



Revista ION

ISSN: 0120-100X

ISSN: 2145-8480

Universidad Industrial de Santander

Cuervo-Osorio, Giovanni Alberto; Escobar-Jaramillo, Mateo; Ossa-Orozco, Claudia Patricia  
Diseño factorial 2k para la optimización de la síntesis de  
nanopartículas de plata para su aplicación en biomateriales  
Revista ION, vol. 33, núm. 1, 2020, Enero-Junio, pp. 17-32  
Universidad Industrial de Santander

DOI: 10.18273/revion.v33n1-2020002

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=342065400002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UDEM  redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc  
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso  
abierto

# Diseño factorial $2^k$ para la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata para su aplicación en biomateriales

Giovanni Alberto Cuervo-Osorio\*; Mateo Escobar-Jaramillo; Claudia Patricia Ossa-Orozco

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Biomateriales, Programa de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia), Colombia

\*[giovanni.cuervo@udea.edu.co](mailto:giovanni.cuervo@udea.edu.co)

*Fecha recepción: noviembre 7 de 2019*

*Fecha aceptación: enero 24 de 2020*

## Resumen

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son una alternativa frente al uso de antibióticos, debido a sus propiedades antimicrobianas y bactericidas. Dichas nanopartículas deben tener una geometría y un tamaño adecuado para que estas propiedades sean mejoradas. Para observar qué factores son influyentes en la geometría y el tamaño, se realizó un diseño factorial  $2^4$  variando los siguientes factores: temperatura de síntesis, concentración de nitrato de plata (agente precursor), porcentaje de citrato trisódico (agente reductor) y polivinilalcohol (PVA) (agente dispersante). Las nanopartículas obtenidas se evaluaron por UV-Vis, TEM y DLS. A partir de los resultados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el *software* estadístico Rstudio, y se encontró el valor de las condiciones de síntesis que permitían obtener un diámetro de 20 nm en STATGRAPHIC centurión XVII. Como resultado se obtuvo un tamaño de AgNPs entre los 6 y los 100 nm, en donde se evidenció que el porcentaje de PVA no es influyente en la síntesis, en tanto que los otros factores, como la temperatura, el porcentaje de citrato trisódico, la concentración de nitrato de plata y la interacción entre ellos, influyen en el tamaño de partícula final. Para la optimización de las AgNPs, se eligió un tamaño de 20 nm para el cual se reporta una mayor capacidad antimicrobiana. Se concluye que, para lograr la forma y el tamaño adecuado, se deben cumplir las siguientes condiciones: temperatura de 90 °C, concentración de nitrato de plata a 0,13 M y concentración de citrato trisódico al 10 %.

**Palabras clave:** Nanopartículas de Plata; Biomaterial; Antimicrobiano; Diseño Factorial; Optimización.

# 2<sup>k</sup> factorial design to optimize the synthesis of silver nanoparticles for application in biomaterials

## Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) are an alternative to the use of antibiotics due to their antimicrobial and bactericidal properties. To produce this required functionality, they must have adequate geometry and size. To observe which factors influence these properties, a factorial design 2<sup>4</sup> was performed varying the following production conditions: synthesis temperature, concentration of silver nitrate (precursor agent), percentage of trisodium citrate (reducing agent) and polyvinyl alcohol (PVA) (dispersing agent). The obtained nanoparticles were evaluated using UV-Vis, TEM and DLS. From the results, an analysis of variance (ANOVA) was performed using RStudio. Then, STATGRAPHIC centurion XVII was used to find the synthesis parameter values that allowed to produce nanoparticles with 20 nm diameter. As a result, AgNPs with sizes between 6 and 100 nm were obtained. The results demonstrated that the percentage of PVA does not influence the synthesis, while all other factors such as temperature, the percentage of trisodium citrate, the concentration of silver nitrate and the interaction between them, influence the final particle size. For the optimization of AgNPs production, a size of 20 nm was chosen since a greater antimicrobial capacity is reported using this diameter. It was possible to conclude that to achieve the appropriate shape and size, the following conditions must be met: temperature of 90 °C, concentration of silver nitrate at 0.13 M and a concentration of trisodium citrate of 10 %.

**Keywords:** *Silver Nanoparticles; Biomaterial; Antimicrobial; Factorial Design; Optimization.*

# Projeto fatorial 2<sup>k</sup> para a otimização da síntese de nanopartículas de prata com aplicação em biomateriais

## Resumo

As nanopartículas de prata (AgNPs) são uma alternativa para o uso dos antibióticos, devido a suas propriedades antimicrobianas e bactericidas; ditas nanopartículas, devem ter uma geometria e um tamanho adequado para que as propriedades sejam melhoradas. Para observar quais fatores influenciam na geometria e no tamanho, foi realizado um projeto fatorial 2<sup>4</sup> variando os seguintes fatores: temperatura de síntese, concentração de nitrato de prata (agente precursor), porcentagem de citrato trissódico (agente redutor) e álcool polivinílico (PVA) (agente dispersante). As nanopartículas obtidas foram avaliadas por UV-Vis, TEM e DLS. A partir dos resultados, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada no software estatístico Rstudio e foi otimizado no centurião STATGRAPHIC XVII. Como resultado, foi obtido um tamanho de AgNPs entre 6 e 100 nm, onde foi demonstrado que a porcentagem de PVA não influencia na síntese, enquanto outros fatores como temperatura, porcentagem de citrato trissódico, concentração nitrato de prata e a interação entre eles, influenciam o tamanho final das partículas. Para a otimização das AgNPs, foi escolhido um tamanho de 20 nm para o qual é relatada uma maior capacidade antimicrobiana. Conclui-se que, para obter a forma e o tamanho adequado, devem ser cumpridas as seguintes condições: temperatura de 90 °C, concentração de nitrato de prata 0,13 M e concentração de citrato de trissódio 10 %.

**Palavras-chave:** *Nanopartículas de Prata; Biomaterial; Antimicrobiano; Projeto Fatorial; Otimização.*

## Introducción

La nanotecnología ha llevado al desarrollo de los nanomateriales, entre ellos las nanopartículas inorgánicas, las cuales poseen un efecto microbicida, con capacidad de atacar virus, bacterias y hongos [1,2]. Entre las nanopartículas que han demostrado tener esta capacidad están las nanopartículas de plata (AgNPs), los óxidos de zinc, de cobre y de hierro. Los biomateriales con tamaño nanométrico poseen un alto potencial y son de gran interés para aplicaciones biomédicas [3]; aquellos que poseen potencial antimicrobiano son una alternativa frente a los antibióticos comunes, puesto que se ha evidenciado la alta resistencia que adquieren las bacterias ante estos agentes antimicrobianos [4]. La obtención de AgNPs se realiza por diferentes métodos, por ejemplo, las vías verdes o reducciones químicas [4,5]; con estos métodos se pretende obtener un tamaño y una geometría específica, puesto que sus propiedades antimicrobianas y bactericidas están ligadas con estas características [6].

Las nanopartículas de plata (AgNPs) presentan propiedades funcionales únicas, que conducen a aplicaciones variadas en el área de la medicina y en procedimientos de catálisis, sensores ópticos y bactericidas. Una de las características que hace más atractiva su aplicación es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación con los antibióticos, debido a que interactúan con la pared, las proteínas y el ADN bacteriano [7]. Debido a su naturaleza antimicrobiana, las AgNPs se han incorporado en diversas matrices, con el fin de extender su utilidad en biomateriales para el uso de implantes y aplicaciones biomédicas [8]. Por ejemplo, las sales de estas nanopartículas, ya son usadas comercialmente en cremas tópicas; también se implementan en el dopaje de prótesis de titanio, para evitar infecciones posteriores a la implantación [9]; su gran potencial se encuentra en afecciones asociadas con la piel y en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer [10,11]. Es así como se usan en apósitos, debido a que poseen una acción antimicrobiana de amplio espectro sobre los microorganismos que afectan a las heridas [12,13]. Las AgNPs también han sido usadas en la elaboración de vendajes para heridas, donde se evidenció que ayudaban a la proliferación de fibroblastos, lo cual ayuda en la deposición de colágeno en el sitio de la herida [14-17].

Por otra parte, los diseños factoriales han sido de gran ayuda a la hora de optimizar diferentes procesos, desde la recuperación de cromo en aguas residuales

hasta en el área médica donde, por ejemplo, se requiere mejorar las propiedades mecánicas en un implante vascular [18, 19]; lo anterior demuestra la importancia de la estadística en diversos los campos. En este trabajo el diseño factorial se empleó con el fin de observar como influyen las variables o los factores en la síntesis de AgNPs, y como sus interacciones tienen un efecto sinérgico para la optimización; este tipo de diseño utiliza pruebas como la prueba F, la t student, el ajuste del modelo, entre otras [20].

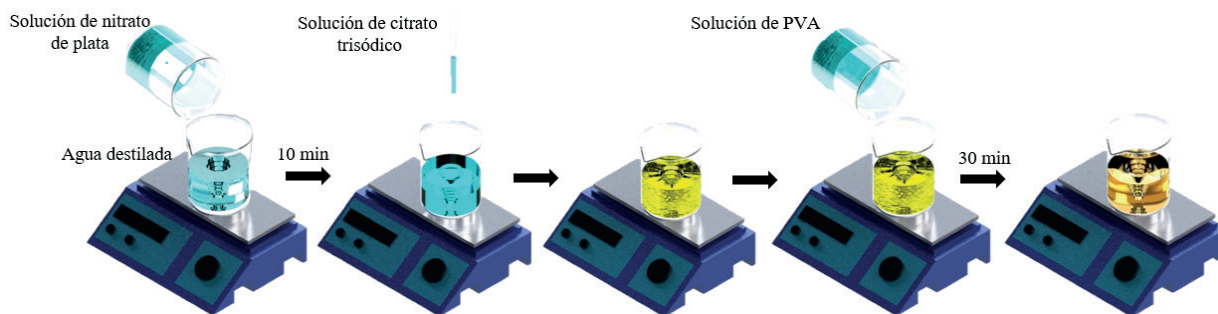
## Materiales y métodos

### Síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas mediante reducción química, realizando modificaciones al protocolo implementado por Gallo *et al.* [21]. Para esto, se variaron cuatro parámetros: temperatura de síntesis entre 80 °C y 100 °C; como agente precursor se utilizó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) marca PanReac 100 % puro entre 0,11 M y 0,2 M; como agente reductor, citrato trisódico dihidratado marca PanReac al 99 % de pureza, entre 1 % y 10 %; y como agente dispersante, polivinilalcohol PVA marca Sigma Aldrich al 99 % hidrolizado, cuyo porcentaje varió entre 1 %, 2 % y 10 %.

Para la síntesis, inicialmente, se llevó el agua destilada hasta la temperatura deseada mediante agitación constante. La temperatura fue controlada constantemente para evitar fluctuaciones. Cuando el agua alcanzó la temperatura, se le agregó la solución de nitrato de plata, y se continuó la agitación durante 10 min; al cabo de este tiempo, se goteó lentamente el agente reductor, citrato trisódico, manteniendo la agitación. Al finalizar el goteo, se esperó que la solución tomará un color amarillo para retirarla de la agitación, y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente.

El PVA se disolvió a 70 °C en cada una de las concentraciones indicadas anteriormente durante 2 h, y, finalmente, se lo dejó enfriar hasta que alcanzara la temperatura ambiente para mezclarlo, posteriormente, en una proporción 1:1 con las diferentes soluciones de nanopartículas de plata, en un proceso de 30 min con agitación constante. En la figura 1 se observa el procedimiento seguido. En la tabla 1 se presenta un resumen de los diferentes protocolos que fueron evaluados, indicando la nomenclatura para cada uno. Las muestras como PVA al 10 % fueron descartadas como se indicará en el próximo ítem, por lo cual no aparecen descritas en la tabla 1.



**Figura 1.** Diagrama de la síntesis de las nanopartículas de plata (fuente propia).

**Tabla 1.** Parámetros de síntesis implementados para cada muestra.

Muestra	Temperatura [°C]		Concentración de $\text{AgNO}_3$ [M]		Porcentaje de PVA [%]		Porcentaje de citrato trisódico dihidratado [%]	
	80	100	0,1	0,2	1	2	1	10
Ag 1		x		x		x		x
Ag 2		x		x		x	x	
Ag 3		x		x	x			x
Ag 4		x		x	x		x	
Ag 5		x	x			x		x
Ag 6		x	x			x	x	
Ag 7		x	x		x			x
Ag 8		x	x		x		x	
Ag 9	x			x		x		x
Ag 10	x			x		x	x	
Ag 11	x			x	x			x
Ag 12	x			x	x		x	
Ag 13	x		x			x		x
Ag 14	x		x			x	x	
Ag 15	x		x		x			x
Ag 16	x		x		x		x	

### Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)

A las soluciones obtenidas se les realizó un barrido en el equipo de UV-Vis MAPADA 3200 PC con longitudes de onda entre 300 y 600 nm. El objetivo del análisis fue observar la longitud de onda en la que se presenta la mayor absorbancia y definir el tamaño de partícula aproximado que se obtiene en cada síntesis.

Para verificar el tamaño de partícula obtenido, se usó microscopía electrónica de transmisión TEM usando un equipo Tecnai F20 Super Twin TMP de FEI. Se escogieron para este análisis 6 protocolos, los cuales mostraban un pico de absorbancia en el espectro UV-Vis correspondiente a la plata; las demás muestras no fueron analizadas. Por otro

lado, se verificó el tamaño de partícula usando la técnica de dispersión de luz dinámica DLS en el equipo Zetasizer Pro con longitud de onda 632,8 nm.

### Diseño factorial

Para optimizar el tamaño de partícula final de las AgNPs, se realizó un diseño experimental  $2^k$  variando los cuatro parámetros mencionados anteriormente en dos niveles alto y bajo, como se observa en la tabla 1; para la síntesis de AgNPs, se realizaron 16 muestras diferentes, elaboradas por duplicado, obteniendo 32 soluciones finales. El diseño experimental tuvo como variable de salida la longitud de onda, observada en el espectro UV-Vis, puesto que, según lo registrado en la literatura,

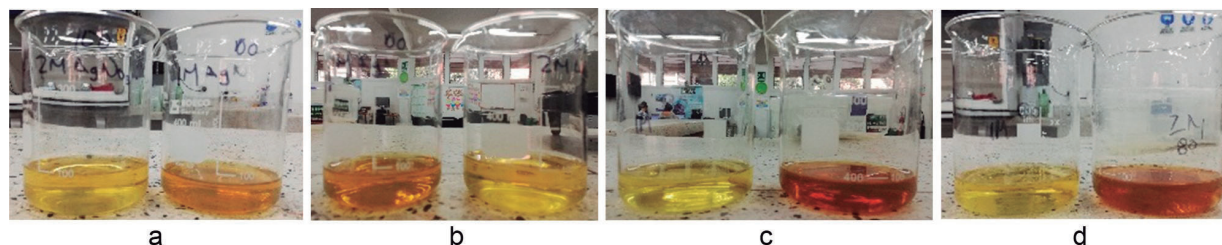
para un tamaño de partícula específico se obtiene una longitud de onda característica.

Los valores de longitud de onda se examinaron mediante el software RStudio, a los cuales se les realizaron las pruebas de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos, para así poder realizar un análisis de varianza (ANOVA); posteriormente, se realizó la optimización del diseño usando el software STATGRAPHICS centurión XVII. Las hipótesis aplicadas para cada prueba estadística se especifican en el análisis y discusión de los resultados.

## Resultados

### Síntesis de AgNPs

En la figura 2 se observan las diferentes soluciones obtenidas en la síntesis de AgNPs. Con la variación de los diferentes factores se evidencia una tendencia, según la cual, a mayor nivel de molaridad del  $\text{AgNO}_3$ , existe una coloración marrón más oscura; este cambio de tonalidad lo han registrado diferentes autores y se atribuye a una mayor concentración de  $\text{AgNO}_3$ , debido a que existe mayor cantidad de agente precursor para la formación de nanopartículas [22-24].

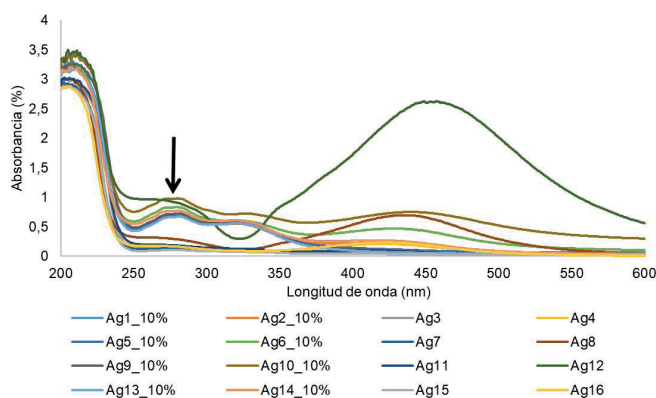


**Figura 2.** Soluciones de la síntesis de nanopartículas de plata, a. 100 °C, 0,1 y 0,2 M  $\text{AgNO}_3$ , 10 % citrato; b. 100 °C, 0,1 y 0,2 M  $\text{AgNO}_3$ , 1 % citrato; c. 80 °C, 0,1 y 0,2 M  $\text{AgNO}_3$ , 10 % citrato; d. 80 °C, 0,1 y 0,2 M  $\text{AgNO}_3$ , 1 % citrato.

### Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)

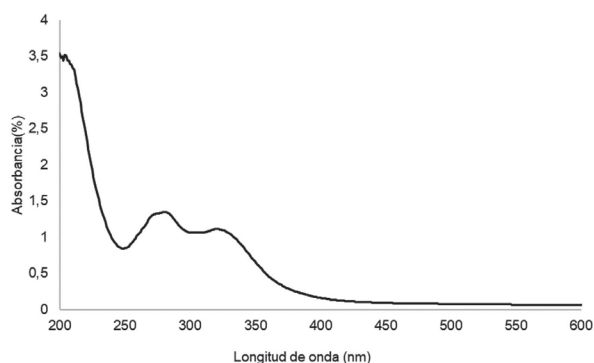
**Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis).** En la figura 3 se muestran los espectros UV-Vis para todos los protocolos realizados. se resaltan los espectros obtenidos cuando se adicionó PVA al 10 %, debido a que al realizar el espectro es evidente la presencia del PVA sobre las AgNPs. Este efecto se verificó al realizar el espectro UV-Vis del PVA (Figura 4), donde se observan bandas en 273 y 323 nm, que aparecen también registradas en los espectros de las nanopartículas sintetizadas

(ver flecha, figura 3), lo cual genera picos en las longitudes de ondas solapadas que corresponden al espectro de PVA. Teniendo en cuenta esto, se redujo el porcentaje de PVA correspondiente al nivel alto de 10 % a 2 %, esto con el fin de evitar el enmascaramiento por el alto porcentaje. La presencia de bandas de absorción en el espectro UV-Vis en longitudes de onda entre 400 a 450 nm indica la presencia de nanopartículas metálicas de plata. Dichas bandas corresponden a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales de la plata [25].



**Figura 3.** Espectros UV-Vis del ensayo con PVA al 10 %.

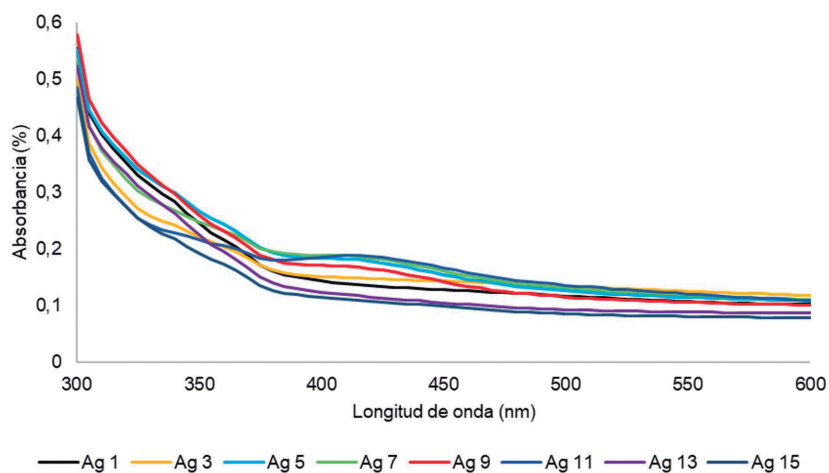




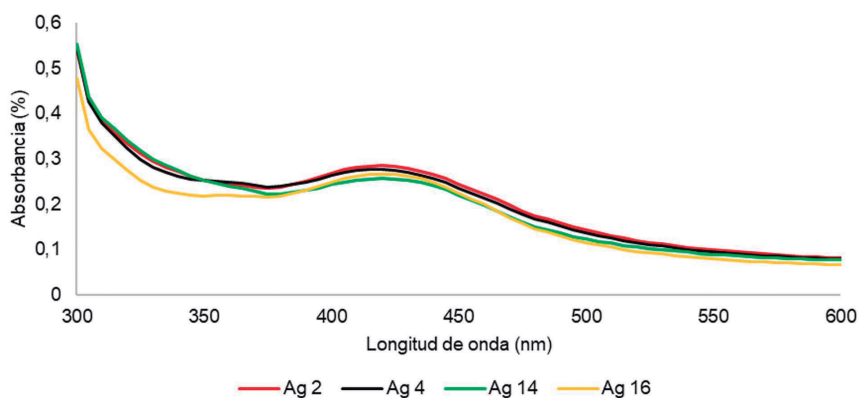
**Figura 4.** Espectro UV-Vis del PVA.

En las figuras 5 a la 8 se visualizan los diferentes espectros UV-Vis para los protocolos evaluados; la nomenclatura mostrada corresponde a la

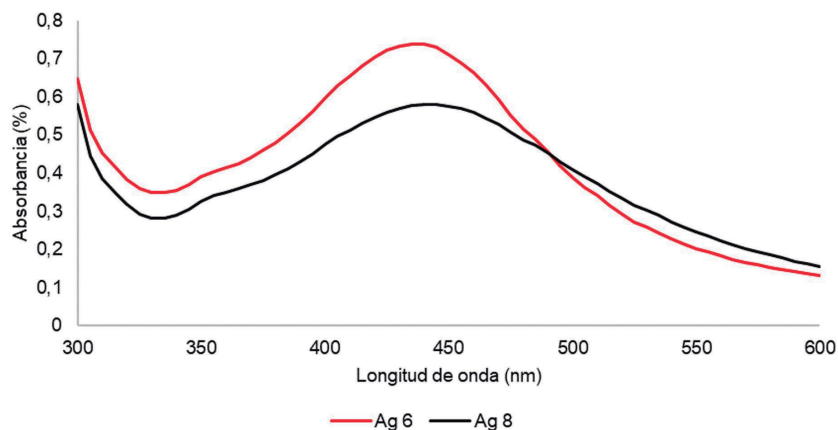
información contenida en la tabla 1. La separación de espectros se hizo para una mejor visualización del resultado de cada síntesis.



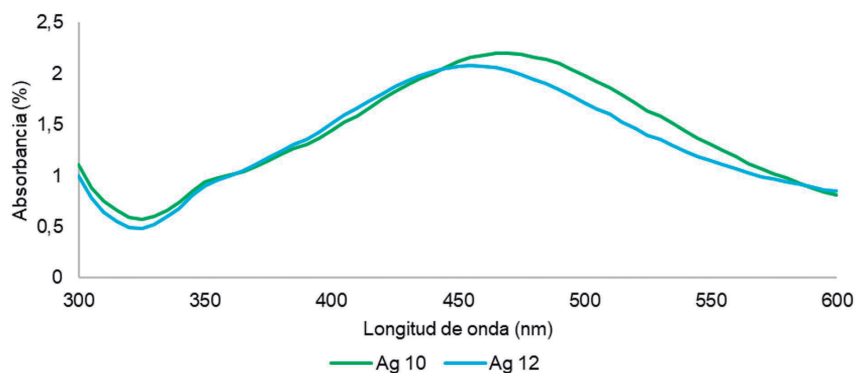
**Figura 5.** Espectro UV-Vis de las muestras de AgNPs con baja absorbancia.



**Figura 6.** Espectro UV-Vis con absorbancia media en longitud de onda entre 400 y 450 nm.



**Figura 7.** Espectro UV-Vis con absorbancia alta en longitud de onda entre 400 y 480 nm.



**Figura 8.** Espectro UV-Vis con absorbancia alta en longitud de onda entre 400 y 550 nm.

En la figura 5 se puede ver claramente que no existe un pico característico en la curva, lo que puede indicar dos cosas: que no hubo formación de AgNPs o que la reacción dio muy pocas AgNPs con un tamaño de partícula muy pequeño. En la figura 6 se evidencia un pico aproximadamente en los 420 nm, que corresponde a alrededor de 40 nm de tamaño de partícula [26]; sin embargo, tiene una absorbancia baja, lo cual se debe a una baja concentración de AgNPs formadas en la solución. En las figuras 7 y 8 se puede observar cómo se forma un pico aproximadamente entre los 430 y 470 nm, el cual corresponde a un tamaño de partícula entre 30 y 60 nm con una absorbancia mucho mayor que las muestras anteriores, siendo las muestras Ag10 y Ag12 las que presentan mayor absorbancia. Este fenómeno puede asociarse a la existencia de gran cantidad de AgNPs que corresponden a este tamaño o a la formación de nanopartículas más pequeñas en forma de aglomerados. En estas longitudes de ondas, por

el efecto plasmón, teóricamente, los AgNPs deben oscilar en un rango de 60 nm a 80 nm [26]. En las otras dos curvas que sobresalen, se espera un tamaño de partícula aproximadamente de 40 nm; cabe resaltar que no se tiene gran diferencia entre la primera síntesis y su réplica, lo que indica que los procesos son reproducibles.

#### **Microscopía electrónica de transmisión (TEM).**

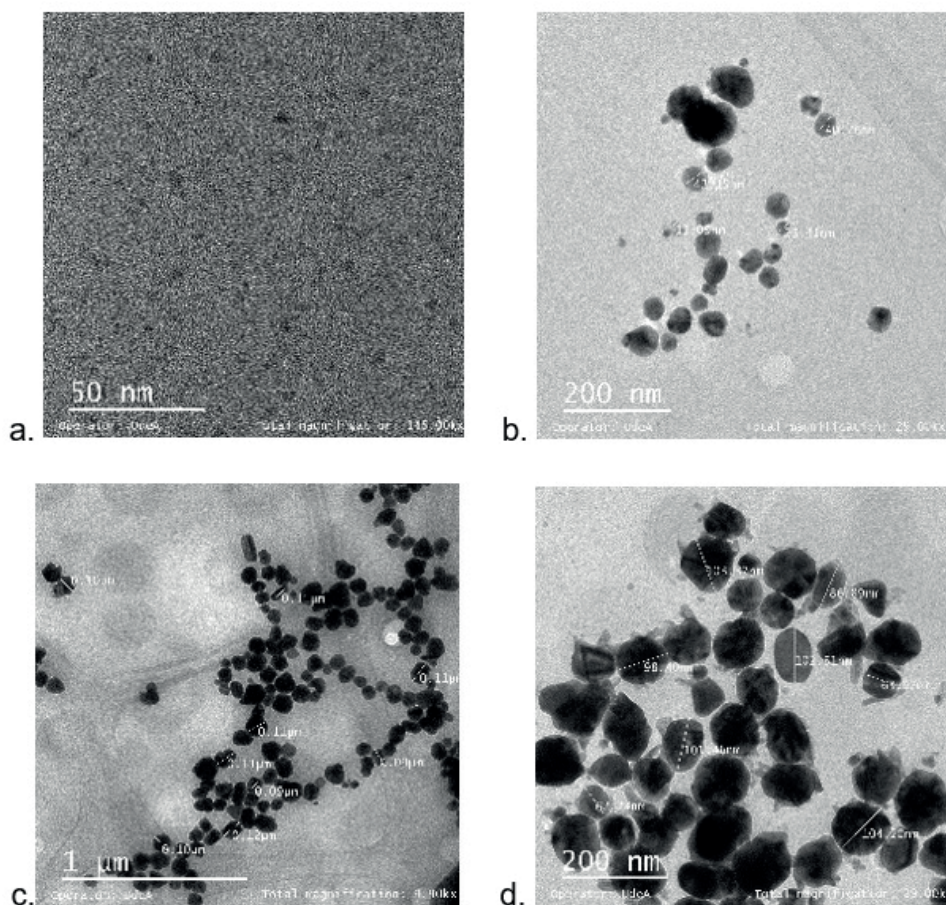
Usando las micrografías TEM, se midieron las nanopartículas mediante el *software* asociado al equipo TEM, se hizo un promedio aproximado de 20 partículas, y de ello se obtuvo el tamaño aproximado de las AgNPs presentes en las diferentes muestras. Según los datos registrados por el ensayo de UV-Vis, se puede esperar ciertos tamaños de partículas relacionados con lo presentado en la literatura [26].

En la figura 9 se presentan las micrografías TEM; se puede observar como las micrografías revelan lo predicho en el UV-Vis, en donde la figura 9a es



la muestra Ag 9. Además, al observar la figura 5, en donde se encuentra esta muestra, se puede comprobar que la baja absorbancia da cuenta de que en la síntesis se obtuvieron muy pocas AgNPs en las muestras Ag 8, Ag 9, Ag 10 y Ag 12. También se evidencia que la figura 9c y 9d que corresponden a Ag 10 y Ag 12, presentan gran cantidad de AgNPs, lo cual confirma los resultados de 9c y 9d UV-Vis, pero difieren con el valor teórico de tamaño de nanopartícula, puesto que se espera un tamaño de 80 nm y se tiene un valor de 90 nm. Para las muestras Ag 10 y Ag 12, para las cuales se espera el mismo tamaño de nanopartícula, se tiene un tamaño de partícula entre 60 nm y 100

nm, lo cual está dentro del rango de lo predicho. Para la figura 9a, que corresponde a la muestra Ag 9, se tiene que el tamaño de partícula está en el rango de 13 a 40 nm, el valor teórico esperado para esta longitud de onda es de 40 nm, por lo cual se obtuvieron en el tamaño esperado [26]. Estos resultados indican que, si bien se difiere con el valor teórico en algunos casos, las AgNPs se pueden considerar de tamaño nanométrico, puesto que no superan los 100 nm. Además, mediante TEM, se pudo observar que las muestras con longitud de onda de 395 nm no presentan AgNPs. Así mismo, mediante esta técnica se pudo observar la geometría que las AgNPs es pseudoesférica.

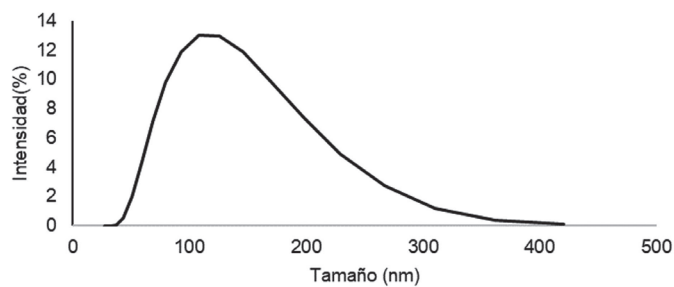


**Figura 9.** Micrografías TEM, a. Ag 9 (6 a 15 nm), b. Ag 8 (13 a 40 nm), c. Ag 10 (90 a 110 nm, d. Ag 12. (62 a 103 nm).

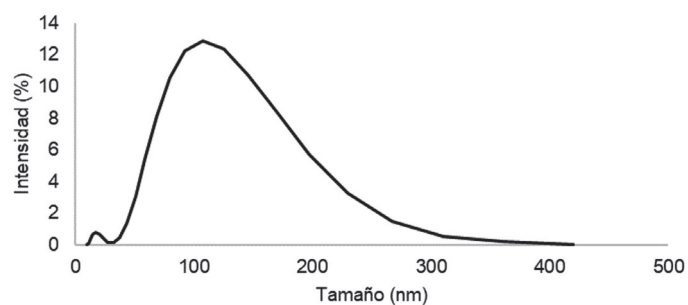
### Dispersión dinámica de luz (DLS)

Como las AgNPs no tienen un tamaño exacto, sino que oscilan en un intervalo de tamaños, se realizó

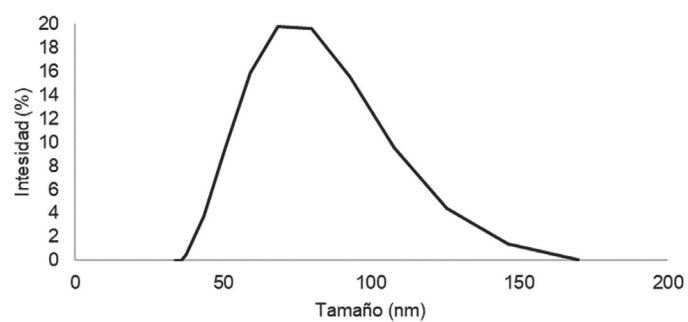
un análisis DLS, como se muestra en las figuras 10 a la 14.



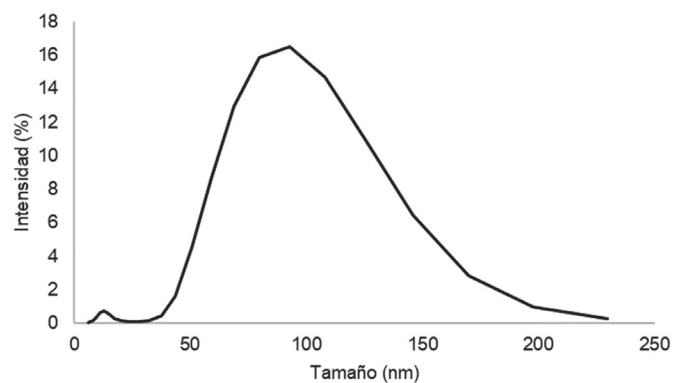
**Figura 10.** Análisis DLS de la muestra Ag 12.



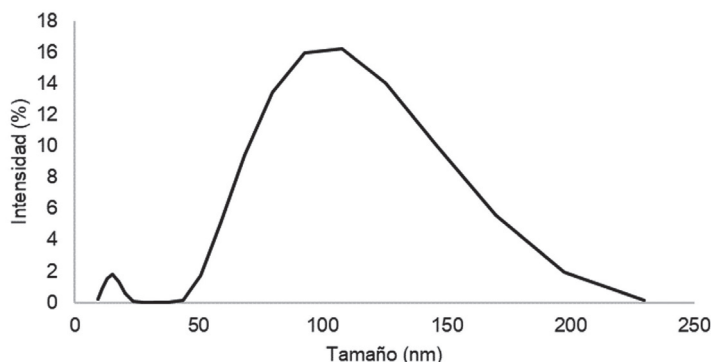
**Figura 11.** Análisis DLS de la muestra Ag 10.



**Figura 12.** Análisis DLS de la muestra Ag 8.



**Figura 13.** Análisis DLS de la muestra Ag 6.



**Figura 14.** Análisis DLS de la muestra Ag 4.

En los resultados mostrados en las figuras 10 a 14 se puede ver como es la distribución de las partículas en las diferentes soluciones preparadas. Si bien existen tamaños mayores a los 100 nm, se pueden asociar a la aglomeración de partículas; esta hipótesis se sustenta en que las micrografías TEM no evidencian la presencia de partículas mayores a los 200 nm. Se nota que existen AgNPs en el rango esperado y menores a 100 nm; además, para las muestras Ag 4, Ag 6 y Ag 10, existe un pequeño pico entre los 10 y 20 nm, que es el tamaño esperado para la optimización del ensayo. Si bien los resultados obtenidos mediante esta técnica tienen un rango mayor a los mostrado en las anteriores técnicas, se evidencia que los valores predichos por UV-Vis están dentro del rango de los resultados obtenidos mediante DLS.

#### Diseño factorial

Para la optimización del diseño factorial, se partió de los datos de la tabla 2, que muestran las

longitudes de onda obtenidas para las dos síntesis realizadas; se puede observar como los valores son muy cercanos entre las mismas muestras de las dos síntesis, lo que indica que el método es reproducible. Este valor de longitud de onda fue el usado para el análisis estadístico de los datos, pues presenta una relación con la presencia de plata y además con el tamaño esperado de las partículas, debido a que se varió la temperatura, la cual ayuda a la formación de AgNPs, puesto que aumenta la cinética en la reacción. El nitrato de plata es el agente precursor que, mediante la reducción, pasa de una sal metálica al átomo cerovalente; estos átomos se comportan como centros de nucleación, que inician la formación de AgNPs por la agregación de varios de estos átomos. Para detener el crecimiento, se usa un agente reductor como es el citrato trisódico; en este caso, su función consiste en unirse a la superficie de las AgNPs para estabilizarlas [27].

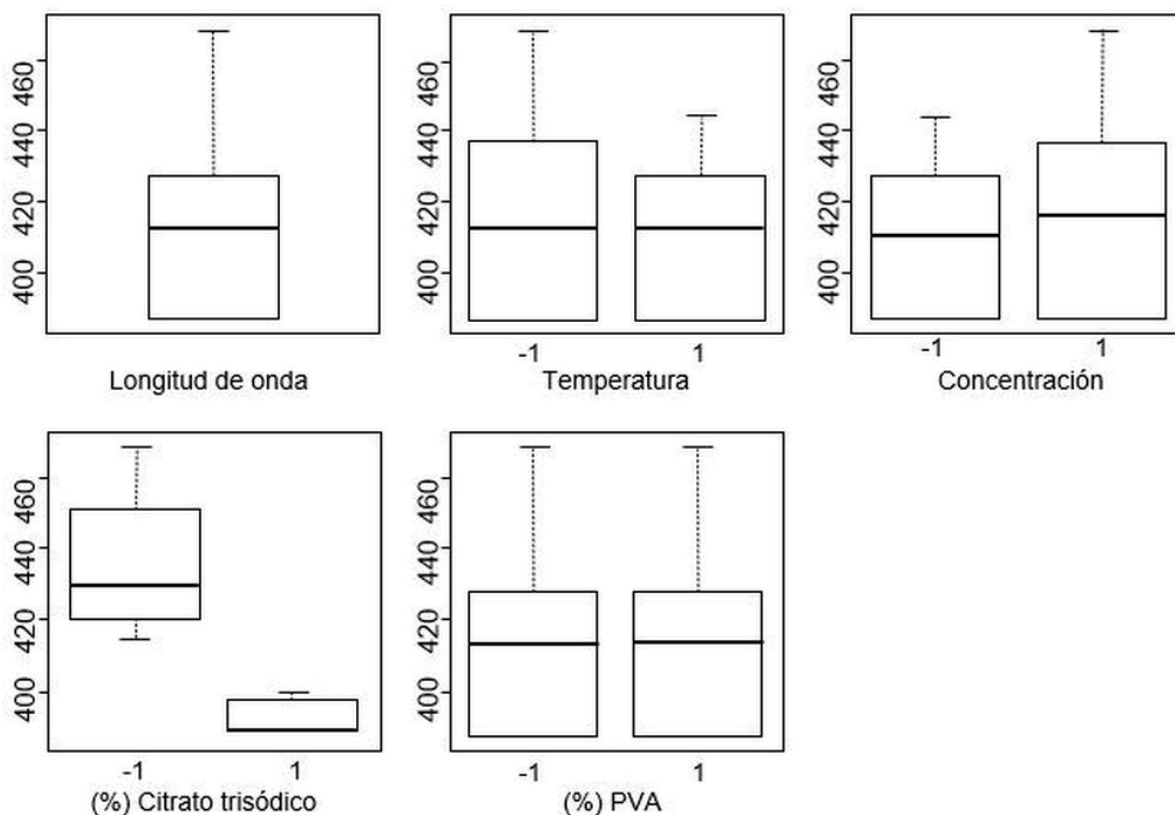
**Tabla 2.** Datos experimentales obtenidos durante la síntesis de nanopartículas de plata.

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2
	Longitud de onda (nm) UV-Vis	Longitud de onda (nm) UV-Vis
Ag 1	395	395
Ag 2	420	420
Ag 3	395	395
Ag 4	420	420
Ag 5	395	410
Ag 6	435	440
Ag 7	400	410
Ag 8	445	435
Ag 9	395	395
Ag 10	470	465
Ag 11	415	395
Ag 12	450	470
Ag 13	395	395
Ag 14	420	420
Ag 15	395	395
Ag 16	415	420

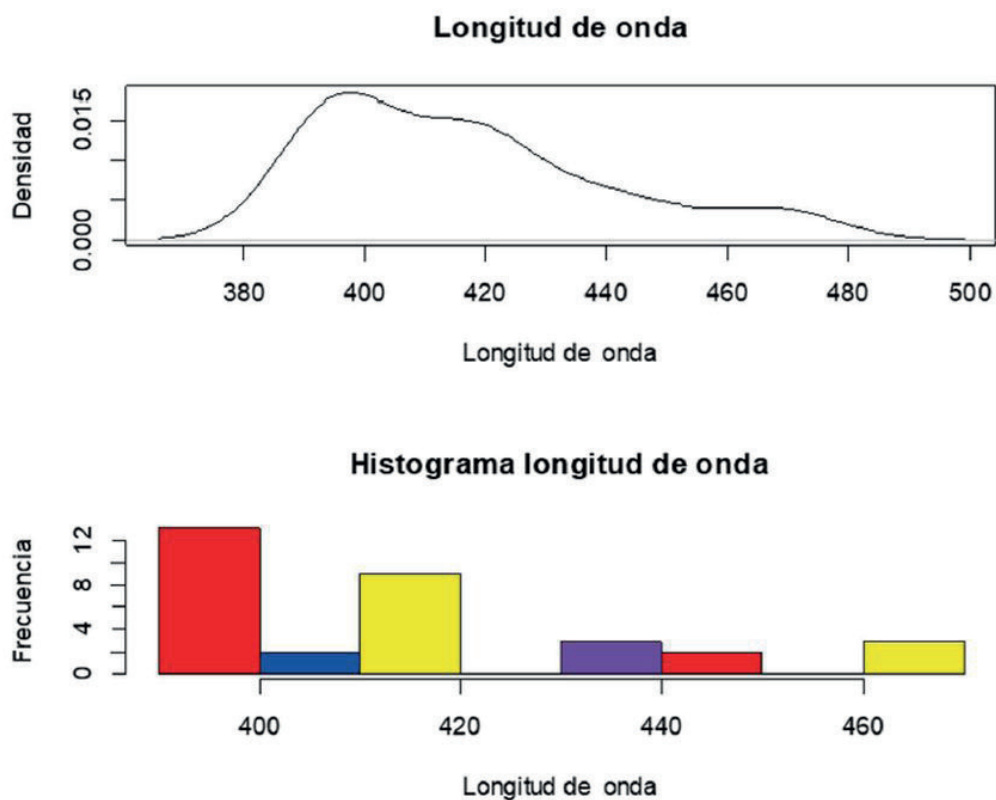
### Análisis exploratorio

En el análisis exploratorio (figuras 15 a 17) se presenta, inicialmente, el diagrama de caja y bigotes, indicando que los únicos datos que coinciden en sus medianas, o que, en otras palabras, difieren en su valor central, son los niveles de porcentaje de citrato trisódico. Además, se observa la presencia de valores atípicos; esto indica que existen dos valores que difieren numéricamente del resto de ese factor, y debido a la separación de las medianas se muestra que existe una diferencia numérica entre los niveles [20]. En la figura 16 se puede observar la tendencia de la respuesta de los datos, en donde la mayoría de datos se encuentran en el intervalo de 380 a 400 nm, lo cual se corrobora de la tabla 2, donde gran cantidad de mediciones corresponden con

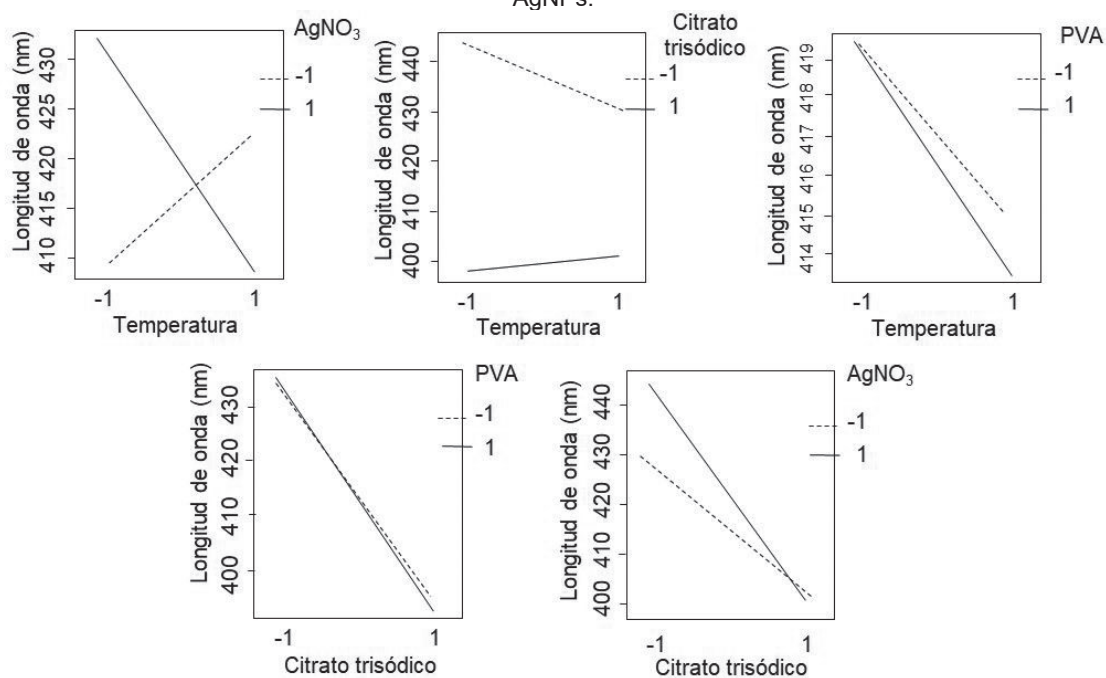
395 nm. Respecto al diagrama de densidad, del cual, estadísticamente, se espera que tenga forma de campana de Gauss, y que indique indicando una distribución normal, cabe señalar que este no presenta dicha forma, sino una distribución asimétrica positiva que evidencia así que la mayoría que la mayoría de datos se encuentran en una longitud de onda baja; es por esto que se hace necesario realizar la prueba de normalidad. En el gráfico de interacciones que se muestra en la figura 17, se puede notar cómo los factores de temperatura y porcentaje de citrato trisódico no presentan interacción, hecho que puede afectar la respuesta; en las otras interacciones se evidencia cómo los factores afectan la respuesta, en este caso, la longitud de onda.



**Figura 15.** Diagrama caja y bigotes para los diferentes factores involucrados en la síntesis de AgNPs.



**Figura 16.** Diagrama de densidad e histograma de frecuencia de la longitud de onda obtenida en la síntesis de AgNPs.



**Figura 17.** Interacción de los factores obtenido en la síntesis de AgNPs.



### Análisis de varianza (ANOVA)

Para el análisis de varianza (ANOVA), primero se hicieron las pruebas de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos, usando el *software* Rstudio, con un intervalo de confianza del 95 %.

Para el test de normalidad de los datos, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y como resultado se obtuvo un valor-P de 0,161867; esta prueba

tiene como hipótesis nula que los datos provienen de una distribución normal. Se evidencia que el resultado está dentro del intervalo de confianza; dado que el resultado es mayor 0,05, se puede afirmar que la hipótesis nula se cumple y que los datos provienen de una distribución normal [20]. El test de homocedasticidad de los datos se hizo mediante la prueba de Levene, la cual arrojó los resultados mostrados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Prueba Levene de los datos.

Prueba Levene	
Grupo	Valor-P
Porcentaje PVA	0,6324
Concentración $\text{AgNO}_3$	0,1367
Porcentaje citrato trisódico	0,0019
Temperatura	0,1826

La prueba de homocedasticidad de Levene tiene como hipótesis nula que la varianza de los datos es igual. Como se evidencia en la tabla 3, existe un valor que es menor al 0,05, lo cual indica que existe una varianza entre sus datos, específicamente para el factor de porcentaje de citrato trisódico [20].

El test de independencia se realizó mediante

la prueba de Durbin Watson; para el modelo ajustado, se tienen los datos de la tabla 4. Se tiene como hipótesis nula que la autocorrelación de los datos es cero. Como se observa en la tabla 4, los valores P son mayores al 0,05, es decir no existe autocorrelación y los datos son independientes [20], condición necesaria para validar el análisis ANOVA.

**Tabla 4.** Prueba Durbin Watson del modelo ajustado.

Prueba Durbin Watson	
	Valor P
Modelo ajustado	0,9247
Porcentaje PVA del modelo ajustado	0,8234
Concentración $\text{AgNO}_3$ del modelo ajustado	0,8812
Porcentaje citrato trisódico del modelo ajustado	0,4593
Temperatura del modelo ajustado	0,8631

En vista que todas las pruebas estuvieron dentro del nivel de confianza, salvo por un factor para la prueba de homocedasticidad, se realizó la prueba de falta de ajuste *Lack of fit*, la cual dió un valor P de 0,4176. Esta prueba se hizo con el fin de evaluar si una relación curvilínea podría expresar mejor los datos que un modelo lineal; esta prueba se basa en el análisis de la varianza de los residuales, y tiene como hipótesis nula que no existe falta de ajuste del modelo. Como se indica, el valor P es mayor a 0,05, por lo cual se acepta la hipótesis nula y se puede seguir con el análisis de varianza [20].

Como los datos pasaron la prueba *Lack of fit*, se realizó el análisis ANOVA; los resultados se encuentran en las tablas 5 y 6. En la tabla 5, se presenta el análisis factorial del modelo, en

donde se evidencia que solo 7 factores entre individuales e interacciones presentan una significancia estadística. Con el fin de reducir el modelo, se eliminaron cada uno de los factores que no representan una significancia estadística, obteniendo como resultado la tabla 6, en donde se observa que el PVA no influencia la obtención de AgNPs; conclusión coherente con el hecho de que el PVA es un constituyente que únicamente facilita la dispersión de las AgNPs en la solución. Por otro lado, la temperatura, la concentración de  $\text{AgNO}_3$ , el porcentaje de citrato trisódico y la interacción entre temperatura: $\text{AgNO}_3$ , temperatura:citrato trisódico, y  $\text{AgNO}_3$ :citrato trisódico muestran que influyen en la obtención de las AgNPs, en donde es más relevante el factor del porcentaje de citrato trisódico.



**Tabla 5.** Análisis ANOVA del modelo para el diseño factorial.

Factores individuales	Valor P
Temperatura	0,041
AgNO <sub>3</sub>	0,024
PVA	0,785
Citrato trisódico	2,05*10 <sup>-11</sup>
Interacción de factores	
Temperatura:AgNO <sub>3</sub>	2,15*10 <sup>-7</sup>
Temperatura: PVA	0,785
AgNO <sub>3</sub> :PVA	1,000
Temperatura: citrato trisódico	0,008
AgNO <sub>3</sub> :citrato trisódico	0,004
PVA: citrato trisódico	0,283
Temperatura: AgNO <sub>3</sub> :PVA	0,587
Temperatura: AgNO <sub>3</sub> :citrato trisódico	4,42*10 <sup>-5</sup>
Temperatura: PVA: citrato trisódico	0,284
AgNO <sub>3</sub> : citrato trisódico	0,417
Temperatura: AgNO <sub>3</sub> :PVA: citrato trisódico	0,417

**Tabla 6.** Análisis ANOVA del modelo ajustado para el diseño factorial.

Factor individual	Valor P
Temperatura	0,024
AgNO <sub>3</sub>	0,012
Citrato trisódico	2,51*10 <sup>-15</sup>
Interacción de factores	
Temperatura:AgNO <sub>3</sub>	1,81*10 <sup>-9</sup>
Temperatura: citrato trisódico	0,003
AgNO <sub>3</sub> :citrato trisódico	0,001
Temperatura: AgNO <sub>3</sub> :citrato trisódico	3,16*10 <sup>-6</sup>

### Estimación de las mejores condiciones de síntesis

Para la optimización del diseño a un tamaño de partícula aproximado de 20 nm, el cual corresponde a una longitud de onda de 400 nm aproximadamente [26], se hizo un proceso de estimación a partir del modelo de regresión, cuyos resultados se registran en la tabla 7. Para la aplicación específica en apósitos, que puede ser una de las posibles aplicaciones de las nanopartículas de plata, se estiman tamaños entre 10 y 20 nm, puesto que las AgNPs interaccionan de mejor manera con la membrana de los

microorganismos, de modo que ocasionan una mayor inhibición de estos [28]. Buscando entonces dichos valores, se debe tener una temperatura de 91 °C, una concentración de nitrato de plata de 0,13 molar y, finalmente, una concentración de citrato trisódico de aproximadamente el 10 %. Se deduce que, al haber mayor cantidad de agente reductor, las AgNPs disminuyen de tamaño; según lo reportado para este tipo de síntesis, se puede variar la forma en que se agrega la solución precursora al agente reductor, e implementando una menor temperatura se obtienen tamaños entre los 20 y 30 nm [24].

**Tabla 7.** Valores de optimización.

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>	<b>Valor</b>
Temperatura	-1,0	1,0	0,098	91 °C
AgNO <sub>3</sub>	-1,0	1,0	-0,58	0,13 M
Citrato trisódico	-1,0	1,0	0,98	10 %

\*Valor óptimo = 400,0 nm

Comparando los datos de la tabla 7 y la tabla 1, los valores tienen una gran semejanza con la muestra Ag 5. Se observa que para esta muestra, en la tabla 2, se tiene una longitud de onda entre los 395 y 410 nm, lo cual corrobora que la optimización para obtener partículas de un tamaño de 20 nm o menos es acertada.

### Conclusiones

Los diseños factoriales son de gran importancia, debido a que permiten la optimización de procesos incluyendo de síntesis; en este caso, el diseño factorial permitió observar como, al variar los factores de la síntesis de nanopartículas de plata, se modifican las características finales de estas.

Los factores de temperatura, concentración de AgNO<sub>3</sub>, porcentaje de citrato trisódico, a diferencia del porcentaje de PVA, al ser variados, modifican el tamaño de las AgNPs.

La interacción de la temperatura, el citrato trisódico y el nitrato de plata, es de gran importancia por su efecto en la obtención final de las AgNPs.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Biomateriales BIOMAT y a la Universidad de Antioquia por el apoyo y la financiación del proyecto.

### Referencias bibliográficas

- [1] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. Trends Biotechnol. 2012;30(10):499-511.
- [2] Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. Int. J. Nanomed. 2012;7:2767-81.
- [3] Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine. 2012;8(1):37-45.
- [4] Zhang JP, Chen P, Sun CH, Hu XJ. Sonochemical synthesis of colloidal silver catalysts for reduction of complexing silver in DTR system. Appl. Catal., A. 2004;266(1):49-54.
- [5] Patel K, Kapoor S, Dave DP, Mukherjee T. Synthesis of nanosized silver colloids by microwave dielectric heating. J. Chem. Sci. 2005;117(1):53-60.
- [6] Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2007;73(6):1712-20.
- [7] Benedí J. Apósitos. Farmacia Profesional. 2006;20(6):52-6.
- [8] Amarís MR, Rojas JB, Batista AG, Chaparro CG, García JP, Rodríguez LV. Factores asociados al pie diabético en pacientes ambulatorios. Centro de Diabetes Cardiovascular del Caribe. Barranquilla (Colombia). Salud Uninorte. 2012;28(1):65-74.
- [9] Zhao L, Wang H, Huo K, Cui L, Zhang W, Ni H, Zhang Y, Wu Z, Chu PK. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. Biomaterials. 2011;32(24):5706-16.
- [10] Farzin L, Sadjadi S, Shamsipur M, Sheibani S, hasan Mousazadeh M. Employing AgNPs doped amidoxime-modified polyacrylonitrile (PAN-oxime) nanofibers for target induced strand displacement-based electrochemical aptasensing of CA125 in ovarian cancer patients. Mater. Sci. Eng., C. 2019;97:679-87.
- [11] Dadashpour M, Firouzi-Amadi A, Pourhassan-Moghaddam M, Maleki MJ, Soozangar N, Jeddi F, Pilehvar-Soltanahmadi Y. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using Matricaria chamomilla extract and their potential anticancer activity against human lung cancer cells. Mater. Sci. Eng., C. 2018;92:902-12.
- [12] Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. Int. J. Pharm. 2014;463(2):127-36.

- [13] Hebeish A, El-Rafie MH, El-Sheikh MA, Seleem AA, El-Naggar ME. Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014;65:509-15.
- [14] Ding L, Shan X, Zhao X, Zha H, Chen X, Wang J, Yu G. Spongy bilayer dressing composed of chitosan–Ag nanoparticles and chitosan–Bletilla striata polysaccharide for wound healing applications. *Carbohydr. Polym.* 2017;157:1538-47.
- [15] Levi-Polyachenko N, Jacob R, Day C, Kuthirummal N. Chitosan wound dressing with hexagonal silver nanoparticles for hyperthermia and enhanced delivery of small molecules. *Colloids Surf., B.* 2016;142:315-24.
- [16] Bozaci E, Akar E, Ozdogan E, Demir A, Altinisik A, Seki Y. Application of carboxymethylcellulose hydrogel based silver nanocomposites on cotton fabrics for antibacterial property. *Carbohydr. Polym.* 2015;134:128-35.
- [17] Rubina MS, Kamitov EE, Zubavichus YV, Peters GS, Naumkin AV, Suzer S, Vasil'kov AY. Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: Synthesis and structure. *Appl. Surf. Sci.* 2016;366: 365-71.
- [18] Carmona MER, da Silva MAP, Leite SGF. Biosorption of chromium using factorial experimental design. *Process Biochem.* 2005;40(2):779-88.
- [19] Enis IY, Sezgin H, Sadikoglu TG. Full factorial experimental design for mechanical properties of electrospun vascular grafts. *J. Ind. Text.* 2018;47(6):1378-91.
- [20] Montgomery DC. Design and analysis of experiments. United States: John wiley & sons; 2017.
- [21] Gallo Ramirez JP, Ossa Orozco CP. Fabricación y caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel. *Ing. Desarro.* 2019;37(1):88-104.
- [22] Ananda AP, Manukumar HM, Krishnamurthy NB, Nagendra BS, Savitha KR. Assessment of antibacterial efficacy of a biocompatible nanoparticle PC@ AgNPs against *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* 2019;126:27-39.
- [23] Ahila NK, Ramkumar VS, Prakash S, Manikandan B, Ravindran J, Dhanalakshmi PK, Kannapiran E. Synthesis of stable nanosilver particles (AgNPs) by the proteins of seagrass *Syringodium isoetifolium* and its biomedical properties. *Biomed. Pharmacother.* 2016;84:60-70.
- [24] Khatoon UT, Rao GN, Mohan KM, Ramanaviciene A, Ramanavicius A. Antibacterial and antifungal activity of silver nanospheres synthesized by tri-sodium citrate assisted chemical approach. *Vacuum.* 2017;146:259-65.
- [25] Morales J, Morán J, Quintana M, Estrada W. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata synthesis and characterization of silver nanoparticles by sol-gel route from silver nitrate. *Rev. Soc. Quim. Peru.* 2009;75(2):177-84.
- [26] Wei A. Plasmonic nanomaterials. En *Nanoparticles*. Springer, Boston, MA. 2004. pp. 173-200.
- [27] Sifontes AB, Melo L, Maza C, Mendes JJ, Mediavilla M, Brito JL, Zoltan T, Albornoz A. Preparation of silver nanoparticles in the absence of polymer stabilizers. *Quim. Nova.* 2010;33(6):1266-9.
- [28] Velázquez-Velázquez JL, Santos-Flores A, Araujo-Meléndez J, Sánchez-Sánchez CV, González C, Martínez-Castañón G, Martínez-Gutierrez F. Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles. *Mater. Sci. Eng., C.* 2015;49:604-11.