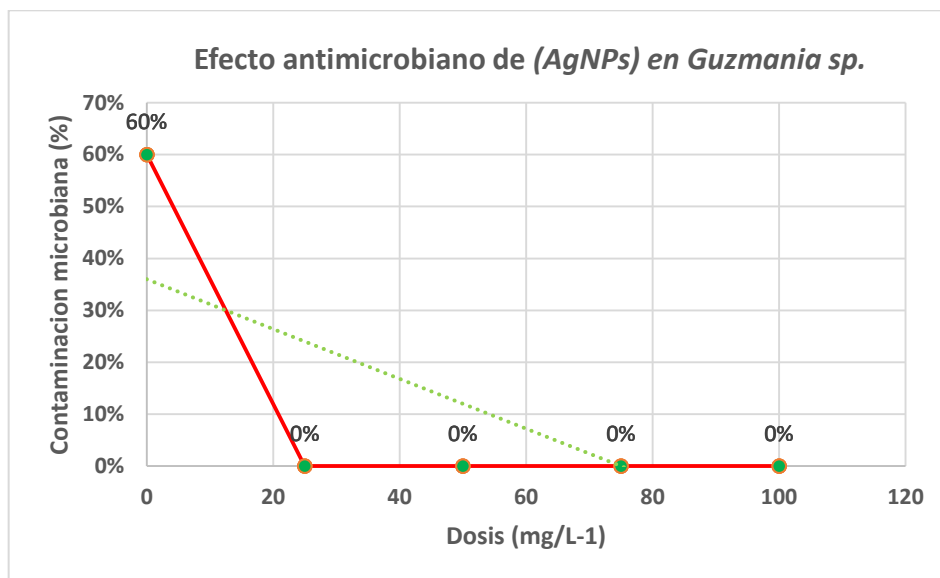
Tamaño de las (AgNPs) por TEM.



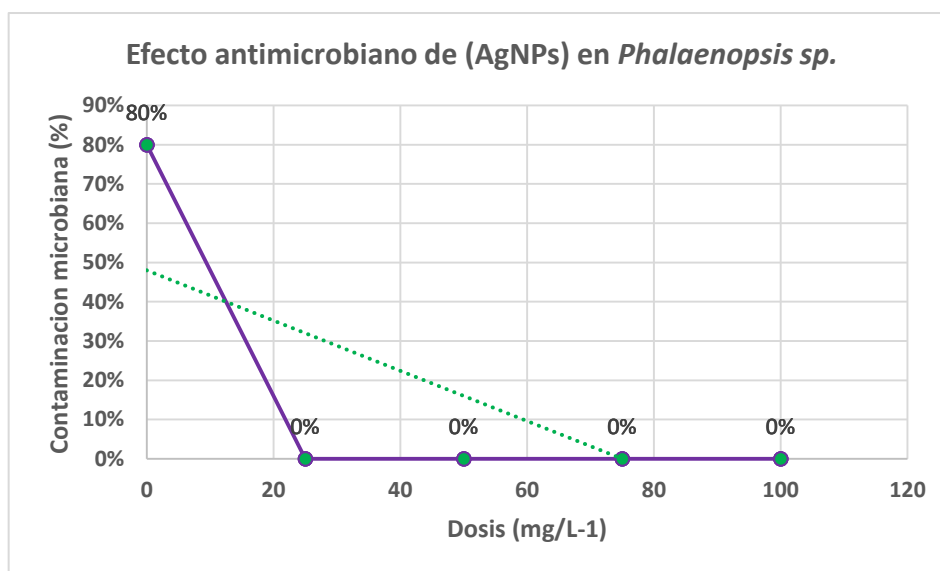
Nota: Se obtuvo a partir de imagej y programa Origin 2023b

Efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$)

Los explantes de las especies *Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*, se evaluaron en la etapa *in vitro* específicamente en la fase de enraizamiento por un periodo de 22 días. (véase en las gráficas 1 y 2).



Grafica 1. Determinación del efecto antimicrobiano en dosis de $25mg/L^{-1}$, $50 mg/L^{-1}$, $75 mg/L^{-1}$ y $100mg/L^{-1}$ de ($AgNP_s$) en explantes de *Guzmania sp.*



Grafica 2. Determinación del efecto antimicrobiano en dosis de $25mg/L^{-1}$, $50 mg/L^{-1}$, $75 mg/L^{-1}$ y $100mg/L^{-1}$ de ($AgNP_s$) en explantes de *Phalaenopsis sp.*

En el *grafico 1 y 2*. Se demostró que a menor concentración de nanopartículas de plata (0 mg/L^{-1}) mayor contaminación microbiana y a medida que se establecen concentraciones de (25mg/L^{-1}), (50mg/L^{-1}), (75mg/L^{-1}) y (100mg/L^{-1}) mejora el efecto antimicrobiano. Los explantes de *Guzmania sp.*, presentaron una contaminación del 60% mientras que los explantes de la *Phalaenopsis sp.*, alcanzaron un 80% en el testigo considerando una contaminación microbiana elevada, (*véase en la figura 25*). Por otra parte la contaminación de los explantes esta influencia por el manejo de siembra, los protocolos de desinfección y la esterilización del material.

Figura 25

Contaminación microbiana de las especies Phalaenopsis sp. y Guzmania sp.



Nota: (a) Contaminación de *Guzmania sp.*, (b) contaminación de la *Phalaenopsis sp.*, ocasionado por el hongo *Penicillium*.

Análisis de varianza en el largo de la hoja (mm)

Tabla 11

Análisis de varianza para evaluar el largo de la hoja después de 22, 25 y 30 días, ($P < 0,05$).

FV	SC	gl	CM	F	P-valor
A: Tipo de especies	38346.64	1	38346.64	458.13	<0.0001
B: Dosis mg/L^{-1} (AgNPs)	2231.60	4	557.90	6.67	0.0002
C: Desarrollo Fenotípico	1923.45	2	961.72	11.49	0.0001
Replicas	88.84	2	44.42	0.53	0.5910
AB	1389.62	4	347.41	4.15	0.0050
AC	171.02	2	85.51	1.02	0.3664
BC	582.49	8	72.81	0.87	0.5470
ABC	387.25	8	48.41	0.58	0.7915
Error	4854.77	58	83.70		
TOTAL	49975.68	89			

Nota: Se evidencia diferencia significativa para el tipo de especies, las dosis en mg/L^{-1} de (AgNPs), el desarrollo fenotípico considerando que las réplicas no presentaron diferencia significativa dando a entender que el ambiente no influye sobre los tratamientos.

En la tabla 8. Se determinó que el tipo de especie "*Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*", son distintas ($0.0001 < 0,05$), por lo tanto las dosis de nanopartículas de plata (AgNPs), ($0.0002 < 0,05$) van a influir en el área foliar que concierne en el desarrollo fenotípico ($0.0001 < 0,05$) evaluado en la siembra *in vitro*, aclimatación *in vitro* y aclimatación *ex vitro*. La interacción AB, presentó diferencia significativa puesto que ($0.0001 < 0,05$) por lo tanto el tipo de especie a evaluar varía respecto a las dosis de (AgNPs). Finalmente en la interacción AC, BC y ABC no se encontró diferencia significativa.

Tabla 12

Tukey ($P < 0,05$) aplicado al tipo de especie.

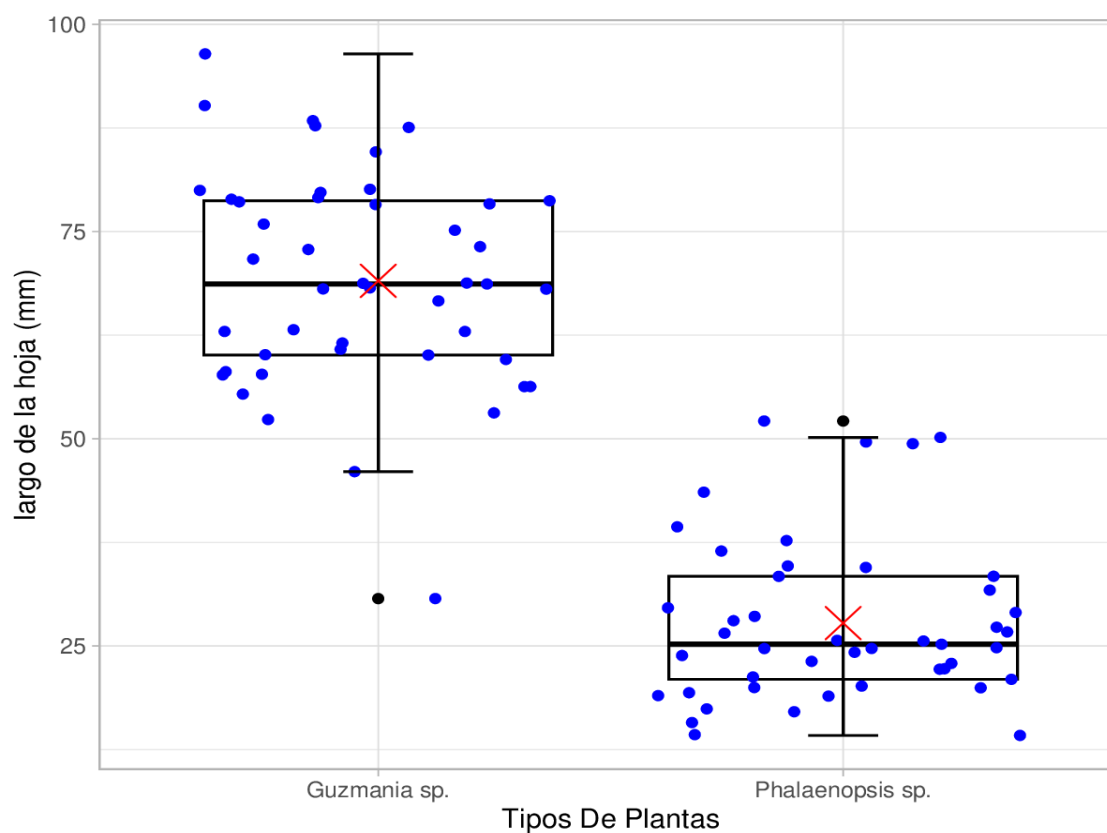
Factor A	Medias
a_0 <i>Phalaenopsis</i> sp.	27.77 ^A
a_1 <i>Guzmania</i> sp.	69.05 ^B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 26

Análisis del largo de la hoja (mm) con respecto al factor A: tipo de especie

(*Phalaenopsis* sp. y *Guzmania* sp.)



Nota: Se obtuvo diferencia significativa en el factor A: tipo de especie (*Phalaenopsis* sp. y *Guzmania* sp.) con el largo de la hoja.

En la figura 20. Se obtuvo grupos dos independientes: A= ($a_0=27,77$) y B= ($a_1=69,05$) por lo tanto se determinó que la especie de *Guzmania sp.*, presentó un mayor crecimiento respecto al largo de la hoja. En el caso de la especie *Phalaenopsis sp.*, no fue tan relevante, considerando que la morfológica de la plata puede influir en el tipo de especie vegetal a estudiar.

Tabla 13

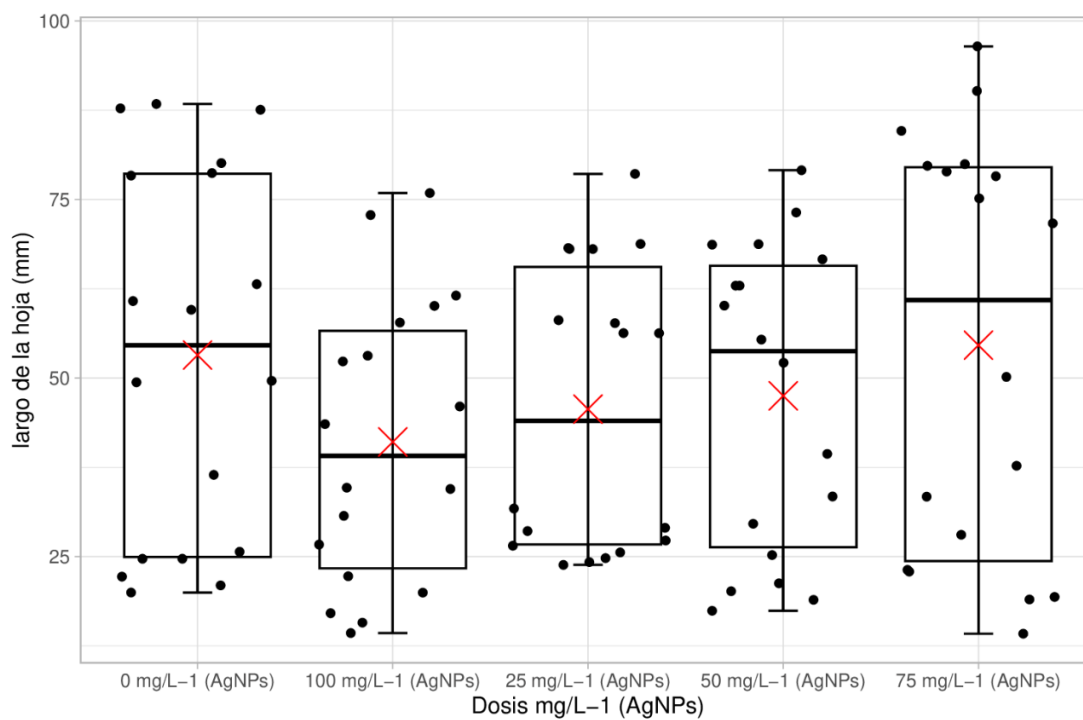
Tukey ($P < 0,05$) aplicando las dosis de ($AgNP_5$).

Factor B	Medias
b_0 $0mg/L^{-1}$	41.06 ^A
b_1 $25mg/L^{-1}$	45.65 ^{A B}
b_2 $50mg/L^{-1}$	47.52 ^{A B C}
b_3 $75mg/L^{-1}$	53.23 ^{B C}
b_4 $100mg/L^{-1}$	54.61 ^C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 27

Análisis del largo de la hoja con respecto al factor B: dosis de nanopartículas de plata (AgNP_s)



Nota: Se obtuvo diferencia significativa en el factor B: dosis de (AgNP_s) con respecto al largo de la hoja.

En la figura 1. Se evidenció 3 grupos homogéneos: A=(b₀,b₁,b₂), B=(b₁,b₂,b₃) y C=(b₂,b₃,b₄), por lo tanto la dosis de (100mg/L⁻¹) fue la que más influyó en el largo de la hoja.

Tabla 14

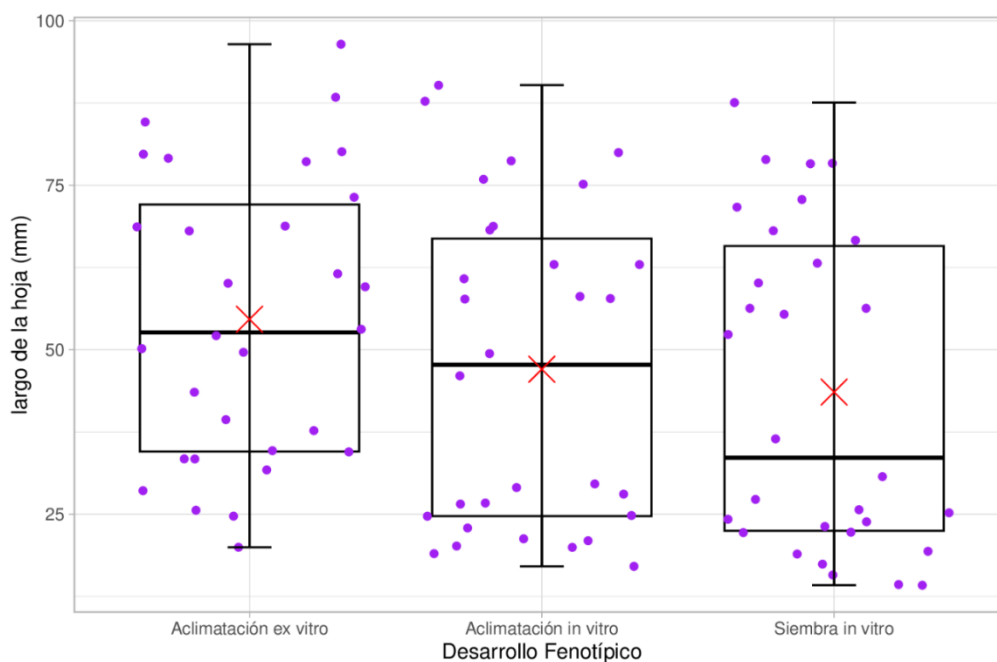
Tukey ($P < 0,05$) aplicando el desarrollo fenotípico.

Factor C	Medias
c ₀ Siembra in vitro	43.56 ^A
c ₁ Aclimatación in vitro	47.04 ^A
c ₂ Aclimatación ex vitro	54.64 ^B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 28

Análisis del largo de la hoja en el factor C: desarrollo fenotípico.



Nota: Se obtuvo diferencia significativa en el factor C: Desarrollo fenotípico evaluando el crecimiento del largo de la hoja en las siguientes etapas: siembra *in vitro*, aclimatación *in vitro*, aclimatación *ex vitro*.

En la figura 22. Se determinó un grupo homogéneo: A= (c_0, c_1) y un grupo independiente B= (c_2) por lo tanto se concluye que la aclimatación *ex vitro* presento un mayor crecimiento en el largo de la hoja.

Tabla 15

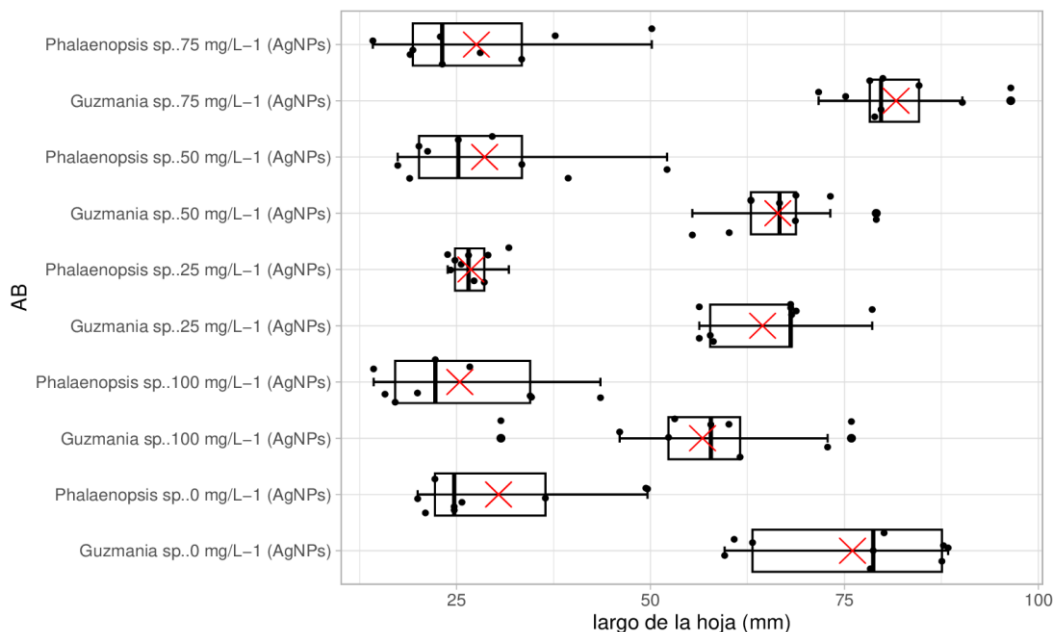
*Tukey (P < 0,05) interacción AB: tipo de especies*dosis de (AgNP_S).*

Interacción AB.	Medias
$\alpha_0 b_0$ <i>Phalaenopsis sp.</i> * 0mg/L ⁻¹	25.42 ^A
$\alpha_0 b_1$ <i>Phalaenopsis sp.</i> * 25mg/L ⁻¹	26.85 ^A
$\alpha_0 b_2$ <i>Phalaenopsis sp.</i> * 50mg/L ⁻¹	27.55 ^A
$\alpha_0 b_3$ <i>Phalaenopsis sp.</i> * 75mg/L ⁻¹	28.62 ^A
$\alpha_0 b_4$ <i>Phalaenopsis sp.</i> * 100mg/L ⁻¹	30.41 ^A
$\alpha_1 b_0$ <i>Guzmania sp.</i> * 0mg/L ⁻¹	56.71 ^B
$\alpha_1 b_1$ <i>Guzmania sp.</i> * 25mg/L ⁻¹	64.45 ^{B C}
$\alpha_1 b_2$ <i>Guzmania sp.</i> * 50mg/L ⁻¹	66.42 ^{B C}
$\alpha_1 b_3$ <i>Guzmania sp.</i> * 75mg/L ⁻¹	76.04 ^{C D}
$\alpha_1 b_4$ <i>Guzmania sp.</i> * 100mg/L ⁻¹	81.66 ^D

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 29

Análisis de la interacción AB: factor A= tipo de especies * factor B=dosis de ($AgNP_5$).



Nota: Se obtuvo diferencia significativa en la interacción AB: A=tipo de especie (*Phalaenopsis sp.* y *Guzmania sp.*) y B= dosis de ($AgNP_5$).

En la figura 23. Se determinó 4 grupos homogéneos: A= ($a_0b_0, a_0b_1, a_0b_2, a_0b_3, a_0b_4$); B= (a_1b_0, a_1b_1, a_1b_2); C= (a_1b_1, a_1b_2, a_1b_3) y D= (a_1b_3, a_1b_4) por lo tanto se concluye que la dosis de $100mg/L^{-1}$ fue la más eficiente en el largo de la hoja de la especie de *Guzmania sp.*

Tabla 16

Tukey ($P < 0,05$) interacción AC: tipo de especie * desarrollo fenotípico.

Interacción AC	Medias
a_0c_0 <i>Phalaenopsis sp.</i> * siembra in vitro	22.02 ^A
a_0c_1 <i>Phalaenopsis sp.</i> *aclimatación in vitro	25.35 ^A
a_0c_2 <i>Phalaenopsis sp.</i> *aclimatación ex vitro	35.94 ^B
a_1c_0 <i>Guzmania sp.</i> * siembra in vitro	65.10 ^C
a_1c_1 <i>Guzmania sp.</i> *aclimatación in vitro	68.73 ^C
a_1c_2 <i>Guzmania sp.</i> *aclimatación ex vitro	73.33 ^C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

En la tabla 14. No se encontró diferencia significativa en la interacción AC, sin embargo se identificó 1 grupo independiente: B= (a_0c_2) y 2 grupos homogéneos: A= (a_0c_0, a_0c_1); C= (a_1c_0, a_1c_1, a_1c_2) se concluye que el control presenta igualdad con los tratamientos y que la interacción $C = a_1c_2$, tuvo un mayor crecimiento en el largo de la hoja en la etapa *ex vitro*.

Tabla 17

Tukey ($P < 0,05$) interacción BC: Dosis de ($AgNP_5$) *desarrollo fenotípico.

Interacción BC	Medias
b_4c_0 100mg/L ⁻¹ * siembra <i>in vitro</i>	34.70 ^A
b_4c_1 100mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>in vitro</i>	40.58 ^{A B}
b_3c_0 50mg/L ⁻¹ * siembra <i>in vitro</i>	40.63 ^{A B}
b_1c_0 25mg/L ⁻¹ * siembra <i>in vitro</i>	42.67 ^{A B}
b_1c_1 25mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>in vitro</i>	44.07 ^{A B}
b_2c_1 50mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>in vitro</i>	44.28 ^{A B}
b_3c_0 75mg/L ⁻¹ * siembra <i>in vitro</i>	47.59 ^{A B C}
b_4c_2 100mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>ex vitro</i>	47.91 ^{A B C}
b_1c_2 25mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>ex vitro</i>	50.22 ^{A B C}
b_0c_0 0mg/L ⁻¹ * siembra <i>in vitro</i>	52.23 ^{A B C}
b_3c_1 75mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>in vitro</i>	52.55 ^{A B C}
b_0c_2 0mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>ex vitro</i>	53.72 ^{B C}
b_0c_1 0mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>in vitro</i>	53.73 ^{B C}
b_1c_2 50mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>ex vitro</i>	57.65 ^{B C}
b_3c_2 75mg/L ⁻¹ * aclimatación <i>ex vitro</i>	63.68 ^C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes

En la tabla 15: No se encontró diferencia significativa en la interacción BC, sin embargo se logró identificar 3 grupos homogéneos: A=($b_4c_0, b_4c_1, b_3c_0, b_1c_0, b_1c_1, b_2c_1, b_3c_0, b_4c_2, b_1c_2, b_0c_0, b_3c_1$); B=($b_4c_1, b_3c_0, b_1c_0, b_1c_1, b_2c_1, b_3c_0, b_4c_2, b_1c_2, b_0c_0, b_3c_1, b_0c_2, b_0c_1, b_1c_2$); C=($b_3c_0, b_4c_2, b_1c_2, b_0c_0, b_3c_1, b_0c_2, b_0c_1, b_1c_2, b_3c_2$), se concluye que el control presenta igualdad con las interacciones. La interacción $C = b_3c_2$ presento una media de 63.68 teniendo un mayor crecimiento en el largo de la hoja. De igual manera en la interacción AxByC no se encontró diferencia significativa.

Análisis de Krus Kall respecto al # de hoja de las especies de *Phalaenopsis sp.* y

Guzmania sp

Tabla 18

Krus Kall ($P < 0,05$) con respecto al número de hoja.

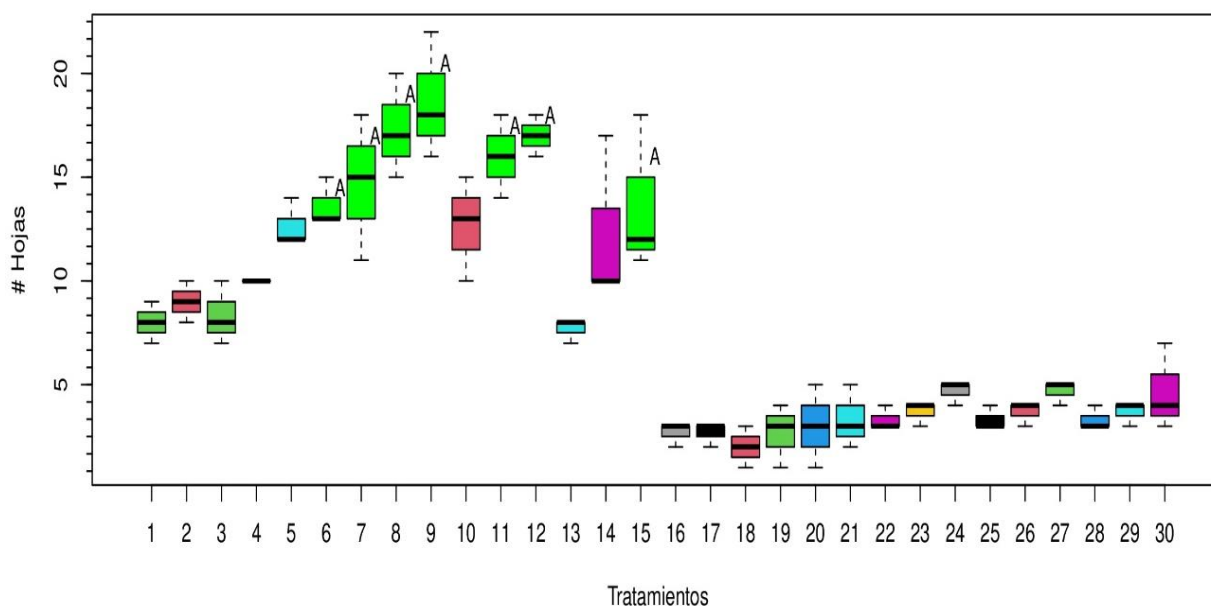
Chisq	81.29369	
Df	29	
p.chisq	7.479002e-07	
t.value	2.000298	
MSD	15.19388	
Número de hojas	Medias	Grupos
9	85.00000	A
12	82.33333	AB
8	82.16667	ABC
11	79.16667	ABC
7	75.33333	ABC
15	72.50000	ABCD
6	71.83333	ABCD
5	68.83333	BCDE
10	68.33333	BCDE
14	67.00000	CDEF
4	59.50000	DEFG
2	55.00000	EFG
3	52.33333	FGH
1	50.66667	GH
13	49.50000	GH
24	38.33333	HI
27	38.33333	HI
30	31.66667	IJ
23	26.83333	IJK
26	26.83333	IJK
29	26.83333	IJK
22	21.66667	JKL
25	21.66667	JKL
28	21.66667	JKL
21	21.16667	JKL
20	20.00000	JKL
19	16.83333	JKL
16	12.83333	KL
17	12.83333	KL
18	8.00000	I

Nota: Se obtuvo diferencia significativa con respecto a la interacción $A \times B \times C$: tipo de especie (*Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*), dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y el desarrollo genotípico.

En la tabla 14. Se determinó que ($7.479002e - 07 < 0,05$) puesto que el número de hojas depende del tipo de especie, las dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y las etapas en las cuales se evaluó el desarrollo fenotípico.

Figura 30

Evaluación del # de hojas de las especies Guzmania sp., y Phalaenopsis sp., respecto a la dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y el desarrollo genotípico.



Nota: Con respecto a las interacciones AxBxC evaluadas en ambas especies *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, se determinó diferencias con respecto al número de hojas, por lo tanto A representa la igualdad en los tratamientos con respecto a la dosis de ($AgNP_s$) y desarrollo fenotípico expresado en un diagrama de caja y bigotes.

En la grafico 3. Se obtuvo un mayor número de hojas en la especie de *Guzmania sp.*, en la cual se evidencio que la dosis de 50 mg/L^{-1} influyo en las siguientes etapas: siembra *in vitro*, aclimatación *in vitro* y aclimatación *ex vitro*, (7, 8,9). Con respeto a la dosis de 75 mg/L^{-1} se reporta un mayor número de hojas en las etapas de: aclimatación *in vitro* y *ex vitro*, (11,12). La dosis de 25 mg/L^{-1} y 100 mg/L^{-1} en la etapa de aclimatación *ex vitro* presento un mayor número de hojas, (6,15). En el caso de la especie *Phalaenopsis sp.*, no se obtuvo igualdad en las dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) ni en el desarrollo fenotípico. Los controles sin la dosis de

nanopartículas de plata ($AgNP_s$) genero una disminución en el número de hojas en la etapa *ex vitro*.

Análisis de Krus Kall respecto al # de raíces de las especies de *Phalaenopsis* sp. y

Guzmania sp

Tabla 19

Krus Kall ($P < 0,05$) determinación del número de raíces.

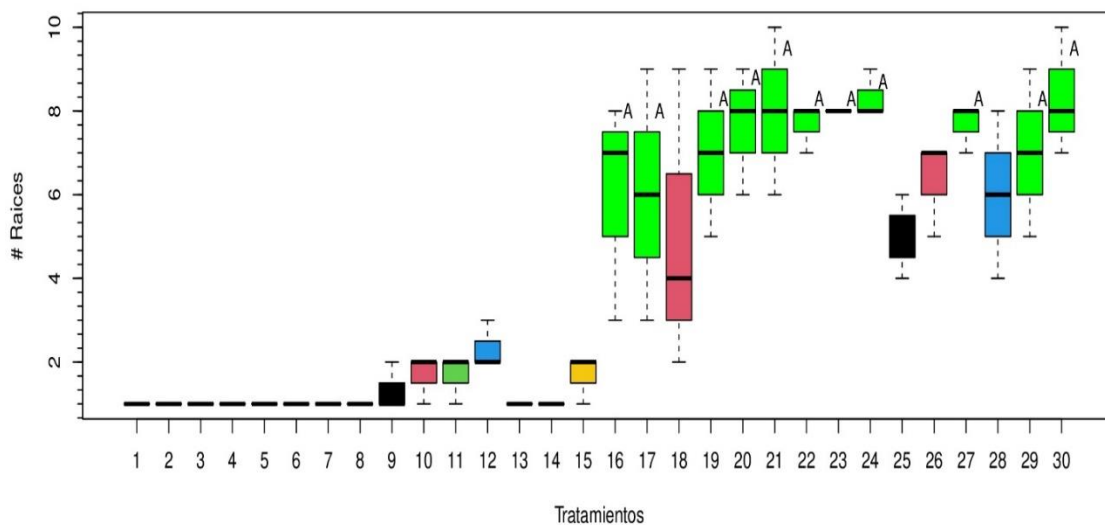
Chisq	78.59118	
Df	29	
p.chisq	1.858833e-06	
t.value	2.000298	
MSD	17.18265	
Número de raíces	Medias	Grupos
24	78.83333	A
30	76.50000	AB
23	75.50000	ABC
21	74.33333	ABC
20	73.00000	ABC
22	71.83333	ABC
27	71.83333	ABC
19	67.83333	ABCD
29	67.83333	ABCD
17	63.50000	ABCD
16	62.33333	ABCD
28	61.16667	BCD
26	60.83333	BCD
18	58.66667	CDE
25	53.83333	DE
12	42.66667	EF
10	33.00000	FG
11	33.00000	FG
15	33.00000	FG
9	25.50000	FG
1	18.00000	G
2	18.00000	G
3	18.00000	G
4	18.00000	G
5	18.00000	G
6	18.00000	G
7	18.00000	G
8	18.00000	G
13	18.00000	G
14	18.00000	G

Nota: Se obtuvo diferencia significativa con respecto a la interacción AxBxC: El tipo de especie (*Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*), dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y el desarrollo fenotípico.

En la tabla 15. Se determinó que ($1.858833e - 06 < 0,05$) puesto que, el número de raíces va depender del tipo de especie, la dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y las etapas: siembra *in vitro*, aclimatación *in vitro* y aclimatación *ex vitro* respecto al desarrollo fenotípico.

Figura 31

Evaluación del # de raíces en las especies de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, respecto a la dosis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) y el desarrollo fenotípico.



Nota: Las interacciones AxBxC evaluadas en las especies *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, determino diferencias con respeto al número de raíces. A representa igualdad en los tratamientos con respecto a la dosis de ($AgNP_s$) y el desarrollo fenotípico expresado en el diagramas de caja y bigotes.

En el grafico 4. Se obtuvo un mayor número de raíces en la especie *Phalaenopsis sp.* La dosis de ($25 mg/L^{-1}$) y ($50mg/L^{-1}$) influyo en las etapas de: siembra *in vitro*, aclimatación *in vitro* y aclimatación *ex vitro*, (19,20,21,22,23,24). En la dosis de ($100mg/L^{-1}$) se reportó un crecimiento

de raíces en la aclimatación *in vitro* y *ex vitro*, (29,30). En el caso de la dosis de (75mg/L^{-1}) se obtuvo en la aclimatación *ex vitro*, (27). Con respecto al testigo se evidencio igualdad en el número de raíces en la siembra *in vitro* y aclimatación *in vitro*, (16,17), sin embargo en la aclimatación *ex vitro* disminuyo, (18). En el caso de la especie *Guzmania sp.*, el crecimiento de raíces fue minoritario, aparentemente de todas la dosis aplicadas el tratamiento de 75mg/L^{-1} resalto mejorando el número de raíces.

Características cualitativas de las especies *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*

El efecto de las nanopartículas de plata (AgNP_s) en las especies de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, ha tenido una influencia significativa respecto al desarrollo fenotípico que se evidencio con el área foliar, enraizamiento y externamente demostrando plántulas saludables en buen estado libre de enfermedades, (véase en la tabla 20).

Tabla 20

*Análisis cualitativo respecto a la fisiológica externa de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.**

Especies	Dosis de (AgNP_s)	Color de hojas	Brotos de		Estado de la planta
			Raíz	Hojas	
<i>Guzmania sp.</i>	25mg/L^{-1}	Verde-morado	R	E	Vigorosas-brillosas
	50mg/L^{-1}	Verde-morado	R	E	Vigorosas-brillosas
	75mg/L^{-1}	Verde-morado	R	E	Vigorosas-brillosas
	100mg/L^{-1}	Verde-morado	R	E	Vigorosas-brillosas
<i>Phalaenopsis sp.</i>	25mg/L^{-1}	Verde-rojizo	E	E	Vigorosas-brillosas
	50mg/L^{-1}	Verde-rojizo	E	E	Vigorosas-brillosas
	75mg/L^{-1}	Verde-rojizo	E	E	Vigorosas-brillosas
	100mg/L^{-1}	Verde-rojizo	E	M	Vigorosas-brillosas

Nota: R= (regular), M= (moderado), E= (excelente).

Las plántulas de la especie *Guzmania sp.*, en poco tiempo presentaron un coloración verde-rojizo en todas las dosis de nanopartículas de plata (AgNP_s), mejorando su apariencia fisiológica externa, con hojas libres de enfermedades, vigorosas y brillosas. Los brotes fueron más prominentes en las etapas de aclimatación *in vitro* y *ex vitro*, (véase en la figura 20).

Figura 32

Fisiología de las hojas de *Guzmania sp.*



Nota: En el libetal (a),(c) y (d), se observa que el ancho de la hoja no fue tan relevante mientras que en el largo de la hoja se visualizo un mejor crecimiento con las dosis de 25mg/L^{-1} , 75mg/L^{-1} y 100mg/L^{-1} de (*AgNPs*), en cambio en el literal (c), se evidenció un crecimiento en el ancho y largo de la hoja en la dosis 50mg/L^{-1} de (*AgNPs*).

Las hojas de la especie *Phalaenopsis sp.*, presentaron una coloración verde-morado con un vigorosidad y brillo. Sus hojas comúnmente nacen de la base de su tallo, específicamente en la parte superior como lo demuestra el literal d., sin embargo en la dosis de 100mg/L^{-1} aparecieron en la parte inferior por debajo de las hojas más grandes en la aclimatación *in vitro* y *ex vitro*. Respecto al largo x ancho de la hoja se obtuvo un crecimiento considerando que los explantes utilizados fueron muy pequeños.

Figura 33

Fisiología de las hojas de Phalaenopsis sp.



Nota: Literal (a) dosis de $25\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$, (b) dosis de $50\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$, (c) y (d) se observaron hojas nuevas en las dosis de 75mg/L^{-1} y $100\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$.

En el caso de las raíces de la especie *Phalaenopsis sp.*, presentaron color verde intenso y los nuevos brotes de raíces verde claro. En la siembra *in vitro* las orquídeas tenían raíces pero muy pequeñas, al adicionar las dosis de nanopartículas de plata (AgNPs) crecieron en largo, ancho y grosor en la aclimatación *in vitro* y *ex vitro*.

Figura 34

Fisiología de las raíces de Phalaenopsis sp.



Nota: Crecimiento del sistema radicular de las especie *Phalaenopsis sp.*, (a) dosis de $25\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$, (b) dosis $50\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$, (c) dosis $75\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$ y dosis $100\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$,

Respecto a las raices de *Guzmania sp.* el crecimiento fue miniritario en todas las dosis de nanoparticulas de plata (*AgNPs*).

Figura 35

Fisiología de la especie Guzmania sp.



Nota: Sistema radicular de la especie *Guzmania sp.* con una dosis de $75\text{mg/L}^{-1}(\text{AgNPs})$.

Capítulo V

Discusión

Caracterización morfológica de las (*AgNPs*)

Existen un sinnúmero de técnicas basadas en métodos químicos y físicos para la síntesis de nanopartículas metálicas que implica un elevado costo, toxicidad y su proceso de fabricación largo, entre otros, (Ying Loo & Woei Chieng, 2012). En los últimos años se han implementado alternativas ecológicas para la síntesis de nanopartículas denominado método verde a partir de microorganismos y plantas, según (Garcia Soqui M. A., 2016) considera que las plantas contienen un sin número de compuestos bioactivos: polifenoles, alcaloides, flavonoides y taninos que se destacan por sus propiedades antioxidantes y su capacidad reductora. En el presente trabajo se aplicó el método verde (*bottom up*) para la síntesis de nanopartículas de plata (*AgNPs*) a partir de las hojas de té verde. Según (Hasnain, Hasan Naqvi, & Lqbal, 2022) afirma que el té verde (*Camelias sinensis*) está compuesto por catequinas que en su estructura poseen grupos hidroxilos que actúan donando electrones de Ag^+ reduciéndose a Ag^0 . Para mejorar el rendimiento de las nanopartículas ($AgNP_s$) se aplicó la metodología propuesta por (Widatalla, Yassin, & Alrasheid, 2022) con pequeñas modificaciones ajustando el pH del extracto de té verde (*Camelias sinensis*) con hidróxido de sodio (NaOH), corroborado por (Gordon Falconi, Iannone, & Debut, 2021) que manifiesta que los polifenoles al cambiar su pH de ácido a alcalino genera una desestabilización formando el ion fenóxido adquiriendo la capacidad de donar electrones al precursor metálico ($AgNO_3$) obteniendo plata Ag^0 para mejorar la estabilización y evitar aglomerados, según (Fletes Hernandez , 2016), para una mejor síntesis biológica se debe considerar la naturaleza del extracto, el precursor metálico, la concentración, el pH, la temperatura, el tiempo que se relaciona con la velocidad de reducción de las nanopartículas y el rendimiento entre otros.

La formación de ($AgNP_s$) presentes en la solución coloidal (*véase en la figura 13*), se evidencio por el cambio de coloración, (amarillo-marrón oscuro) después de 30 minutos, como

lo menciona (Rajput, Paul, & Durve-Gupta, 2020) en su investigación, los iones de plata se reducen a nanopartículas de plata al estar en contacto con el agente reductor, De acuerdo a, lo que afirma (Fletes Hernandez , 2016) ocurre un cambio de coloración desde el amarillo, rojizo, marrón y café oscuro; que demuestra la reacción mencionada, además la cantidad del extracto acuoso (agente reductor) y el nitrato de plata (precursor metálico) va influir en la síntesis. Según (Espinosa Cavazos & Sáenz Galindo, 2021), las plantas actúan como agentes estabilizantes debido a su composición química mediante la participación de enzimas que son capaces de generar estabilización en la síntesis y potencializar sus propiedades.

Las propiedades ópticas de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$), son distintas al interaccionar con la luz. Por esta razón durante la síntesis se realizó un análisis preliminar utilizando la técnica de espectrofotometría UV-vis. Lo que se justifica con lo que dice (Gordon Falconi, Iannone, & Debut, 2021), las nanopartículas de plata tiene la capacidad de absorber cierta longitud de onda en el rango de 380 nm a 480 nm rango dentro del cual se obtuvo un rango de detección de la muestra en 411nm, (véase en la figura 14), además, se evidenció estabilidad en las nanopartículas de plata ($AgNP_s$), ya que no se presentó la formación de más picos por lo tanto se considera un proceso de síntesis eficiente y sin aglomerados. Según (Esquivel-Figueroa, 2021) describe que el tipo de especie vegetal va a influir en la morfología y el tamaño de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$).

En el análisis cristalográfico de difracción de rayos X confirmó la presencia de plata (Ag^0) en el pico de difracción 38° en el plano 111, según (Gordon Falconi, Iannone, & Debut, 2021) los cuales son establecidos por la base de datos de estructuras cristalinas (ICSD). La determinación del tamaño de las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) se realizó mediante la ecuación de Scherrer obteniendo un tamaño de 8.44nm similar a lo que (Esquivel-Figueroa, 2021), obtuvo del té verde (*Camelias sinensis*) con un tamaño entre 5-11nm cuya forma es esférica. Con respecto al análisis de composición química elemental (EDS), (véase en la figura 16) se logró determinar la presencia de plata en las ($AgNP_s$) siendo los más prevalentes con un pico máximo en 2.983 keV.

Como se observa en el mapeo elemental en el literal (a), se logra visualizar que la plata (Ag) es el Z mayor (gris brillante) con un número atómico de 47 y el carbono, Z menor (negro) con un número atómico de 6 que está presente por el recubrimiento de la cinta de carbono que se usa para la preparación de la muestra por lo tanto se sustenta con la investigación de (Fletes Hernandez , 2016). El mapeo elemental permitió distinguir la plata (rojo) del oxígeno (verde) cuya presencia en la muestra se justifica debido a que la síntesis se realizó en medio acuoso y que la muestra que al estar en el ambiente tiende a oxidarse (Pereyra & Paterlini, 2018). Con respecto al *SEM* no logro determinar el tamaño de la nanopartículas pero se logró visualizar la presencia de estas.

Mediante microscopia electrónica de trasmisión (*TEM*) se logró determinar el tamaño de las nanopartículas de plata (*AgNP_S*) a partir del extracto de las hojas de té verde (*Camelias sinensis*). De acuerdo con (Alvarracin Baculima & Cuenca León, 2021), el tamaño de las nanopartículas (*AgNP_S*), debes ser menores a 10 nm para mejorar sus propiedades antimicrobianas de tal forma que en este trabajo se obtuvo un tamaño de diámetro promedio de $44,35 \text{ nm} \pm 4,032 \text{ nm}$, (véase en la figura 18) considerando que el tamaño no era homogéneo y estaban dispersas. Adicionalmente se determinó los tamaños más relevantes obtenidos en el histograma a una escala de 5 a 10 nm obteniendo un diámetro de 9.38 nm que coincide con el método de caracterización de difracción de rayos X.

Determinación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (AgNP_S)

Los explantes de las especie de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, no presentaron contaminación microbiana en ninguna de las dosis de 25 mg/L^{-1} , 50 mg/L^{-1} , 75 mg/L^{-1} y 100 mg/L^{-1} . Según (Alvarracin Baculima & Cuenca León, 2021) considera que el efecto antimicrobiano de las (*AgNP_S*) esta relacionado con el tamaño <50 nm haciéndolas más reactivas mejorando sus características y propiedades. Las (*AgNP_S*) sintetizadas a partir del té verde (*Camelias sinensis*) presentaron un tamaño acorde a la literatura. Con respecto a su efecto

antimicrobiano, (Mongue , 2009), afirma que las ($AgNP_s$) liberan iones de (Ag) que son reactivos y tóxicos para los microorganismos. Por otra parte (Bélteky & Rónavári , 2021) describe que las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) menores a <20 nm se adhieren con mayor facilidad en la pared celular y la membrana citoplasmática de la bacteria generando permeabilidad celular destruyendo por completo la envoltura bacteriana y provocando una lisis celular. (Bruna & Jara , 2012), sustenta que los iones de plata son capaces de afectar la respiración bacteriana inactivando reacciones enzimáticas y destruyendo el ADN alterando su estructura. Comúnmente los explantes de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, en su mayoría son atacados por hongos, el más prominente en ambas especies fue *penicillium* recubriéndolos por un micelio blanco que al liberar una gran cantidad de esporas presenta una coloración verde, (véase en la figura 19), por lo que se puede corroborar con (Vazquez Muñoz , 2017) que las ($AgNP_s$) tiene un efecto antifúngico con las levaduras y hongos filamentosos, sin embargo el más estudiado es el género *candida*, con respecto a su mecanismo de acción antifúngico las ($AgNP_s$) perturban las estructura celular afectando la morfología y dañando la pared celular compuesta por quitina, además de inactivar procesos enzimáticos que les permite segregar sustancias tóxicas.

Efecto de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) con respecto al desarrollo fenotípico

El estudio demostró efectos positivos de las ($AgNP_s$) mejorando el crecimiento en el largo de la hoja y un mayor número de hojas en la especie *Guzmania sp.*, mientras que en la especie *Phalaenopsis sp.*, se obtuvo un mayor crecimiento en el sistema radicular, lo cual es sustentado por (Salachna , 2019) afirmando que las nanopartículas de plata no solo inhiben el crecimiento microbiano sino que también actúan en calidad de bioestimuladores para mejorar la propagación y el crecimiento de plantas. Por otra parte las raíces de la orquídea *Phalaenopsis sp.*, presentaron un rápido crecimiento en el largo, ancho y grosor de la raíz al recibir las dosis de ($AgNP_s$), (véase en la figura 22) por lo tanto se corrobora con (Khan & Zahoor , 2023) que las ($AgNP_s$) influyen el crecimiento radicular y que además estimulan a las raíces mejorando su capacidad de

absorción, sin embargo (Guzmán Báez & Gómez Merino, 2021) manifiesta que las (*AgNP_s*) también pueden estimular la síntesis de giberelinas y fitohormonas que participan en la germinación de semillas, enraizamiento, elongación celular y brotes dependiendo de su concentración. Las especies *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, al aplicarse las dosis de nanopartículas de plata (*AgNP_s*) se logró evidenciar que las hojas presentaron un aspecto sano, libre de enfermedades, vigorosidad y un color verde intenso mejorando la fisiología de la plata como afirma (Guzmán Báez & Gómez Merino, 2021) que las nanopartículas de plata (*AgNP_s*) pueden aumentar las concentraciones de los macronutrientes principalmente del nitrógeno para evitar el amarillamiento en las hojas, el fósforo para estimular el sistema radicular, el potasio que evita la marchitez y clorofila. Según (Rajput & Samrat, 2020) afirma que las dosis de 25mg/L^{-1} y 50mg/L^{-1} son ideales para obtención de brotes y raíces que se corrobora con lo obtenido en la especie *Phalaenopsis sp.*

Por otra parte (Khan & Zahoor, 2023) recomienda establecer dosis de (*AgNP_s*) para evitar impactos negativos considerando el tipo de especie vegetal, el tamaño de la partícula y la concentración que puede a ver influido en el desarrollo radicular de la especie *Guzmania sp.*, requiriendo una menor concentración. Es evidente que los explantes de las especies *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, se desarrollaron en un medio artificial en condiciones controladas, sin embargo al adicionar (*AgNP_s*) se evidenció que en la aclimatación *ex vitro*, los explantes no generaron estrés al estar en un nuevo ambiente sin condiciones controladas, por lo tanto (Nawaz, Maqsood, & Batool, 2023) sostiene que las (*AgNP_s*) provocan que las plantas sean tolerantes a las sequías y al estrés dado por un factor biótico o abiótico. Según (Yan & Chen, 2019) el mecanismo que realizan las (*AgNP_s*) para ingresar a la planta es por la raíz rompiendo la pared celular y la membrana plasmática de la capa epidérmica, las nanopartículas de plata que presentan un tamaño menor a $>50\text{nm}$ pueden ingresar a los tejidos vasculares, ser

absorbidas y transportadas a las hojas u otros órganos, sin embargo las nanopartículas que tienen un gran tamaño no ingresan a las células vegetales siendo eliminadas.

Capítulo VI

Conclusiones.

Se determinó que la síntesis de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) usando té verde (*Camelia sinensis sp.*), fue exitosa debido a que su tamaño fue menor >50 nm mejorando sus propiedades antimicrobianas.

Se comprobó que las nanopartículas de plata ($AgNP_s$) tuvieron un efecto antimicrobiano en los explantes de *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, en condiciones *in vitro* con un diámetro de $44,35 \text{ nm} \pm 4,032 \text{ nm}$ que se logró evidenciar a partir de los métodos de caracterización.

Respecto al desarrollo fenotípico de las especies *Guzmania sp.*, y *Phalaenopsis sp.*, que concierne a los datos cuantitativos, se obtuvo diferencia significativa en el factor A: el tipo de especies, factor B: dosis de ($AgNP_s$), en el factor C: el desarrollo fenotípico y la interacción AB, concluyendo que la especie *Guzmania sp.*, presento un mayor crecimiento respecto al largo de la hoja con una dosis de 100 mg/L^{-1} en la aclimatación *ex vitro*. En cuanto al número de raíces se obtuvo una mayor proliferación de brotes en la especie *Phalaenopsis sp.*, mayoritariamente en las concentraciones de 25 mg/L^{-1} y 50 mg/L^{-1} y finalmente el mayor número de hojas se obtuvo en la especie *Guzmania sp.*, en la dosis 50 mg/L^{-1} .

En el análisis cualitativo se evidenció que las dosis de nanopartícula de plata ($AgNP_s$) mejoraron la fisiología externa de ambas especies: en las hojas, brotes, raíces y vigorosidad.

Recomendaciones.

Recomiendo que la síntesis verde es un método ecológico para la obtención de nanopartículas de plata ($AgNP_s$) siendo muy económico, viable y amigable con el ambiente., además considero que el té verde (*Camelia sinensis sp.*), es un gran agente reductor muy eficiente por sus propiedades antioxidantes y un sinnúmero de compuestos polifenólicos que posee.

Respecto a la actividad antimicrobiana recomiendo aplicar dosis de (*AgNPs*) en otras especies que sean más susceptibles a la contaminación antibacteriana por ejemplo la mora de castilla (*Rubus glaucus*) y la frutilla (*Fragaria sp.*), además evaluar su desarrollo fenotípico.

Bibliografía.

- Abasi, F., & Iqbal Raja , N. (2022, May 24). Biogenic Silver Nanoparticles as a Stress Alleviator in Plants: A Mechanistic Overview. doi:<https://doi.org/10.3390%2Fmolecules27113378>
- Bélteky, P., & Rónavári , A. (2021, april 23). Are Smaller Nanoparticles Always Better? Understanding the Biological Effect of Size-Dependent Silver Nanoparticle Aggregation Under Biorelevant Conditions. *PudMed*. doi:<https://doi.org/10.2147%2FIJN.S304138>
- Bruna, T., & Jara , P. (2012, Agosto 2). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *PudMed*. doi:<https://doi.org/10.3390%2Fijms22137202>
- Espinosa Cavazos, K. G., & Sáenz Galindo, A. (2021, Enero 26). Bio-síntesis de nanopartículas de Plata. Retrieved from <http://portal.amelica.org/ameli/journal/157/157776003/html/>
- Esquivel-Figueroa, R. (2021). Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie *Trichoderma*. *Cubana de química*, 33(2). Retrieved from <https://www.redalyc.org/journal/4435/443568186002/html/>
- Khan, S., & Zahoor , M. (2023, June 9). The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications. *ScienceDirect*(9). doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16928>
- Mongue , M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Real Sociedad Española de Química*. Retrieved from <https://analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/download/1614/2183>
- Nawaz, S., Maqsood, I., & Batool, F. (2023, March 10). <https://www.intechopen.com/chapters/86099>. doi:10.5772/intechopen.110201
- Rajput, D., & Samrat, P. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Waste Tea Leaves. 9. Retrieved 08 24, 2023, from

https://www.researchgate.net/publication/343049648_Green_Synthesis_of_Silver_Nano_particles_Using_Waste_Tea_Leaves

Rajput, D., Paul, S., & Durve-Gupta, A. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Waste Tea Leaves. *Advanced Nano Researc*, 3(1), 3. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/343049648_Green_Synthesis_of_Silver_Nano_particles_Using_Waste_Tea_Leaves

Sadak, M. (2019, March 01). Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *SpringerOpen*. Retrieved from <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0077-y>

Vazquez Muñoz , R. (2017). Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de plata y microorganismos patógenos. *CICESE*, 21.

Ying Loo, Y., & Woei Chieng, B. (2012). Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia Sinensis*. *Dovepress*, 3.

Alarcón, J., & Zúñiga, C. (2022, October 31). *Análisis de la síntesis química y verde de nanopartículas de óxidos metálicos: ventajas y desventajas*. Retrieved June 4, 2023, from Repositorio INAOE: <https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1009/2408/1/TESIS%20DE%20MAESTR%C3%8DA%20CESAR%20DE%20JESUS%20ALARCON.pdf>

Alvarracin Baculima, M., & Cuenca León, K. (2021). Nanoparticulas antimicrobianas en Odontología: Estado del arte. doi:<http://doi.org/10.5281/zenodo.5791388>

American Orchid Society. (2022). *Phalaenopsis, The Genus - Beginner's Handbook, XXIII*. Retrieved Junio 26, 2023, from <https://www.aos.org/orchids/additional-resources/phalaenopsis-the-genus.aspx>

- Avalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2015, September 16). (PDF) *Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud y el medio ambiente*. Retrieved July 11, 2023, from ResearchGate:
https://www.researchgate.net/publication/280246022_Nanoparticulas_de_plata_Aplicaciones_y_riesgos_toxicos_para_la_salud_y_el_medio_ambiente
- Balke, M., & Gómez Zurita, J. (2008, February 29). *Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the Neotropical forest canopy*. Retrieved June 8, 2023, from PNAS:
<https://doi.org/10.1073/pnas.0710368105>
- Bayda, S., Adeel, M., & Tuccinardi, T. (2019, December 27). *The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine*. Retrieved June 7, 2023, from MDPI: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/112>
- Berlanga Mora, I. (2013). *Síntesis y caracterización de nanomateriales 0D, 1D y 2D*. Retrieved Julio 2, 2023, from
https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/660464/berlanga_mora_isadora.pdf
- Betancur, J. (2003, Marzo). *UNA ESPECIE NUEVA DE GUZMANIA (BROMELIACEAE) DE LA AMAZONIA COLOMBIANA Y NOTAS SOBRE LAS ESPECIES RELACIONADAS*. Retrieved Julio 1, 2023, from https://www.accefyn.com/revista/Vol_27/102/15-24.pdf
- Brighigna, L., & Papini, A. (2002, June). *The use of tropical bromeliads (Tillandsia spp.) for monitoring atmospheric pollution in the town of Florence, Italy*. Retrieved June 6, 2023, from SciELO: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442002000200017
- Bruna, T., & Jara, P. (2021, July 4). *Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications - PMC*. Retrieved June 3, 2023, from NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8268496/>

- Bueno, T. F. (2017, Septiembre). *Estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata*. Retrieved Julio 9, 2023, from <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/66375/Fern%C3%A1ndez%20Bueno,%20Teresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chávez Jácome, D. I. (2021, March 24). *Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante interacción de la radiación ultravioleta y visible* Chávez Jácome, Dav. Retrieved May 30, 2023, from Repositorio ESPE: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24217/1/T-ESPE-044453.pdf>
- Colorado State University Publishing. (2019). *Plant Tissue Culture Media Preparation – Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules*. Retrieved July 12, 2023, from <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/media/>
- D'Auria, J. C., & Cohen, S. P. (2022, September 23). *United States tea: A synopsis of ongoing tea research and solutions to United States tea production issues*. Retrieved June 9, 2023, from Frontiers: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.934651/full>
- Enoki, S., Takahara, Y., & Burns, P. (2022, April 28). *Applications of Biotechnological Approaches in the Product and Breeding of *Phalaenopsis* Orchids*. Retrieved June 27, 2023, from IntechOpen: <https://www.intechopen.com/chapters/81559>
- Escobar Falconi, V. E. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM)*. Retrieved July 1, 2023, from Repositorio PUCE: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9933/TESIS%20-%20VANESSA%20ESCOBAR%20FALCON%c3%8d.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Espinosa Leal, C. A., & Puente Garza, C. A. (2018, May 7). *In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds*. Retrieved June 7, 2023, from NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7088179/>
- Esquivel, C. (2021, February 10). *Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie Trichoderma*. Retrieved June 4, 2023, from Redalyc:
<https://www.redalyc.org/journal/4435/443568186002/html/>
- Falconí, E., & Estefanía, V. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM)*. Retrieved August 14, 2023, from Repositorio PUCE: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9933>
- Farías Mancilla, B. B. (2016). *Sistema semiconductor a base de nanopartículas de plata/poli(N-vinilcarbazol)/polianilina, para aplicación en fotoánodos de c*. Retrieved Julio 2, 2023, from Repositorio CIMAV:
<https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/2334/1/Tesis%20Barbara%20Farias.pdf>
- Fay, M. F., & Chase, M. W. (2009, Agust). *Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century*. Retrieved June 7, 2023, from NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720656/>
- Fletes Hernandez , N. A. (2016). *Síntesis verde de nanopartículas de plata usando extracto de las plantas Valeriana officinalis y Passiflora incarnata y su evaluación como agentes antibacteriales*. Retrieved from
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/5260
- García Soqui , M. A. (2016). *Síntesis de nanopartículas metálicas con extracto de te verde: caracterización física y biológica*. 20.

García Soqui, R. J. (2016, June). *Síntesis de nanopartículas metálicas con extracto de te verde: caracterización física y biológica*. Retrieved June 5, 2023, from

<http://148.225.114.121/bitstream/unison/1990/1/garciasoquimarioalbertol.pdf>

Garzón Gutiérrez, L. N., & Ramírez Moreno, J. S. (2018). *CULTIVO DE TEJIDO VEGETAL*.

Retrieved July 12, 2023, from Escuela de Biología:

[http://bio.uis.edu.co/eisi/images/Noticias/archivos/20201115104940-](http://bio.uis.edu.co/eisi/images/Noticias/archivos/20201115104940-anexo_d_cartilla_cultivo_1.pdf)

[anexo_d_cartilla_cultivo_1.pdf](http://bio.uis.edu.co/eisi/images/Noticias/archivos/20201115104940-anexo_d_cartilla_cultivo_1.pdf)

Gaviria, A., & Mejía, C. (2016). *Reconocimiento de las características morfológicas de la*

Guzmania Bromeliaceae y la Orquídea Dendrophylax lindenii durante. Retrieved June

27, 2023, from Repositorio Institucional de la Universidad Pontificia Bolivariana:

[https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3547/Art%c3%adculo%20-](https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3547/Art%c3%adculo%20-%20Reconocimiento%20de%20las%20caracter%c3%adsticas%20morfol%c3%b3gicas%20de%20la%20Guzmania%20Bromeliaceae.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

[%20Reconocimiento%20de%20las%20caracter%c3%adsticas%20morfol%c3%b3gicas](https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3547/Art%c3%adculo%20-%20Reconocimiento%20de%20las%20caracter%c3%adsticas%20morfol%c3%b3gicas%20de%20la%20Guzmania%20Bromeliaceae.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

[%20de%20la%20Guzmania%20Bromeliaceae.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3547/Art%c3%adculo%20-%20Reconocimiento%20de%20las%20caracter%c3%adsticas%20morfol%c3%b3gicas%20de%20la%20Guzmania%20Bromeliaceae.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Gómez Villarraga, F. (2016). *NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SUS APLICACIONES*.

Retrieved Julio 1, 2023, from

https://innovacionyciencia.com/documentos/nanoparticulas_metalicas_y_sus_aplicaciones.pdf

González Pedroza, M. G. (2020). BIOSÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIPROLIFERATIVA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA, OBTENIDAS A BASE DE EXTRACTOS DE ANNONA MURICATA, SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA. *SEMANTIC SCHOLAR*, 54. Retrieved from

<http://hdl.handle.net/20.500.11799/105566>

- Gordon Falconi, C. (2020). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de plata obtenidas mediante síntesis verde*. Retrieved August 17, 2023, from Repositorio Institucional CONICET Digital: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/173472>
- Gordon Falconi, C., Iannone, M., & Debut, A. (2021). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de plata obtenidas mediante síntesis verde. III Jornadas de Jóvenes Bionanocientíficos*. Retrieved from <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/173472>
- Guerrero Dimas, L. A., & Castañeda Facio, A. O. (2022, March 24). *Nanopartículas metálicas, síntesis y aplicaciones*. Retrieved July 11, 2023, from CienciAcierta: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/CC71/nanoparticulasmetalicas.pdf>
- Gutiérrez Coronado, J. L. (2018, January). *"NANO" WORLD IN ECUADOR, HOW BIG IS IT?* Retrieved June 3, 2023, from Revistas Unal: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/momento/article/view/71651/65686>
- Guzmán Báez, G., & Gómez Merino, F. (2021, November 17). Silver Nanoparticles Increase Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Concentrations in Leaves and Stimulate Root Length and Number of Roots in Tomato Seedlings in a Hormetic Manner. doi:<https://doi.org/10.1177/15593258211044576>
- Haberlandt, G. (2020). *CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES*. Retrieved July 12, 2023, from CORE: <https://core.ac.uk/download/pdf/288339333.pdf>
- Harleen, K. N., & Salwan, R. (2012, May 23). *Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of Guadua angustifolia Kunth*. Retrieved June 3, 2023, from NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371444/>

- Hasnain, A., & Hasan Naqvi, S. A. (2022, October 13). *Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches*. Retrieved June 7, 2023, from Frontiers:
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>
- Hasnain, A., Hasan Naqvi, S. A., & Lqbal, S. (2022). Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13, 2.
doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>
- Hasri, H., & Dini, I. (2019, August). *Biosíntesis de Nanopartículas de Plata a partir de Extracto de Hoja de Té Verde (Camellia sinensis)*. Retrieved from Scientific.net:
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.967.161>
- Hernández, M. P. (2016, December 20). *Biofabricación de nanopartículas de plata con extractos de cladodios de nopal*. Retrieved July 9, 2023, from Repositorio CIQA:
<https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/64/1/Tesis%20de%20maestria%20Marco%20Polo%20Hernandez.pdf>
- Hsiao, Y.-Y., Pan, Z.-J., & Hsu, C.-C. (2011, July 26). Research on Orchid Biology and Biotechnology. 52(9).
- Hu, W., & Lin, S. (2022, July 25). *Digital Evaluation of Aroma Intensity and Odor Characteristics of Tea with Different Types—Based on OAV-Splitting Method*. Retrieved June 9, 2023, from MDPI: <https://doi.org/10.3390/foods11152204>
- Ivanova, N., & Andonova, V. (2021, December 8). *Synthesis of silver nanoparticles with green tea-extracted reductants: a preliminary study for optimization of the preparation technique | Ivanova | Scripta Scientifica Pharmaceutica*. Retrieved July 11, 2023, from

Scientific Online Resource System: <https://journals.mu-varna.bg/index.php/ssp/article/view/8453>

- Kshitij, K. (2012, Dicember 30). *Morphophysiologicals Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in -Ex Vitro Conditions- A Reviews*. Retrieved June 3, 2023, from Morphophysiologicals Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in - Ex Vitro Conditions- A Reviews: https://journals.iau.ir/article_513618.html
- Ladino, G., & Ospina Bautista, F. (2019, May 29). *Ecosystem services provided by bromeliad plants: A systematic review*. Retrieved June 8, 2023, from NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6662323/>
- Loo, Y. Y., & Chieng, B. W. (2012, August 2). *Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from Camellia Sinensis*. Retrieved June 6, 2023, from NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418103/>
- Manzanares, J. (2023). *Libro rojo Plantas endémicas del Ecuador " Familia Bromeliaceae"*. Retrieved June 8, 2023, from Bioweb: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500071>
- Mohammad, M. A., & Yadollahi, A. (2014, December). Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock. *ScienceDirect*, 12(2), 1. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X1400033X>
- Molina Cabrera, J. C. (2012). "EVALUACIÓN DE CINCO MEDIOS DE CULTIVO (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) Y TRES DOSIS DE AUXINA Y CITOQUININAS. Retrieved July 12, 2023, from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/387/1/TESIS.pdf>

Musial, C., & Jankowska, A. K. (2020, March 4). *Beneficial Properties of Green Tea Catechins - PMC*. Retrieved July 11, 2023, from NCBI:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7084675/>

Páez Aguinaga, T. (2021, Septiembre 1). *Nanotecnología en el Mundo: Marco Regulatorio*.

Retrieved Junio 1, 2023, from Repositorio de la Universidad Internacional SEK Ecuador:

<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4603/1/P%C3%A1ez%20Aguinaga%20Tania%20Judith.pdf>

Pereira Zaldívar, N. A. (2022). *EVALUACIÓN DEL TRANSPORTE HÍDRICO FOLI*. Retrieved Julio 1, 2023, from Repositorio CICY:

https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/2082/1/PCB_M_Tesis_2022_Narcy_Pereira_Zaldivar.pdf

Pereyra, J., & Paterlini, P. (2018, Octubre 19). *BIOSINTEIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR ACTINOBACTERIAS METALO-RESISTENTES*. Retrieved from https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitaes/13135/17-cienciatecnologia-e-innovacion-pereyra-julian-unt.pdf

Permadi, N., & Nurzaman, M. (2023, April 1). *Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in Musa spp. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives*. Retrieved June 3, 2023, from MDPI: <https://www.mdpi.com/2311-7524/9/4/453>

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019, April 15). *Plant tissue culture media and practices: an overview*. Retrieved 7 12, 2023, from <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-019-09983-5>

Pilaquinga, F., Pazmiño, K., & Robalino, A. (2019, June 06). *SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA USANDO EL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS*

DE AJO (Allium sativum). Retrieved June 4, 2023, from Portal AmeliCA:

<http://portal.amelica.org/ameli/journal/157/157776003/html/>

Portillo Alejo, D. (2015). *POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA INMOVILIZADAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ULTRASONIDO RECUBIERTAS EN CORCHO*

GRANULAR COMO AGEN. Retrieved Julio 1, 2023, from CORE:

<https://core.ac.uk/download/pdf/41794235.pdf>

Quintana San José, M. J., & Zugasti Macazaga, M. A. (2015, Abril). *NANOMATERIALES*.

Retrieved Junio 1, 2023, from

<https://www.insst.es/documents/94886/96076/sst+nanomateriales/bd21b71f-d5ec-4ee8-8129-a4fa58480968>

Rajput, D., & Paul, S. (2020, July 18). *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Waste Tea Leaves*. Retrieved July 11, 2023, from ResearchGate:

https://www.researchgate.net/publication/343049648_Green_Synthesis_of_Silver_Nanoparticles_Using_Waste_Tea_Leaves

Reyes Rodríguez, P. Y. (2017, August 7). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE*

NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y ÓXIDO DE COBRE Y SU I. Retrieved August 6, 2023, from Repositorio CIQA:

<https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/166/1/Pamela%20Yajaira%20Reyes%20Rodriguez%20maestria.pdf>

Roca, w. M., & Mroginski, L. A. (1991, Mayo). *Cultivos de tejidos en la agricultura*. Retrieved July 12, 2023, from [http://ciat-](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)

[library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)

- Salachna , P. (2019, September 29). Stimulatory Effect of Silver Nanoparticles on the Growth and Flowering of Potted Oriental Lilies. *MDPI*.
doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy9100610>
- Sánchez Macías, A. E., & Rodríguez Gutiérrez, K. S. (2018, Julio 24). *Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador | Sánchez Macías*. Retrieved Junio 7, 2023, from Revista ECOVIDA:
<https://revistaecovida.upr.edu.cu/index.php/ecovida/article/view/127>
- Singh, S. P., & Dubey, V. (2017, July). *Silver nanoparticles: Biomedical applications, toxicity, and safety issues*. Retrieved July 11, 2023, from ResearchGate:
https://www.researchgate.net/publication/330875019_Silver_nanoparticles_Biomedical_applications_toxicity_and_safety_issues
- Teixeira da Silva, J. A., & Hossain, M. M. (2017, May). *Acclimatization of in Vitro-derived Dendrobium*. Retrieved June 3, 2023, from ScienceDirect:
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>
- Villamor Sancho, E. J. (2021, January 11). *Impacto medioambiental del uso de nanopartículas*. Retrieved July 1, 2023, from idUS:
<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103533/VILLAMOR%20SANCHO%20EDUARDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Widatalla, H. A., Yassin, L. F., & Alrasheid, A. A. (2022, January 18). *Green synthesis of silver nanoparticles using green tea leaf extract, characterization and evaluation of antimicrobial activity*. Retrieved May 28, 2023, from Croyal society of chemistry:
<https://doi.org/10.1039/D1NA00509J>

- Wong, M., & Sirisena, S. (2022, April 2). *Phytochemical profile of differently processed tea: A review*. Retrieved 06 9, 2023, from <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.16137>
- Yan, A., & Chen, Z. (2019). Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism. *PudMed*.
doi:<https://doi.org/10.3390%2Fijms20051003>
- Yin, I. X., & Zhang, J. (2020, April 17). *The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry*. Retrieved June 6, 2023, from NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7174845/>
- Ying Loo, Y., & Buong Woei, C. (2012, August 2). *Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from Camel | IJN*. Retrieved August 17, 2023, from Dove Medical Press:
<https://www.dovepress.com/synthesis-of-silver-nanoparticles-by-using-tea-leaf-extract-from-camel-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>
- Zanella, R. (2021, Agosto 30). *Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño*. Retrieved Junio 1, 2023, from SciELO México:
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-56912012000100069&script=sci_abstract&tlng=es
- Zhang, D., Ma, X. L., & Gu, Y. (2020, October 29). *Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer*. Retrieved July 9, 2023, from NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7658653/>