TecnoLógicas

Síntesis verde para la producción de óxido de grafeno reducido a partir de extracto de té verde (*Camellia sinensis*)

Green Synthesis to Produce Reduced Graphene Oxide from Green Tea Extract (*Camellia Sinensis*)

Juan D. Micolta-Galeano[1]; Oscar Montes-Beltrán[1]; Carlos D. Grande-Tovar[2]
David Martiliano[2]; Juan D. Rodríguez-Macías[3]; Daniel Insuasty-Delgado[4];
Jose H. Mina-Hernández[1]

[1]Universidad del Valle, Cali – Colombia
[2]Universidad del Atlántico, Puerto Colombia – Colombia
[3]Universidad Libre, Barranquilla – Colombia
[4]Universidad del Norte, Barranquilla – Colombia

Correspondencia: jose.mina@correounivalle.edu.co

Recibido: 19 Octubre 2025 **Aceptado:** 02 Octubre 2026 **Disponible:** 08 Octubre 2026

Cómo citar / How to cite
J. D. Micolta-Galeano, O. Montes-Beltran, C. D. Grande-Tovar, D. Martiliano, J. D. Rodríguez-Macías, D. Insuasty-Delgado, and J. H. Mina-Hernández, "Síntesis verde para la producción de óxido de grafeno reducido a partir de extracto de té verde (*Camellia sinensis*)" *TecnoLógicas*, vol. 29, no. 67, e3729, 2026.
https://doi.org/10.22430/22565337.3729

CC BY NC SA

Resumen

Para la obtención convencional de óxido de grafeno reducido (rGO) suelen emplearse agentes reductores tóxicos y condiciones de síntesis con un impacto ambiental negativo, lo que ha impulsado el desarrollo de rutas verdes basadas en compuestos naturales. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue sintetizar rGO a partir de óxido de grafeno mediante el método de Hummers modificado. La metodología empleada consideró, adicionalmente, el uso de un extracto acuoso de té verde (*Camellia sinensis*) como agente reductor, y la aplicación de un diseño experimental Box-Behnken para determinar el efecto de su volumen y la temperatura y el tiempo de reacción, sobre las características estructurales, químicas y coloidales del material obtenido. Los resultados encontrados mediante la caracterización por FTIR, DRX, SEM-EDS, DLS y XPS evidenciaron una disminución de la cantidad de grupos oxigenados, cambios en la distancia interlaminar y un aumento de la relación C/O, lo cual confirmó la reducción parcial del GO. Las muestras RGO11, RGO12 y RGO8 presentaron los mayores indicios de reducción según los análisis FTIR y EDS, mientras que los resultados de XPS mostraron un incremento de la relación C/O de 1,33 en GO a 1,61 en RGO5 y a 1,62 en RGO6. La evaluación de la viabilidad celular mediante MTT mostró baja citotoxicidad general en células Vero y una respuesta diferencial en células PC3, destacándose la muestra RGO9 por una mayor reducción de la viabilidad celular, posiblemente asociada a su mayor densidad de defectos estructurales. Finalmente, se concluye que la combinación de extractos naturales con herramientas de diseño experimental permite orientar la síntesis verde de rGO hacia la obtención de materiales con propiedades estructurales y biológicas ajustables, con potencial de aplicación en nanotecnología y en estudios biomédicos exploratorios.

Palabras clave

Citotoxicidad, diseño Box-Behnken, extracto de té verde, óxido de grafeno reducido, síntesis verde.

Abstract

Conventional production of reduced graphene oxide (rGO) typically involves toxic reducing agents and synthesis conditions with negative environmental impacts, prompting the development of green routes based on natural compounds. In this context, the aim of this research was to synthesize rGO from graphene oxide using the modified Hummers method. The methodology incorporated the use of an extract of aqueous green tea (*Camellia sinensis*) as a reducing agent. Unlike previous studies, which focused mainly on the chemical reduction of GO, this work employed a Box-Behnken experimental design to determine the effects of extract volume, temperature, and reaction time on the structural, chemical, and colloidal characteristics of the resulting material. Characterization by FTIR, XRD, SEM-EDS, DLS, and XPS revealed a reduction in oxygen-containing functional groups, changes in interlayer spacing, and an increased C/O ratio, confirming the partial reduction of GO. Samples RGO11, RGO12, and RGO8 showed the strongest evidence of reduction according to FTIR and EDS analyzes, while XPS results showed an increase in the C/O ratio from 1.33 in GO to 1.61 in RGO5 and 1.62 in RGO6. Cell viability assessment using the MTT assay indicated low overall cytotoxicity in Vero cells and a differential response in PC3 cells, notably, sample RGO9 caused the greatest reduction in cell viability, likely due to its higher density of structural defects. Finally, the study concludes that combining natural extracts with experimental design tools enables the green synthesis of rGO to yield materials with tunable structural and biological properties, offering potential applications in nanotechnology and exploratory biomedical studies.

Keywords

Cytotoxicity, Box-Behnken design, green tea extract, reduced graphene oxide, green synthesis.

1. INTRODUCCIÓN

El grafeno es una estructura bidimensional de carbono compuesta por una sola capa de átomos con hibridación sp^2, dispuestos en una red hexagonal [1]. Debido a sus propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y térmicas, este material y sus derivados han despertado un amplio interés en la ciencia de materiales, la nanotecnología, la remediación ambiental y las aplicaciones biomédicas [2].

Entre los derivados del grafeno, el óxido de grafeno (GO) se destaca por la presencia de grupos funcionales oxigenados, como hidroxilos, epóxidos, carbonilos y carboxilos, que favorecen su dispersión en medios acuosos y permiten posteriores modificaciones químicas. El GO se obtiene comúnmente mediante rutas oxidativas derivadas de los métodos clásicos de Brodie, Staudenmaier y Hummers, así como de variantes modificadas orientadas a mejorar el rendimiento, reducir los riesgos operativos y controlar el grado de oxidación del material [3], [4]. Aunque con el uso de estos protocolos es posible exfoliar y oxidar el grafito, aquí frecuentemente se requieren ácidos fuertes y reactivos oxidantes de alta peligrosidad, además de que se generan subproductos contaminantes; por esta razón, las modificaciones que se han hecho recientemente al método de Hummers pretenden disminuir los riesgos asociados al proceso y mejorar la eficiencia en los grados de oxidación del GO [3], [4], [5], [6].

El óxido de grafeno reducido (rGO) se obtiene a partir de la eliminación parcial de los grupos oxigenados del GO, permitiendo recuperar parcialmente la red conjugada sp^2 y mejorar las propiedades asociadas con la conductividad, la estabilidad estructural y el desempeño funcional. No obstante, los métodos tradicionales usados en la reducción requieren con frecuencia de agentes como la hidrazina, los borohidruros u otros reactivos de elevada toxicidad, lo que limita su compatibilidad ambiental y su posible uso en aplicaciones biomédicas [7], [8]. En este sentido, la síntesis verde del rGO a partir de extractos vegetales ha surgido como una alternativa de interés, ya que diversos metabolitos secundarios pueden actuar simultáneamente como agentes reductores, estabilizantes y funcionalizantes.

Los extractos vegetales ricos en polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos antioxidantes han sido utilizados recientemente para reducir GO y obtener rGO con propiedades estructurales y funcionales variables. Por ejemplo, estudios recientes reportan la síntesis verde del rGO utilizando extractos de *Tinospora cordifolia*, *Rhus coriaria*, *Laurus nobilis*, *Indigofera tinctoria* y otras fuentes vegetales, aplicados en adsorción, actividad antibacteriana y evaluación anticancerígena en condiciones in vitro [9], [10]. En particular, el extracto de té verde

(*Camellia sinensis*) ha sido empleado como agente reductor debido a su contenido de catequinas, como el galato de epigalocatequina (EGCG), la epigalocatequina (EGC), la epicatequina (EC) y el galato de epicatequina (ECG), que son compuestos con capacidad antioxidante y posible participación en la remoción parcial de grupos oxigenados del GO [11], [12], [13].

Aunque la reducción verde del GO mediante extractos naturales ha sido ampliamente explorada, persisten desafíos relacionados con la reproducibilidad, el control del grado de reducción y la correlación entre las condiciones de síntesis y las propiedades finales del material. La literatura científica reciente sobre rGO indica que las variaciones en la estructura, el grado de reducción, los defectos y la funcionalización superficial siguen siendo factores críticos para controlar sus propiedades y avanzar hacia aplicaciones reproducibles [14]. Además, estudios previos con extracto de té verde han mostrado que parámetros como la temperatura, el pH, la proporción GO/extracto y el tiempo de reacción, pueden modificar la eficiencia de reducción, la estabilidad coloidal y el desempeño funcional del rGO, por lo que resulta necesario analizar estas variables de forma sistemática [13]. No obstante, muchos trabajos se centran en demostrar la reducción del GO, pero no incluyen diseños experimentales que permitan evaluar la influencia de los parámetros de proceso ni su relacionan con la respuesta biológica del material.

Desde este punto de vista, el uso de diseños experimentales permite disminuir el número de ensayos, identificar efectos principales e interacciones entre las variables y orientar la optimización de los procesos de síntesis. En particular, el diseño Box-Behnken se ha empleado recientemente en la síntesis verde de nanomateriales para optimizar las condiciones de proceso e incrementar la reproducibilidad de las propiedades obtenidas [15] Por lo que su incorporación en los procesos de reducción verde del GO representa una estrategia metodológica pertinente para analizar el efecto combinado de variables como el volumen del extracto, la temperatura y el tiempo de reacción sobre las características del rGO.

Asimismo, la evaluación biológica del rGO obtenido mediante rutas verdes constituye un aspecto relevante para orientar posibles aplicaciones biomédicas. Estudios recientes han reportado que nanomateriales basados en rGO obtenidos mediante rutas verdes o asistidas por biomoléculas pueden presentar respuestas diferenciales frente a líneas celulares normales y cancerígenas, dependiendo de su composición, tamaño, carga superficial, defectos estructurales y grado de reducción [16], [17], [18]. Sin embargo, aún se requiere profundizar en la relación entre las condiciones de síntesis, las propiedades fisicoquímicas y la respuesta celular para evitar interpretaciones exclusivamente descriptivas de los resultados de citotoxicidad.

En consecuencia, el vacío científico que aborda este estudio se relaciona con la necesidad de integrar una ruta de síntesis verde de rGO con herramientas de diseño experimental que permitan evaluar el efecto combinado de las variables de proceso sobre las propiedades fisicoquímicas y la respuesta celular del material obtenido. Este enfoque resulta relevante porque la variabilidad inherente de los extractos naturales puede afectar la reproducibilidad de la reducción, por lo que la optimización experimental constituye una herramienta clave para avanzar hacia rutas más controladas, sostenibles y potencialmente escalables.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue sintetizar óxido de grafeno reducido mediante un extracto acuoso de té verde (*C. sinensis*) y un diseño experimental Box-Behnken, analizando el efecto del volumen de extracto, la temperatura y el tiempo de reacción sobre las características estructurales, químicas y coloidales del material obtenido. Para ello, el GO se preparó mediante el método de Hummers modificado y, posteriormente, se redujo bajo las condiciones definidas por el diseño experimental. Las muestras obtenidas fueron caracterizadas mediante FTIR, DRX, XPS, DLS y SEM-EDS, y se evaluó su citotoxicidad in vitro mediante el ensayo MTT en células PC3 y Vero, con el fin de explorar la relación entre las condiciones de síntesis, el grado de reducción y la respuesta biológica del rGO.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la síntesis del óxido de grafeno (GO) se empleó grafito en escamas con una pureza del 99 % (Alfa Aesar, Bogotá, Colombia) y reactivos Merck, entre ellos ácido sulfúrico (H_2SO_4, Merck, Bogotá, Colombia), permanganato de potasio ($KMnO_4$, Merck, Bogotá, Colombia) y nitrato de sodio ($NaNO_3$, Merck, Bogotá, Colombia). El proceso de reducción del GO se realizó con hojas de té verde (*C. sinensis*) adquiridas a granel en una tienda naturista local de Cali (Colombia). Además, se utilizaron ácido clorhídrico (Merck-Supelco, Bogotá, Colombia) y agua desionizada (Thermo Scientific, Bogotá, Colombia) para la purificación y el ajuste de pH.

2.2 Flujo metodológico general

El desarrollo experimental se organizó de acuerdo con el flujo metodológico presentado en la Figura 1. En primer lugar, se seleccionaron los materiales de partida: grafito, reactivos oxidantes y hojas de té verde. Posteriormente, se sintetizó el óxido de grafeno (GO) mediante el método de Hummers modificado y se preparó el extracto acuoso de té verde (*C. sinensis*). A continuación, se establecieron las condiciones de reducción mediante un diseño experimental Box-Behnken, considerando como factores el volumen de extracto, la temperatura y el tiempo de reacción. Bajo estas condiciones se llevó a cabo la reducción verde del GO y se obtuvieron las muestras RGO1 a RGO13. Finalmente, las muestras fueron caracterizadas mediante FTIR, DRX, SEM-EDS, DLS y XPS; se seleccionaron las muestras con mayores indicios de reducción y se realizó una evaluación biológica preliminar mediante el ensayo MTT en células Vero y PC3. Este flujo permitió analizar comparativamente la relación entre las condiciones de síntesis, las propiedades fisicoquímicas del material y la respuesta celular.

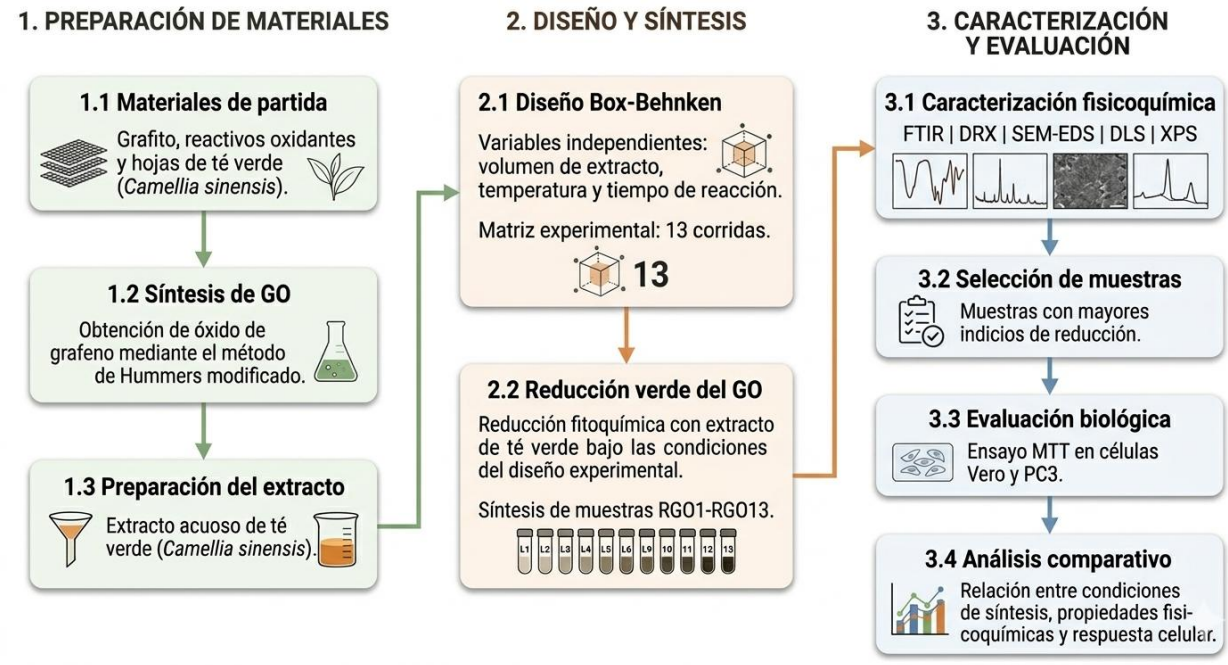


Figura 1. Flujo metodológico para la síntesis verde de rGO a partir de extracto de té verde
Fuente: elaboración propia.

2.3 Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las muestras de GO y rGO se obtuvieron mediante un microscopio LUMOS II FT-IR (Bruker Optics GmbH & Co. KG, Alemania), equipado con un detector TE-MCT y un accesorio ATR automatizado. Las muestras sólidas previamente secas fueron colocadas directamente sobre el cristal ATR y analizadas en el rango de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1}. Para cada muestra se registraron 16 escaneos con una resolución espectral de 2 cm^{-1}. Antes de cada medición se tomó un espectro de fondo bajo las mismas condiciones instrumentales. Los espectros obtenidos se utilizaron para identificar la disminución relativa de los grupos funcionales oxigenados, principalmente las bandas asociadas a O-H, C=O, C-O-C, COOH y C-O.

2.4 Análisis de difracción de rayos-X (DRX)

Este análisis se realizó con un equipo PAnalytical X'Pert PRO para caracterizar las muestras tanto de GO como de RGO. La radiación que se usó fue k (α1) 1,540598 Å y k (α2) 1,544426 Å proveniente de un ánodo de cobre (Cu), con un voltaje de aceleración de protones de 45 kV. El espaciado interlaminar y el tamaño de cristalita (dominio) fueron determinados por la ley de Bragg (1) y Debye-Scherrer (2), respectivamente; además, la deformación reticular se calculó mediante (3).

$$n\lambda = 2dsen\theta \tag{1}$$

$$D = \frac{k\lambda}{\beta\cos\theta} \tag{2}$$

$$\varepsilon = \frac{\beta}{4\tan\theta} \tag{3}$$

Donde el tamaño de cristalita (D) se calculó con la ecuación de Scherrer (2) empleando K = 0,9 y λ = 1,5406 Å. El número de láminas (n) se estimó como la relación entre el tamaño de cristalita y el espaciado interlaminar, n=D/d, redondeando al entero más cercano cuando aplica. Finalmente, la deformación reticular (ε) se calculó a partir de la ecuación (3), utilizando β (en radianes) y θ (en radianes).

2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología superficial de las muestras de GO y rGO se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para el análisis, las muestras secas fueron fijadas sobre cinta de carbono y recubiertas con una capa delgada de oro mediante pulverización catódica en un equipo Denton Vacuum Model Desk IV, operando a una presión de 50 mTorr durante 60 s. Las observaciones se realizaron en un microscopio JEOL JSM 6490LV, utilizando el modo de emisión de electrones secundarios y un voltaje de aceleración de 20 kV. Las micrografías obtenidas permitieron analizar cualitativamente la morfología, el grado de exfoliación, la rugosidad superficial y la presencia de aglomerados en las muestras.

2.6 Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS)

La composición elemental de las muestras de GO y rGO fue determinada mediante espectroscopía de energía dispersiva (EDS), acoplada al microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6490 LV. El microanálisis químico se efectuó con una sonda Oxford Instruments INCA PentaFETx3, con una resolución de 137 eV a 5,9 keV. Para cada muestra se seleccionaron regiones representativas para análisis a 200× y se determinaron los porcentajes atómicos de

carbono y de oxígeno. A partir de estos valores se calculó la relación C/O como indicador del grado relativo de reducción del GO.

2.7 Dispersión de luz dinámica (DLS)

El tamaño hidrodinámico y la distribución de tamaños de las muestras seleccionadas de rGO se evaluaron mediante dispersión dinámica de luz en un equipo Zetasizer Nano ZS. El análisis se realizó en las muestras RGO12, RGO11 y RGO8, seleccionadas por presentar los mayores indicios de reducción según los resultados preliminares de FTIR y SEM-EDS. Para cada medición, se dispersó aproximadamente 1,0 µg de muestra en 2,0 mL de isopropanol, lo que dio una concentración nominal de 0,5 µg/mL. Las dispersiones fueron sometidas a sonicación durante 2 h para favorecer la desaglomeración antes de la medición. Los ensayos se realizaron a 25 °C, con tres mediciones por muestra. Los resultados se reportaron como el tamaño de lámina promedio y el índice de polidispersidad.

2.8 Espectroscopía electrónica de rayos X (XPS)

Se realizó el ensayo en tres muestras seleccionadas al azar para estudiar la composición y la distribución de los constituyentes del rGO. Los ensayos se efectuaron en un espectrómetro fotoelectrónico de rayos X marca Specs, con un analizador PHOIBOS 150 2D-DLD, utilizando una fuente de Al-Kα (1486.7 eV). Las energías de paso estuvieron entre 100 eV y 20 eV para los espectros generales y los de alta resolución, respectivamente. Así mismo, el paso fue de 1 eV y 0,05 eV para los espectros generales y alta resolución. Finalmente, se realizaron 20 ciclos de medición de espectros de alta resolución y 5 de espectros generales. La concentración atómica de carbono y oxígeno se determinó a partir de los espectros de XPS mediante la corrección de las intensidades de los picos con los factores de sensibilidad relativa (S) asignados a cada orbital. Para ello, la intensidad medida (I) de cada pico se dividió entre su correspondiente factor de sensitividad, obteniéndose el valor corregido (I/S). Posteriormente, estos valores corregidos se normalizaron mediante la fracción relativa de cada elemento respecto de la suma total de todos ellos (I/S). La concentración atómica de cada especie se obtuvo aplicando (4), donde Ci corresponde a la concentración atómica del elemento i. De este modo, a partir de los picos C1s y O1s fue posible obtener el porcentaje de carbono y oxígeno en las muestras.

$$\mathrm{Ci}(\%) = \frac{\left(\frac{\mathrm{I}}{\mathrm{S}}\right) i}{\sum \left(\frac{I}{S}\right)} x100 \tag{4}$$

2.9 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico MTT, basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a cristales de formazán por acción de enzimas mitocondriales presentes en células metabólicamente activas [19]. Se utilizaron dos líneas celulares: PC3, derivada de adenocarcinoma de próstata metastásico [20], y Vero, correspondiente a células epiteliales de riñón de mono verde africano [21].

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con estreptomicina/penicilina al 2 %, AFT-B y suero fetal bovino (SFB) al 10 %, bajo condiciones controladas de 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO_2. Para el ensayo, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una confluencia celular de 100 células/µL, equivalente a un total de 10000 células por pozo, y se incubaron durante 24 h para favorecer la adhesión celular antes del tratamiento.

Posteriormente, las células fueron expuestas a las muestras GO, RGO7, RGO8, RGO9, RGO11 y RGO12 a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL durante 24 h. Finalizado el tratamiento, se adicionó medio de cultivo sin suplementar que contenía 10 % de MTT, preparado a partir de una solución madre de MTT de 5 mg/mL, y las placas se incubaron durante 3 h. Los cristales deformazán formados fueron solubilizados con DMSO y la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de microplacas.

2.10 Análisis estadístico

Los datos del diseño experimental Box-Behnken fueron analizados mediante el software Minitab 21.3® (2020), utilizando un modelo cuadrático que incluyó términos lineales, interacciones y términos cuadráticos para evaluar la influencia en las variables de respuesta. Para el caso de las pruebas de viabilidad celular, los resultados se expresaron como la media de tres réplicas ± la desviación estándar y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con un índice de confianza del 95 % y un nivel de significancia (α) de 0,05.

2.11 Diseño experimental Box-Behnken

Se empleó un diseño experimental Box-Behnken [15], con tres factores independientes: volumen de extracto acuoso de té verde, temperatura de reacción y tiempo de reacción. Los niveles evaluados fueron 10 mL, 35 mL y 60 mL para el volumen de extracto; 60, 75 y 90 °C para la temperatura; y 2,5, 5,25 y 8 h para el tiempo de reacción. El diseño fue generado mediante el software Minitab 21.3® (2020), obteniéndose 13 corridas experimentales, como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental Box-Behnken definido para las corridas de síntesis de rGO
Fuente: elaboración propia mediante Minitab 21.3®.

Muestra	Extracto de té (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
RGO1	60	75	2,5
RGO2	10	75	2,5
RGO3	35	60	2,5
RGO4	35	90	2,5
RGO5	60	90	5,25
RGO6	60	60	5,25
RGO7	35	75	5,25
RGO8	10	90	5,25
RGO9	10	60	5,25
RGO10	10	75	8
RGO11	60	75	8
RGO12	35	90	8
RGO13	35	60	8

Cada corrida se realizó utilizando 100 mL de suspensión de GO como volumen base, a la cual se adicionó el volumen correspondiente de extracto de té verde según el diseño experimental. La mezcla fue sometida a calentamiento y agitación bajo las condiciones de temperatura y tiempo establecidas para cada muestra. Las variables de respuesta consideradas para el análisis fueron los indicadores asociados al grado de reducción del material, principalmente la disminución de grupos oxigenados observada por FTIR, la relación C/O determinada por SEM-EDS y XPS, y los cambios estructurales evidenciados por DRX.

2.12 Síntesis del óxido de grafeno

La síntesis de óxido de grafeno se realizó mediante el método de Hummers modificado reportado por Zhou y colaboradores [22]. Para obtener óxido de grafeno, se pesaron 1,0 g de grafito, 0,5 g de nitrato de sodio ($NaNO_3$), 30 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 4,0 g de permanganato de potasio ($KMnO_4$) y 40 mL de agua Milli-Q. En primer lugar, se agregó en una campana de extracción el ácido sulfúrico y se colocó en un baño de hielo para evitar el calentamiento excesivo de la reacción. Posteriormente, se añadió el grafito en polvo bajo agitación con un agitador magnético a 70 rpm. Una vez homogeneizada la mezcla, se incorporó el nitrato de sodio manteniendo la temperatura baja, se agitó durante 30 min y de ahí se agregó el permanganato de potasio suavemente, controlando que no hubiera un incremento drástico de la temperatura. Posteriormente, se cambió el montaje a un baño de aceite y se calentó a una temperatura de 30 °C. El tiempo de reacción en el cual se efectuó la mezcla con el permanganato fue de 120 min. Seguidamente, se agregó agua Milli-Q suavemente evitando nuevamente el incremento drástico de la temperatura. Al verter toda el agua, se deja proceder la reacción a 100 °C durante 30 min [22]. Tras finalizar la etapa de reacción, se continuó con los lavados hasta conseguir un pH entre 5 y 6 con HCl 1,0 M, utilizando una centrífuga Hermle Z206A (Alemania) a 6000 rpm durante 20 min.

Después de alcanzar el pH deseado, la muestra se secó a 50 °C durante 24 h en un horno Binder FD56 (Alemania). Finalmente, se obtuvo un material laminar, el cual se sometió a una reducción mecánica del tamaño de las láminas mediante fricción con espátula de acero inoxidable, y luego se empacó antes de su procesamiento. Este material se dispersó en un litro de agua destilada, manteniendo una relación de 1,0 gramo de óxido de grafito por cada litro de agua. La suspensión resultante se sometió a sonicación durante una hora con un equipo de ultrasonido Branson 2800 (EE. UU.) para promover la exfoliación del óxido de grafeno. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1000 rpm durante 30 min, separando el sobrenadante, que contenía el óxido de grafeno exfoliado, de los sólidos residuales, que son el óxido de grafito no exfoliado. El sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitados y se secó en un horno a 50 °C durante 24 h, obteniendo el óxido de grafeno (GO) sólido (Figura 2).

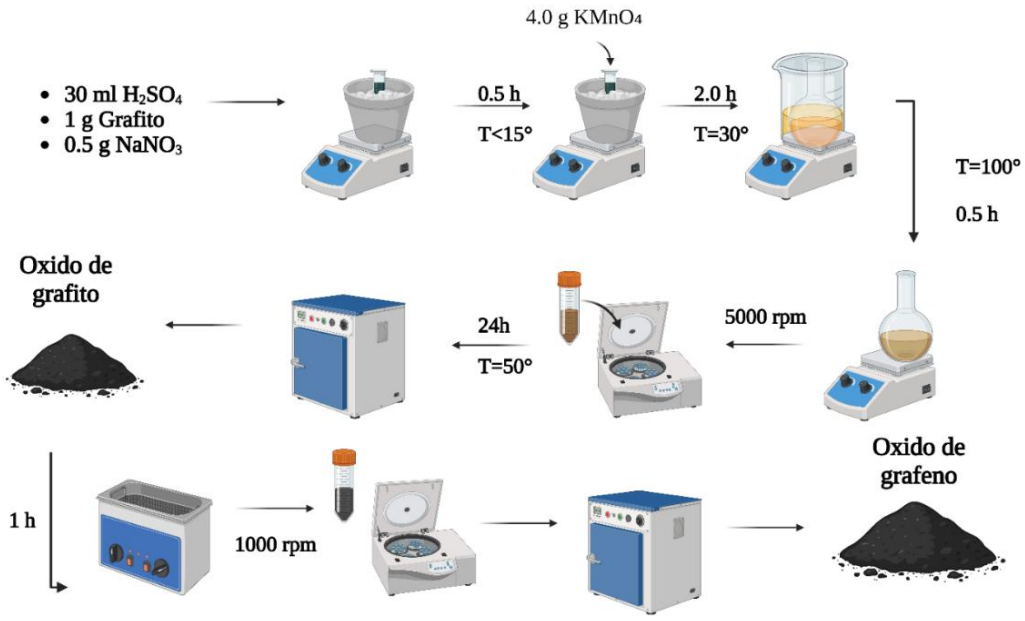


Figura 2. Esquema metodológico del proceso de síntesis del GO. Fuente: elaboración propia.

2.13 Extracción de té verde

Se preparó una suspensión de hojas de té verde secas (60 g/L), adquiridas en Saludable Tentación (tienda local de alimentos orgánicos y naturales a granel), en Santiago de Cali, Colombia. Las hojas se utilizaron enteras, sin molerlas. Para la preparación del extracto, se añadieron 60 g de material a 1 L de agua desionizada; la mezcla se calentó a 80 °C durante 1 h bajo agitación constante. Posteriormente, el extracto caliente se filtró al vacío a través de un embudo Büchner con papel de filtro para retirar el residuo sólido; el extracto acuoso obtenido (filtrado) se almacenó en botellas de vidrio ámbar a 4 °C hasta su uso [23].

2.14 Síntesis de óxido de grafeno reducido

El rGO se sintetizó mediante el método propuesto por Wang y colaboradores [24], variando los factores de cada muestra en el diseño experimental, como se observa en la Tabla 1. Una vez sintetizado el GO, se procedió a reducirlo. Para iniciar, se preparó una suspensión de 0,25 g de óxido de grafeno en 500 ml de agua destilada. Posteriormente, se disponen 100 ml de la suspensión de GO y la cantidad de extracto de té verde en un beaker, el cual se deposita en una plancha a una temperatura y un tiempo estimados según el número de la muestra. Luego de completar el tiempo de reacción, la solución de rGO reducida con té verde fue filtrada al vacío, lavada y secada en un horno a 50 °C (ver Figura 3).

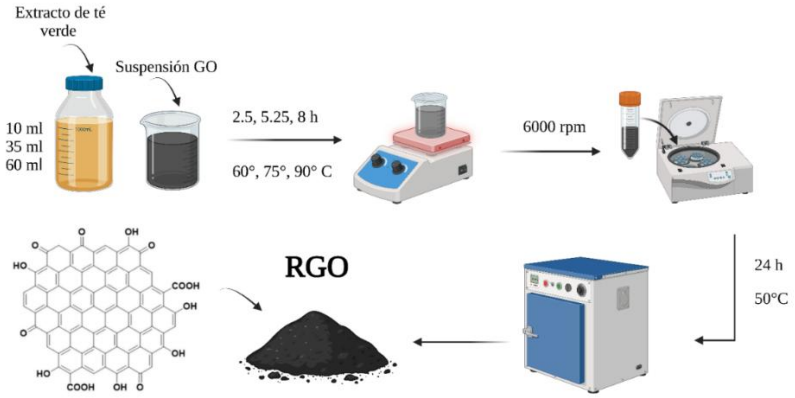


Figura 3. Esquema metodológico para la síntesis de RGO. Fuente: elaboración propia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En los espectros FTIR de las muestras de GO y rGO se identificaron bandas características asociadas a grupos funcionales oxigenados presentes en la superficie del óxido de grafeno. En todos los casos, la señal observada entre 3306 cm^{-1} y 3410 cm^{-1} se atribuye principalmente a la vibración de tensión de los grupos hidroxilo OH, asociados a grupos oxigenados superficiales y a moléculas de agua adsorbidas o intercaladas entre las láminas de GO. Asimismo, las bandas ubicadas entre 2890 cm^{-1} y 2937 cm^{-1} se relacionan con vibraciones CH, mientras que las señales cercanas a 1580-1634 cm^{-1} corresponden a vibraciones C=C de dominios carbonosos sp^2. También se observaron bandas entre 1314 cm^{-1}, y 1406 cm^{-1}, asociadas a vibraciones C-O-C de grupos epoxi; entre 1223 cm^{-1}, y 1242 cm^{-1}, relacionadas con grupos carboxílicos o enlaces C-O; y entre 1040 cm^{-1}, y 1054 cm^{-1}, correspondientes a vibraciones C-O [25]. La presencia de estas bandas confirma la oxidación del grafito y la incorporación de grupos funcionales oxigenados en el GO, lo cual es

consistente con lo reportado en estudios recientes sobre GO y rGO obtenidos mediante rutas químicas, térmicas, microbianas y verdes [26].

En la Figura 4 se presentan los espectros FTIR de los diferentes GO's sintetizados usando un tiempo de reacción de 2,5 h. En este grupo se observa que, con excepción de la muestra RGO4, los demás materiales conservan bandas intensas a 3320 cm^{-1}, y 1054 cm^{-1}, asociadas a las vibraciones de los grupos O-H y C-O, respectivamente. La persistencia de estas señales sugiere que, a menores tiempos de reacción, la reducción del GO fue limitada, independientemente de las variaciones en el volumen del extracto y en la temperatura. Este comportamiento evidencia que el tiempo de reacción resulta ser una variable relevante en el diseño Box-Behnken, por cuanto los tiempos bajos no favorecieron lo suficiente la eliminación de grupos oxigenados.

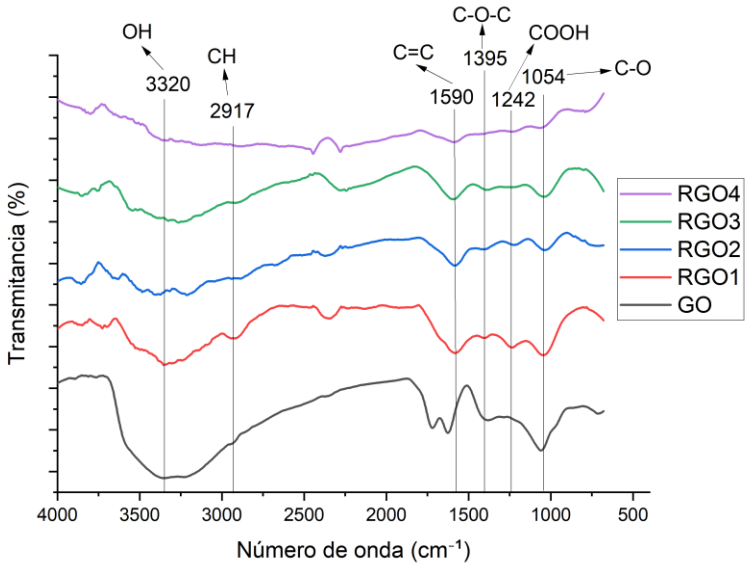


Figura 4. Espectros FTIR de las muestras a 2,5 h de tiempo de reacción. Fuente: elaboración propia.

En la Figura 5 se presentan las muestras obtenidas con un tiempo intermedio de reacción de 5,25 h. En comparación con las muestras sintetizadas durante 2,5 h, se observa una disminución parcial de la intensidad de algunas bandas oxigenadas, especialmente las asociadas a los enlaces O-H y C-O. Este comportamiento sugiere una reducción progresiva del GO a medida que aumenta el tiempo de contacto entre el material oxidado y los compuestos reductores del extracto de té verde. Sin embargo, la permanencia de señales correspondientes a grupos oxigenados indica que el proceso no produjo una reducción completa, lo cual es una característica común en síntesis verdes de rGO, en las que los metabolitos naturales actúan como agentes reductores suaves y estabilizantes [27].

En la Figura 6 se presentan las muestras sintetizadas con un tiempo de reacción de 8 h. En estos espectros se observó una menor intensidad de las bandas ubicadas alrededor de 3325 cm^{-1}, 1412 cm^{-1}, 1223 cm^{-1}, y 1040 cm^{-1}, correspondientes a las vibraciones de los grupos O-H, C-O-C, COOH/C-O y C-O, respectivamente. Esta disminución fue más evidente en la muestra RGO12, lo que implica una mayor remoción relativa de grupos funcionales oxigenados en comparación con el GO de partida. Tomando como base el diseño Box-Behnken, este resultado indica que la combinación de un mayor tiempo de reacción con una temperatura elevada favoreció la reducción del GO, probablemente por el incremento en la interacción entre los grupos oxigenados del GO y los compuestos fenólicos del extracto de té verde.

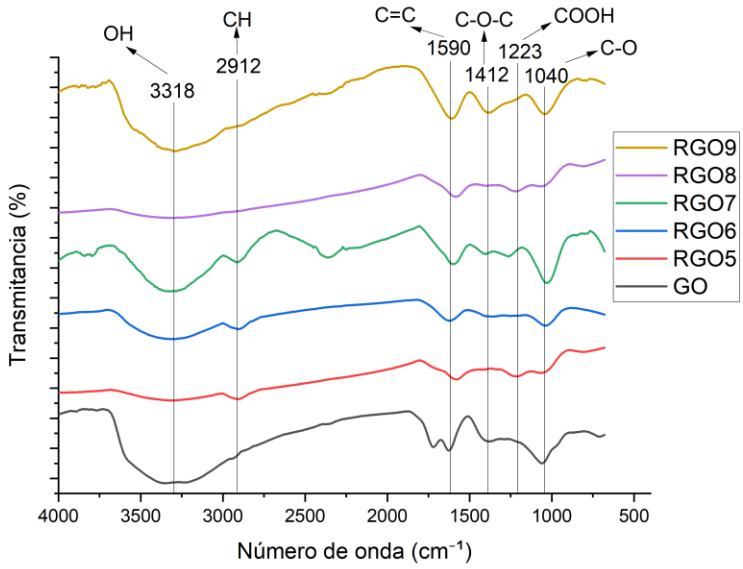


Figura 5. Espectros FTIR de las muestras a 5,25 h de tiempo de reacción. Fuente: elaboración propia.

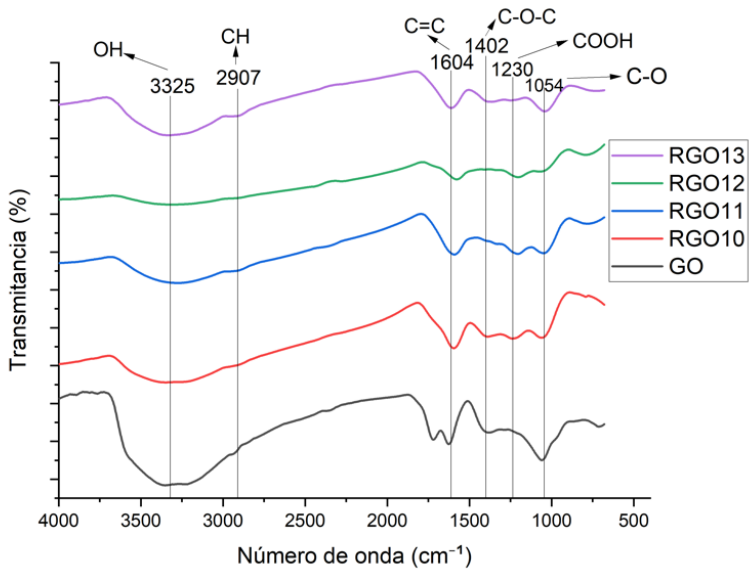


Figura 6. Espectros FTIR de las muestras a 8 h de tiempo de reacción. Fuente: elaboración propia.

En la Figura 7 se comparan las muestras con el mejor comportamiento observado por FTIR. En particular, las muestras RGO12, RGO11 y RGO8 presentaron una disminución marcada en la intensidad de las bandas asociadas a grupos oxigenados, principalmente en las regiones de 3300-3600 cm^{-1}, 1300-1340 cm^{-1} y 1040-1130 cm^{-1}. Esta disminución indica una reducción parcial del GO y sugiere la eliminación o transformación de grupos hidroxilo, epoxi y carboxilo, así como de enlaces C-O durante el proceso de síntesis verde. En la literatura se ha reportado que la reducción de GO hacia rGO suele manifestarse en FTIR mediante la atenuación de bandas oxigenadas y la conservación o recuperación parcial de las señales asociadas a dominios carbonosos C=C [26], [28].

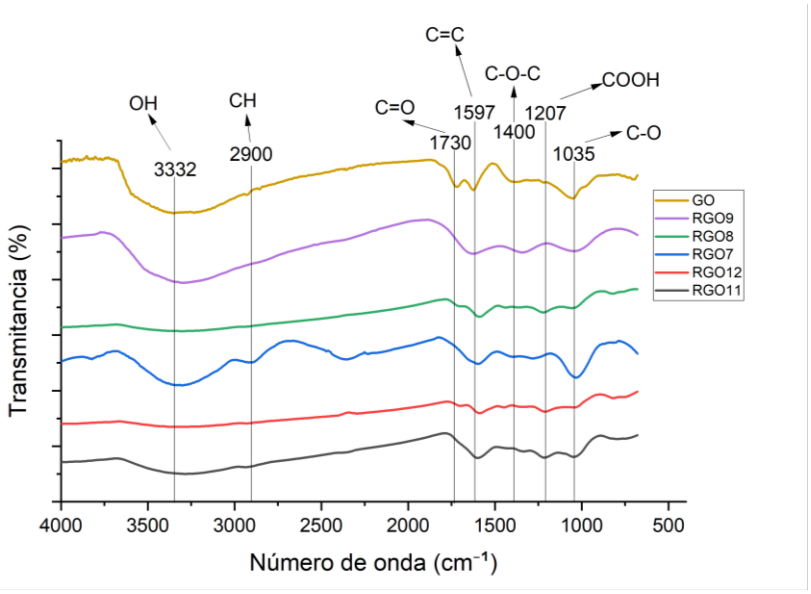


Figura 7. Espectros FTIR de las muestras con el mejor comportamiento observado
Fuente: elaboración propia.

La mayor reducción observada en RGO12, RGO11 y RGO8 puede atribuirse a las condiciones experimentales del diseño Box-Behnken. RGO12 y RGO11 fueron obtenidas con tiempos de reacción de 8 h, mientras que RGO8 fue sintetizada a 90 °C durante 5,25 h. Esto sugiere que tanto el incremento del tiempo como el aumento de la temperatura favorecen la reducción del GO cuando se emplea extracto de té verde como agente reductor [13]. No obstante, la persistencia de bandas de oxígeno en todas las muestras confirma que el proceso no generó grafeno completamente reducido, sino rGO con funcionalización residual. Esta condición puede ser favorable para mantener la dispersabilidad y las posibles interacciones biológicas, ya que los grupos oxigenados superficiales influyen en la estabilidad coloidal y en las interacciones bio-nano de materiales basados en GO [27]. Sin embargo, también evidencia la necesidad de complementar el FTIR con técnicas como EDS y XPS para confirmar el cambio en la relación C/O.

En conjunto, los resultados de FTIR demuestran que el extracto acuoso de té verde promovió la reducción parcial del GO, evidenciada por la disminución de las bandas asociadas a grupos funcionales oxigenados. Además, el análisis comparativo de las corridas del diseño Box-Behnken permitió identificar que las condiciones de mayor tiempo de reacción y de temperatura elevada estuvieron asociadas a mayores indicios de reducción. Por tanto, el FTIR no solo confirmó cambios químicos en el material, sino que también aportó evidencia para relacionar las variables de síntesis con el grado relativo de reducción alcanzado en las muestras de rGO.

Sin embargo, el carácter multifactorial de este método de síntesis verde presenta limitaciones importantes. En primer lugar, la variabilidad química inherente a los lotes del extracto de té verde (influenciada por el origen o la temporada de la planta) restringe el control preciso y homogéneo sobre el grado de desoxigenación. En segundo lugar, aunque el diseño Box-Behnken optimiza el proceso a escala de laboratorio, la escalabilidad del sistema enfrenta desafíos técnicos; el incremento de volumen dificulta mantener la homogeneidad en la transferencia de masa y calor observada en condiciones controladas, lo que podría comprometer la reproducibilidad del rGO a gran escala.

3.2 Análisis de difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 8 se presentan los patrones de difracción de rayos X del óxido de grafeno (GO) y de las muestras de óxido de grafeno reducido (rGO) seleccionadas según el diseño experimental Box-Behnken. Esta técnica permitió evaluar los cambios estructurales generados

durante la reducción verde, especialmente mediante el desplazamiento del pico característico, la variación del espaciado interlaminar, el ensanchamiento de los picos y los cambios en el tamaño de cristalita [28]. El GO de partida presentó un pico característico en 2θ = 10,8°, correspondiente a un espaciado interlaminar de 0,816 nm. Este valor es consistente con la incorporación de grupos oxigenados y de moléculas de agua entre las láminas de grafeno durante la oxidación del grafito. Después del proceso de reducción, las muestras RGO7, RGO8, RGO9, RGO11 y RGO12 presentaron un desplazamiento del pico principal hacia ángulos mayores, entre 25,6° y 28,1°, como se observa en la Tabla 2, acompañado de una disminución del espaciado interlaminar hasta valores entre 0,318 nm y 0,347 nm. Este comportamiento indica la remoción parcial de grupos oxigenados e intercalantes, así como una aproximación entre las láminas de carbono, fenómeno reportado por otros autores como evidencia estructural de la transformación de GO a rGO [26], [29].

La disminución del espaciado interlaminar fue más marcada en RGO9, con un valor de 0,318 nm, seguida de RGO12, RGO8, RGO11 y RGO7. Sin embargo, este parámetro debe interpretarse junto con el ancho máximo a media altura (FWHM), el tamaño de cristalita y la deformación reticular, ya que una menor distancia interlaminar no implica necesariamente una estructura más ordenada [30]. En este sentido, la muestra RGO9 presentó el mayor FWHM y la mayor deformación reticular (21,9 %), lo que sugiere una estructura más defectuosa, con dominios cristalinos más pequeños y un mayor desorden estructural. Este resultado puede asociarse con la formación de subdominios de carbono más pequeños durante la remoción de grupos oxigenados y con el reordenamiento incompleto de las láminas tras la reducción [31].

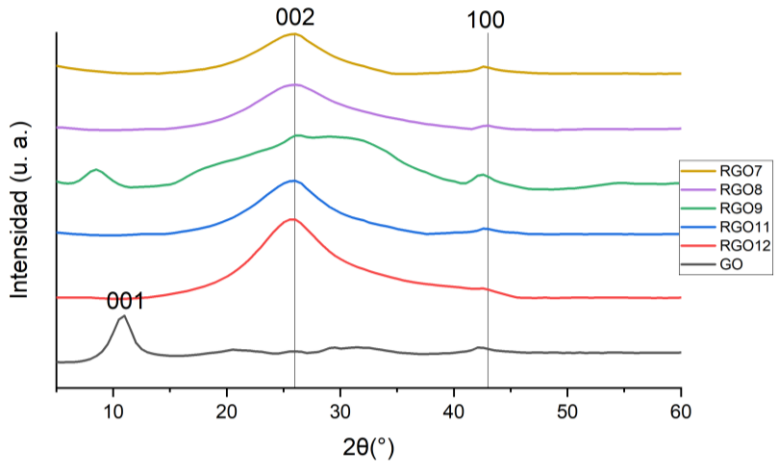


Figura 8. Patrones de difracción de rayos X de las muestras de GO y RGO. Fuente: elaboración propia.

Tabla 2. Parámetros característicos obtenidos a partir del DRX de las muestras de GO y rGO Fuente: elaboración propia.

Muestra	FWHM (β)	2θ (°)	Espaciado interlaminar (d) (nm)	Cristalita (D) (nm)	Número de láminas (n) (nm)	Deformación reticular (%)
GO	1,4	10,8	0,816	5,43	7	6,8
7	6,2	25,6	0,347	1,30	4	12,5
8	6,3	26,0	0,342	1,29	4	12,4
9	11,9	28,1	0,318	0,69	2	21,9
11	5,4	26,0	0,342	1,50	4	10,7
12	8,3	26,2	0,340	0,97	3	16,4

El tamaño de cristalita calculado mediante la ecuación de Debye-Scherrer disminuyó de 5,43 nm para el GO a 1,30, 1,29, 0,69, 1,50 y 0,97 nm para RGO7, RGO8, RGO9, RGO11 y RGO12, respectivamente. Esta disminución indica que la reducción verde no restauró por completo una estructura grafítica ordenada, sino que generó dominios más pequeños y defectuosos, característicos de materiales del tipo rGO [32]. Este comportamiento coincide con lo descrito en revisiones recientes, en las que se señala que el rGO suele presentar una estructura parcialmente restaurada, con dominios sp^2 recuperados, defectos residuales y grupos oxigenados remanentes [32], [33], [34].

Desde el punto de vista del diseño Box-Behnken, los resultados mostraron que las condiciones de síntesis influyeron en la organización estructural del material. La muestra RGO12, que fue obtenida con 35 mL de extracto, a 90 °C durante 8 h, presentó un espaciado interlaminar de 0,340 nm y un tamaño de cristalita de 0,97 nm, lo que sugiere una reducción significativa, acompañada de defectos estructurales, Mientras que RGO11, sintetizada con 60 mL de extracto, a 75 °C y durante 8 h, mostró una menor deformación reticular (10,7 %) y un tamaño de cristalita mayor (1,50 nm) que RGO12 y RGO9, lo que indica que se alcanzó una estructura relativamente menos distorsionada. Por otra parte, RGO8, obtenida a 90 °C durante 5,25 h, también presentó un espaciado interlaminar bajo (0,342 nm), lo que respalda la importancia de la temperatura como variable que favorece la reducción del GO. Estos resultados sugieren que tanto el tiempo de reacción como la temperatura contribuyeron a la remoción de grupos oxigenados y al reordenamiento parcial de las láminas, aunque su efecto también considera la combinación con el volumen del extracto.

La presencia de un pico de baja intensidad alrededor de 43° puede asociarse con dominios carbonosos desordenados, apilamiento turbostrático o regiones grafíticas residuales. En materiales basados en rGO, este tipo de señal se ha relacionado con la coexistencia de dominios grafitizados y regiones estructuralmente desordenadas, lo cual es común cuando la reducción no es completa y las láminas presentan defectos, arrugas o un apilamiento irregular. Por tanto, esta señal no se debe asumir como evidencia única de un proceso de reducción, sino como un indicio complementario de reorganización estructural y de desorden residual [35].

En conjunto, los resultados de DRX confirmaron que la reducción con el extracto de té verde produjo cambios estructurales importantes en comparación al GO de partida. El desplazamiento del pico principal hacia mayores ángulos de 2θ, la disminución del espaciado interlaminar y la reducción del tamaño de cristalita evidenciaron una transformación parcial de GO en rGO. No obstante, el ensanchamiento de los picos y la deformación reticular observada en algunas muestras indicaron que el proceso generó materiales con defectos y un ordenamiento parcial, lo cual es consistente con rutas verdes de reducción. Estos resultados complementan los hallazgos de FTIR, EDS y XPS y permiten relacionar las variables del diseño Box-Behnken con los cambios estructurales observados en las muestras de rGO.

3.3 Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS)

Los resultados EDS de las muestras de GO y rGO se presentan en la Tabla 3, mientras que las zonas analizadas se muestran en la Figura 9. Esta técnica permitió estimar los porcentajes atómicos de carbono y de oxígeno y calcular la relación C/O como indicador complementario del grado de reducción del GO. Aunque EDS no identifica directamente los tipos de enlaces químicos, sí permite comparar la disminución relativa de oxígeno después del proceso de reducción.

El GO de partida presentó 45,89 % de carbono y 44,44 % de oxígeno, con una relación C/O de 1,03, lo que confirma la incorporación de grupos oxigenados durante la oxidación del grafito [36]. Tras la reducción verde con extracto acuoso de té verde, todas las muestras de rGO mostraron una disminución del contenido de oxígeno y un incremento de la relación C/O. Las mayores reducciones relativas de oxígeno se observaron en RGO11, RGO12, RGO9, RGO8 y RGO7, con valores de 18,81 %, 16,98 %, 16,29 %, 14,62 % y 14,44 %, respectivamente. De igual

manera, las mayores relaciones C/O se registraron en RGO11, RGO12, RGO7, RGO8 y RGO9, con valores de 1,76, 1,72, 1,61, 1,61 y 1,58, respectivamente.

Tabla 3. Porcentajes atómicos obtenidos por EDS, relación C/O y reducción de oxígeno
Fuente: elaboración propia.

Muestra	C (%)	O (%)	Relación C/O	Reducción O_2 (%)
GO	45,89	44,44	1,03	
RGO1	57,82	38,46	1,53	13,45
RGO2	59,75	39,78	1,50	10,48
RGO3	58,01	39,69	1,46	10,68
RGO4	55,76	41,10	1,34	7,51
RGO5	60,39	39,61	1,53	10,86
RGO6	52,47	39,44	1,33	11,25
RGO7	60,60	38,02	1,61	14,44
RGO8	61,00	37,94	1,61	14,62
RGO9	58,44	37,20	1,58	16,29
RGO10	59,31	39,88	1,50	10,25
RGO11	63,11	36,08	1,76	18,81
RGO12	62,84	36,89	1,72	16,98
RGO13	55,42	43,31	1,30	2,54

Estos resultados evidencian una reducción parcial del GO, asociada a la remoción de grupos funcionales oxigenados y al aumento relativo del contenido de carbono. Este comportamiento concuerda con estudios recientes sobre la síntesis verde de rGO, en los que el aumento de la relación C/O se ha asociado con la eliminación parcial del oxígeno y la recuperación de dominios carbonosos [28], [37]. Además, los resultados de EDS son coherentes con los análisis FTIR y DRX, en los que las muestras RGO11, RGO12 y RGO8 presentaron una disminución de las bandas de oxígeno y cambios estructurales asociados a la reducción.

Desde la perspectiva del diseño Box-Behnken, las muestras con mayores indicios de reducción se observaron principalmente en condiciones de tiempos de reacción prolongados o de temperaturas elevadas. RGO11 se obtuvo con 60 mL de extracto, 75 °C y 8 h, mientras que RGO12 se sintetizó con 35 mL de extracto, 90 °C y 8 h. Por su parte, RGO8 se obtuvo a 90 °C durante 5,25 h. Sin embargo, RGO13, pese a haber sido sintetizada durante 8 h, presentó una relación C/O baja de 1,30, lo que indica que el tiempo por sí solo no garantiza una mayor reducción. Esto sugiere que la eficiencia del proceso depende de la interacción entre el volumen de extracto, la temperatura y el tiempo de reacción.

En conjunto, el análisis EDS confirma que el extracto de té verde provocó una disminución relativa del oxígeno en las muestras de rGO. No obstante, debido a las limitaciones de EDS para cuantificar elementos ligeros y diferenciar grupos funcionales específicos, estos resultados deben interpretarse como evidencia comparativa y complementarse con técnicas como FTIR y XPS [38].

3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a diferentes aumentos (100×, 200×, 500× y 1000×) se presentan en la Figura 10. En términos generales, las muestras de rGO exhibieron una morfología laminar, con láminas delgadas, bordes bien definidos, pliegues, arrugas superficiales y zonas de apilamiento. Estas características son típicas de materiales basados en GO/rGO, en los que los procesos de oxidación, exfoliación

y reducción generan láminas corrugadas, parcialmente superpuestas y con diferentes grados de agregación [39], [40], [41].

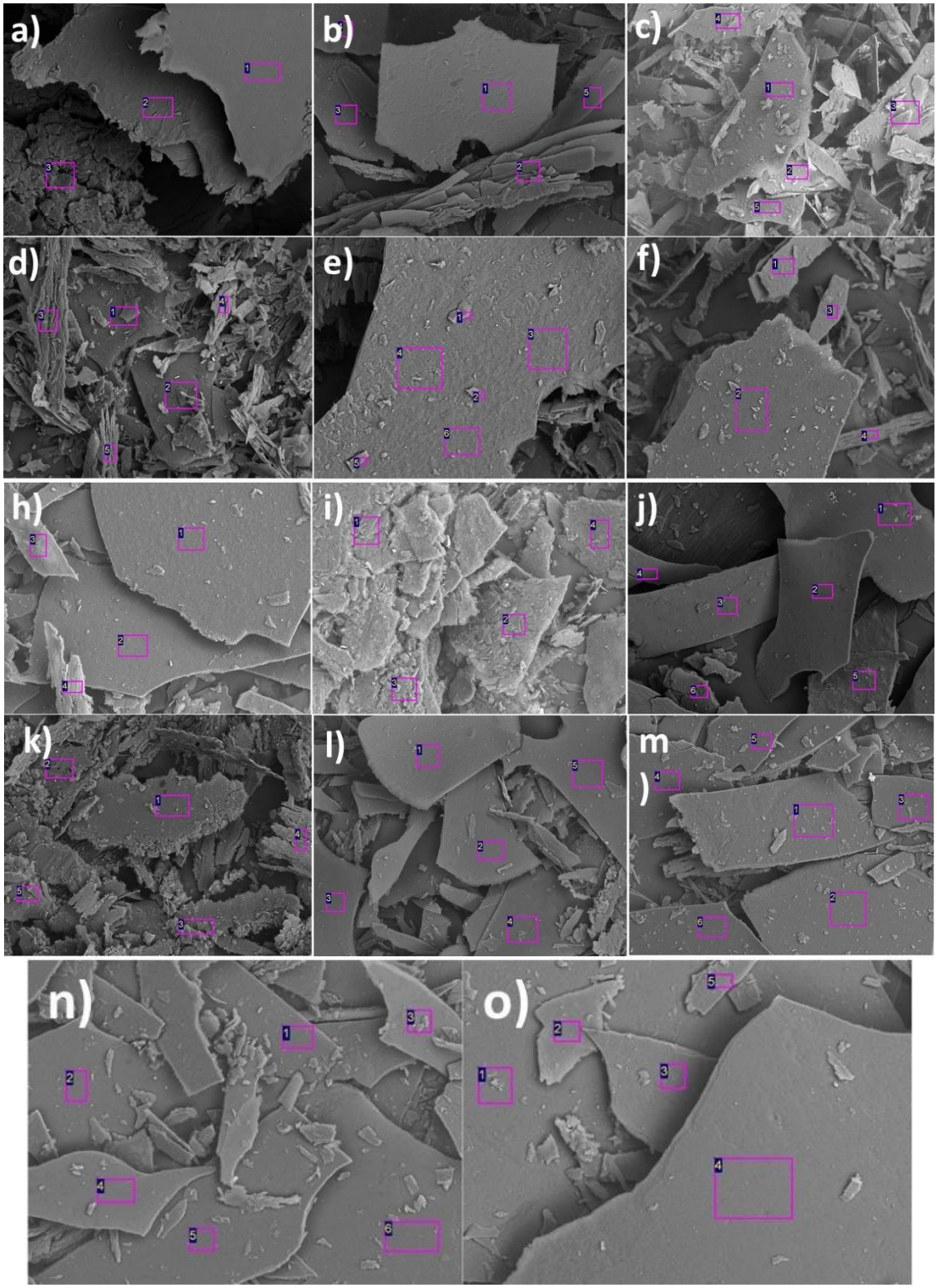
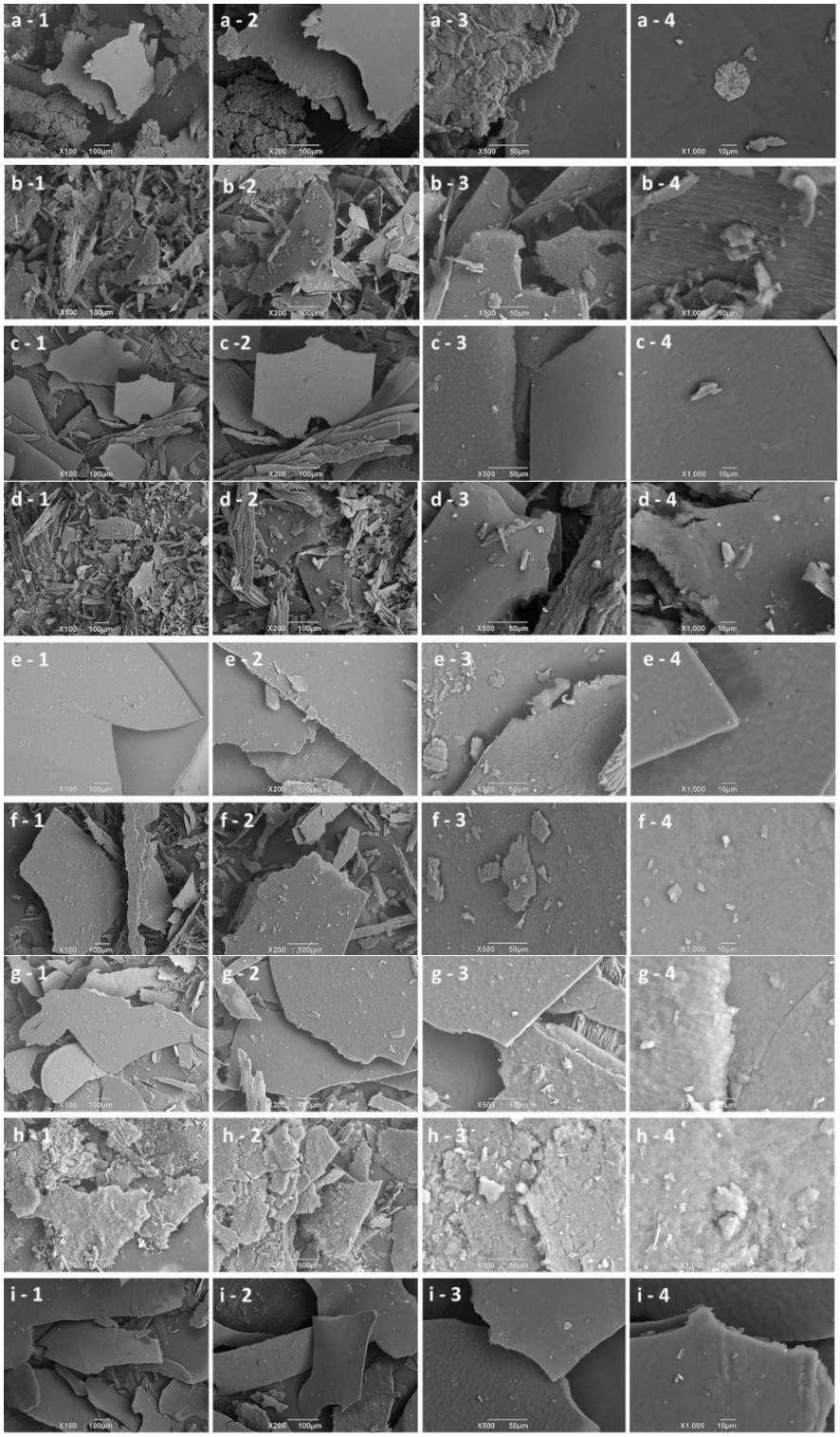


Figura 9. Micrografías SEM-EDS de: a) GO; b) RGO1; c) RGO2; d) RGO3; e) RGO4; f) RGO5; g) RGO6; h) RGO7; i) RGO8; j) RGO9; k) RGO10; l) RGO11; m) RGO12; n) RGO13. Cada muestra a 200×
Fuente: elaboración propia.


a - 1
a - 2
a - 3
a - 4
b - 1
b - 2
b - 3
b - 4
c - 1
c - 2
c - 3
c - 4
d - 1
d - 2
d - 3
d - 4
e - 1
e - 2
e - 3
e - 4
f - 1
f - 2
f - 3
f - 4
g - 1
g - 2
g - 3
g - 4
h - 1
h - 2
h - 3
h - 4
i - 1
i - 2
i - 3
i - 4

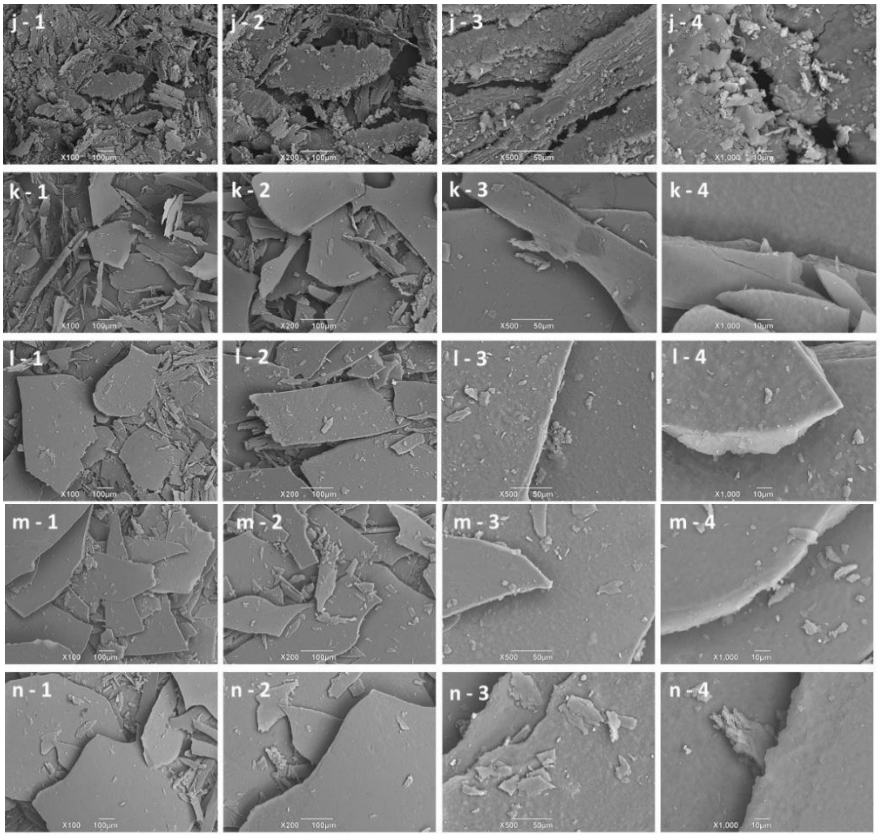


Figura 10. Micrografía SEM de las muestras: a) GO; b) RGO1; c) RGO2; d) RGO3; e) RGO4; f) RGO5; g) RGO6; h) RGO7; i) RGO8; j) RGO9; k) RGO10; l) RGO11; m) RGO12; n) RGO13. Cada muestra a diferentes aumentos: 1-100×; 2-200×; 3-500×; 4-1000×; Fuente: elaboración propia.

Al comparar el GO con las muestras reducidas, se observan cambios morfológicos asociados al proceso de reducción verde. El GO presentó una apariencia laminar menos definida, mientras que las muestras de rGO mostraron bordes más evidentes, superficies rugosas y una mayor presencia de pliegues. Este comportamiento puede relacionarse con la eliminación parcial de grupos oxigenados y de agua interlamelar, lo que favoreció el acercamiento y el reagrupamiento de las láminas. Este análisis es coherente con los resultados de FTIR, en los que se observó una disminución de las bandas oxigenadas. Así mismo, con los difractogramas encontrados se evidenció una reducción del espaciado interlaminar, y con los datos del EDS se registró un incremento de la relación C/O.

En cuanto al diseño Box-Behnken, las muestras con mayor tiempo de reacción o las expuestas a temperaturas elevadas mostraron características morfológicas compatibles con una reducción parcial más marcada. En particular, RGO11, RGO12 y RGO8 presentaron cambios que concuerdan con los indicios más fuertes de reducción observados por FTIR y EDS. RGO11 fue sintetizada con 60 mL de extracto, a 75 °C y durante 8 h; RGO12, con 35 mL de extracto, a 90 °C y durante 8 h; y RGO8, con 10 mL de extracto, a 90 °C y durante 5,25 h. Estos resultados sugieren que el tiempo de reacción y la temperatura favorecen la modificación morfológica del material, aunque el efecto final depende de la combinación de las tres variables del diseño experimental.

La presencia de arrugas y pliegues en las láminas de rGO puede explicarse por el reordenamiento estructural posterior a la reducción del GO. Durante este proceso, la remoción parcial de grupos oxigenados reduce la repulsión entre láminas y puede inducir reagrupamiento, colapso parcial o apilamiento irregular. Estudios recientes sobre rGO obtenido por rutas verdes han reportado morfologías similares, caracterizadas por láminas delgadas, rugosas, arrugadas y parcialmente aglomeradas, lo cual se atribuye a la reducción

parcial del GO y a la interacción con compuestos orgánicos presentes en los extractos naturales [31], [42].

3.5 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) se empleó para estimar el tamaño hidrodinámico aparente (tamaño de lámina) y la polidispersidad de las muestras RGO12, RGO11 y RGO8, seleccionadas por presentar mayores indicios de reducción en los análisis FTIR, DRX y EDS. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Tamaños de lámina y polidispersidad obtenidos mediante la técnica DLS
Fuente: elaboración propia.

Muestra	Tamaño de lámina (nm)	Polidispersidad
RGO12	1094	0,251
RGO11	1302	1,000
RGO8	1241	0,270

Las muestras RGO12, RGO11 y RGO8 presentaron tamaños hidrodinámicos de 1094 nm, 1302 nm y 1241 nm, respectivamente. Como era de esperarse, estos valores indicaron la presencia de estructuras laminares y agregados en suspensión, lo cual es común en materiales de tipo rGO debido a las interacciones π-π y las fuerzas de van der Waals entre láminas parcialmente reducidas. A diferencia del GO, cuya mayor cantidad de grupos oxigenados favorece la dispersión acuosa, la reducción parcial, disminuye la hidrofilicidad del material y puede promover el reagrupamiento de las láminas [43], [44].

La muestra RGO12 presentó el menor tamaño hidrodinámico aparente (1094 nm) y una polidispersidad de 0,251, lo que podría indicar una dispersión relativamente homogénea en comparación con la de RGO11. De igual manera, RGO8 mostró un tamaño de 1241 nm y una polidispersidad de 0,270, lo que implica una distribución moderadamente uniforme. En contraste, RGO11 presentó el mayor tamaño hidrodinámico (1302 nm) y una polidispersidad de 1000, lo que evidencia una distribución amplia de tamaños y una mayor tendencia a la aglomeración.

En cuanto a la aplicación del diseño Box-Behnken, los resultados sugieren que las condiciones de síntesis influyeron no solo en el grado de reducción, sino también en el comportamiento coloidal del material. RGO12, sintetizada con 35 mL de extracto, a 90 °C durante 8 h, presentó el menor tamaño y baja polidispersidad, lo que puede asociarse con una reducción más efectiva y una dispersión relativamente estable. En cambio, RGO11, obtenida con 60 mL de extracto, 75 °C y 8 h, mostró un mayor tamaño y una alta polidispersidad, posiblemente debido a una mayor presencia de compuestos orgánicos residuales del extracto o a un mayor reagrupamiento de las láminas tras la reducción.

Estos resultados son coherentes con lo reportado en estudios recientes, en los que se ha señalado que la estabilidad coloidal de los materiales GO/rGO depende de la funcionalización superficial, el grado de reducción, la presencia de estabilizantes y las condiciones del medio de dispersión. En el caso de rutas verdes, los metabolitos presentes en los extractos vegetales pueden actuar simultáneamente como agentes reductores y estabilizantes; sin embargo, si la reducción aumenta la hidrofobicidad del material, también puede favorecer la agregación parcial de las láminas [42], [45], [46].

3.6 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

El análisis XPS permitió evaluar la composición química superficial del GO y de las muestras RGO5 y RGO6 mediante espectros de barrido amplio y de alta resolución de C1s y O1s, como se muestra en las Figuras 11, 12, 13 y 14. A diferencia de EDS, que proporciona una estimación

elemental general, XPS permite analizar la composición superficial y diferenciar las contribuciones asociadas a los enlaces C-C/C=C, C-O y C=O, por lo que constituye una técnica clave para confirmar la reducción parcial del GO.

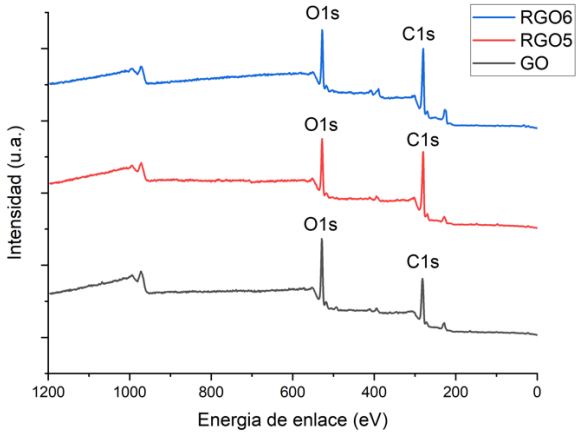


Figura 11. Espectro de barrido amplio de XPS de GO, RGO5 y RGO6. Fuente elaboración propia.

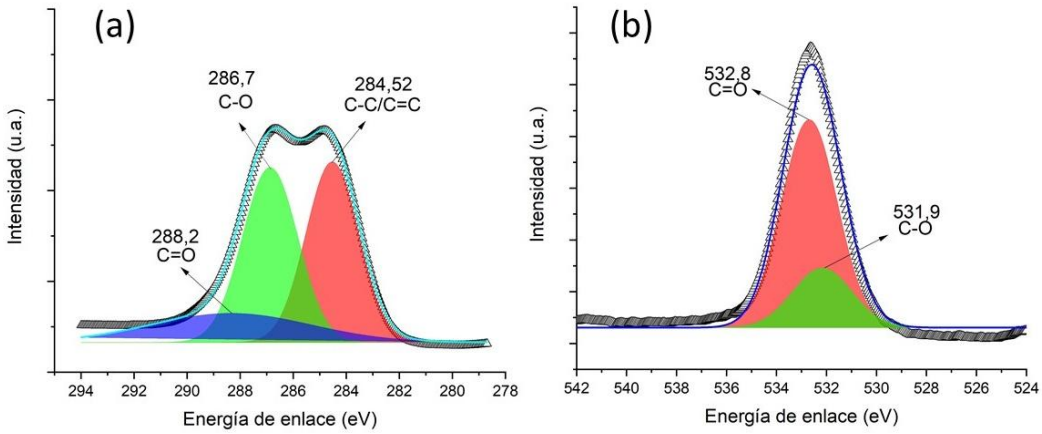


Figura 12. Espectros de XPS de alta resolución de: a) C1s y b) O1s del GO de partida
Fuente: elaboración propia.

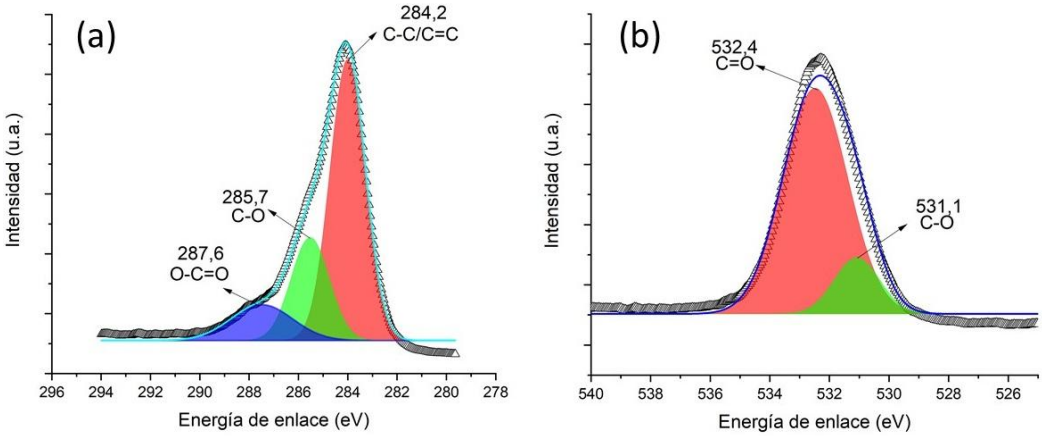


Figura 13. Espectros XPS de alta resolución de: a) C1s y b) O1s del RGO5
Fuente: elaboración propia.

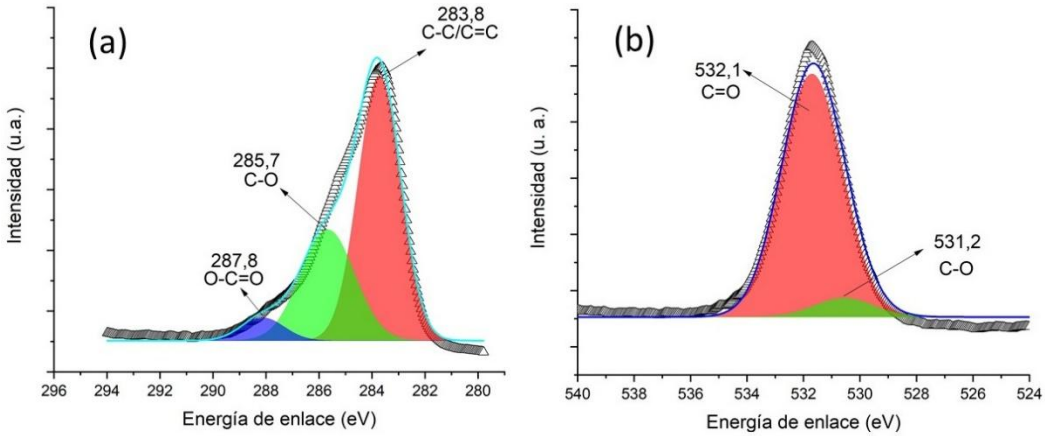


Figura 14. Espectros de XPS de alta resolución de: a) C1s y b) O1s del RGO6
Fuente: elaboración propia.

En el espectro de barrido amplio, el GO presentó 57,13 % de carbono y 42,87 % de oxígeno, con una relación C/O de 1,33. Después del proceso de reducción con extracto acuoso de té verde, RGO5 presentó 61,79 % de carbono y 38,21 % de oxígeno, mientras que RGO6 registró 61,88 % de carbono y 38,12 % de oxígeno. En consecuencia, la relación C/O aumentó de 1,33 para GO a 1,61 y 1,62 para RGO5 y RGO6, respectivamente, como se resume en la Tabla 5. Este incremento confirma una disminución relativa del oxígeno superficial y confirma la reducción parcial del GO, de manera similar a como se plantea en estudios recientes en los que el aumento de la relación C/O por XPS se asocia con la eliminación de grupos oxigenados y la recuperación parcial de dominios carbonosos [47], [48].

El análisis de alta resolución de C1s evidenció contribuciones alrededor de 284 eV, 286 eV y 288 eV, atribuidas a enlaces C-C/C=C, C-O y C=O, respectivamente. En comparación con el GO de partida, las muestras RGO5 y RGO6 presentaron una disminución de la intensidad relativa de las señales asociadas a grupos oxigenados, especialmente C-O y C=O. Este comportamiento indicó que los compuestos reductores presentes en el extracto de té verde promovieron la eliminación o la transformación parcial de grupos funcionales oxigenados. Resultados similares han sido reportados en procesos de reducción de GO monitoreados por XPS, donde la reducción se evidencia por la disminución de los enlaces C-O, C=O y O-C=O, junto con el aumento relativo de los enlaces C-C/C=C [49].

Tabla 5. Composiciones elementales de las muestras estudiadas mediante XPS
Fuente: elaboración propia.

GO						
Pico	Intensidad	Factor de sensitividad (S)	I/S	Concentración (%)	Relación C/O	
C1s	34758,88	1,00	34758,88	57,13	1,33	
O1s	76417,44	2,93	26081,30	42,87		
RGO5						
Pico	Intensidad	Factor de sensitividad (S)	I/S	Concentración (%)	Relación C/O	Reducción Oxígeno (%)
C1s	43271,54	1,00	43271,54	61,79	1,61	10,88
O1s	78388,97	2,93	26477,81	38,21		
RGO6						
Pico	Intensidad	Factor de sensitividad (S)	I/S	Concentración (%)	Relación C/O	Reducción Oxígeno (%)
C1s	42982,56	1,00	42982,56	61,88	1,62	11,08
O1s	77580,00	2,93	26477,81	38,12		

Por otra parte, en la región O1s, observada entre 540 eV y 524 eV, se calcularon las contribuciones de los grupos funcionales mediante una deconvolución espectral. En todas las muestras se identificaron dos participaciones principales en torno a 532 eV y 531 eV, atribuidas a los enlaces C=O y C-O, respectivamente. En las muestras RGO5 y RGO6 se observó una disminución de la intensidad relativa de estas señales, acompañada de ligeros desplazamientos de las bandas, lo que implica la eliminación o la transformación parcial de grupos oxigenados respecto al GO de partida [50], [51].

Con respecto al diseño Box-Behnken, las muestras RGO5 y RGO6 corresponden a condiciones con 60 mL de extracto y un tiempo intermedio de reacción de 5,2 h, pero difieren en la temperatura: RGO5 fue sintetizada a 90 °C y RGO6 a 60 °C. Aunque ambas muestras presentaron relaciones C/O muy similares por XPS, RGO6 mostró una relación ligeramente mayor (1,62) que la de RGO5 (1,61). Esta diferencia es pequeña, por lo que no debe interpretarse como evidencia concluyente de un efecto aislado de la temperatura. Más bien, los resultados sugieren que, bajo estas condiciones, el volumen de extracto y el tiempo de reacción fueron suficientes para inducir una reducción superficial comparable en ambas muestras.

El mecanismo de reducción puede asociarse con la presencia de polifenoles y catequinas en el extracto de té verde, entre los que se destacan la epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC) y sus respectivos galatos (ECG y EGCG). Estos compuestos contienen grupos fenólicos con capacidad antioxidante, que pueden participar en reacciones redox con los grupos oxigenados del GO, favoreciendo su transformación en rGO y convirtiéndose parcialmente en estructuras de tipo quinona. Este mecanismo ha sido propuesto en estudios previos sobre la reducción de GO mediante extractos de té verde y otros extractos vegetales [43], [52].

En conjunto, los resultados de XPS confirman la reducción parcial del GO mediante el extracto acuoso de té verde, evidenciada por el aumento de la relación C/O, la disminución del porcentaje superficial de oxígeno y la reducción de las señales asociadas a los enlaces C-O y C=O. Estos hallazgos complementan los resultados de FTIR, EDS y DRX y permiten concluir que el proceso de síntesis verde promovió la remoción parcial de grupos oxigenados, manteniendo una funcionalización residual característica de materiales del tipo rGO.

3.7 Ensayo de viabilidad celular MTT

Los resultados del ensayo MTT frente a células Vero se presentan en la Figura 15. En general, la mayoría de las muestras evaluadas presentaron baja citotoxicidad, incluso a la concentración elevada de 100 μg/mL, lo que sugiere una respuesta celular relativamente favorable frente a células no cancerígenas. Sin embargo, las muestras RGO11 y RGO12 presentaron una disminución marcada de la viabilidad a bajas concentraciones. En particular, RGO11 redujo la viabilidad celular hasta un 56,3 % a 10 μg/mL, mientras que RGO12 alcanzó valores cercanos a 44,5 % a 5 μg/mL. Este comportamiento indicó que, aunque el rGO obtenido mediante síntesis verde mostró baja citotoxicidad general, algunas condiciones de síntesis pueden generar materiales con mayor interacción biológica.

La respuesta observada en RGO11 y RGO12 puede relacionarse con sus características fisicoquímicas. Estas muestras presentaron mayores señales de reducción en los análisis FTIR y EDS, así como cambios estructurales evidenciados por DRX. La reducción parcial del GO modificó la cantidad de grupos oxigenados, la hidrofobicidad, la agregación y la interacción con membranas celulares, factores que pueden influir en la respuesta citotóxica [27]. Estudios recientes han señalado que la citotoxicidad de materiales GO/rGO depende de variables como el tamaño, grado de reducción, funcionalización superficial, dispersabilidad, concentración y tipo celular evaluado [45], [53], [54].

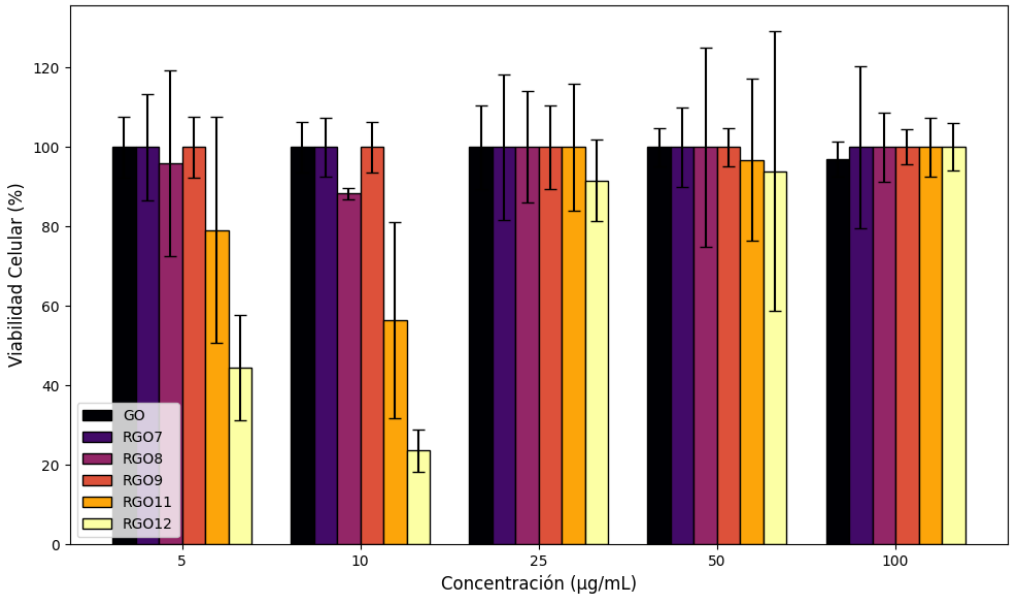


Figura 15. Ensayo MTT para analizar la citotoxicidad de las muestras GO de partida, RGO7, RGO8, RGO9, RGO11 y RGO12 frente a células Vero. Fuente: elaboración propia.

En las células PC3, los resultados de la Figura 16 evidenciaron una respuesta más irregular entre las muestras. Aunque de manera general se observó una viabilidad celular relativamente alta, la muestra RGO9 presentó una mayor reducción de la viabilidad en comparación con las demás muestras. Este comportamiento podría estar asociado con su mayor desorden estructural observado por DRX, donde RGO9 presentó una mayor deformación reticular y menor tamaño de cristalita. Dichas características pueden favorecer una mayor interacción con la membrana celular o inducir alteraciones metabólicas detectables mediante MTT [55]. No obstante, estos resultados deben interpretarse como una evaluación preliminar de viabilidad celular y no como evidencia concluyente de una actividad anticancerígena [56].

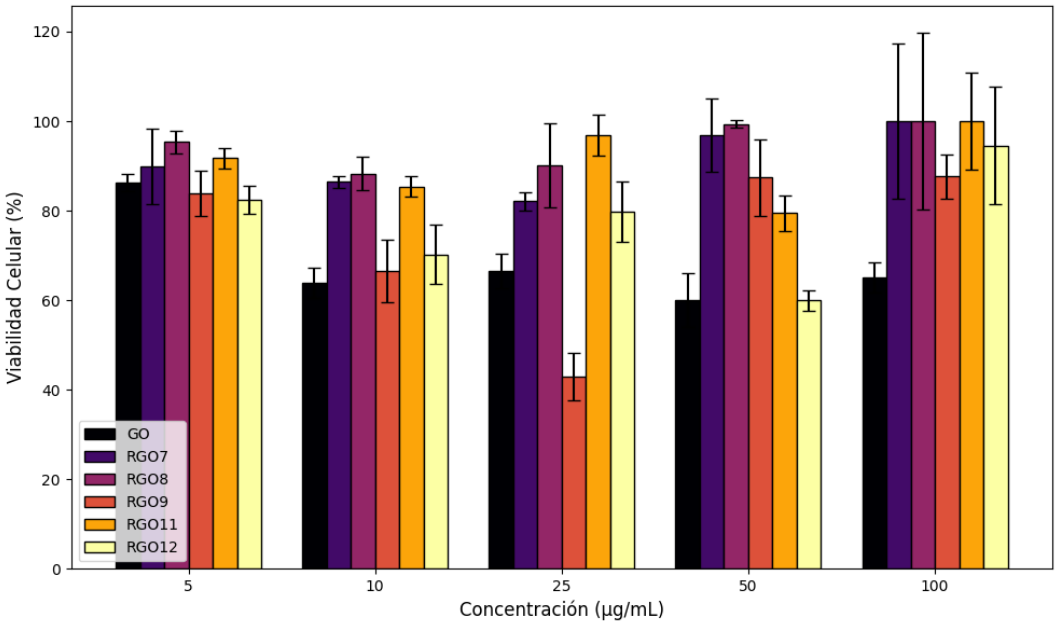


Figura 16. Ensayo MTT para analizar la citotoxicidad de las muestras GO de partida, RGO7, RGO8, RGO9, RGO11 y RGO12 frente a células PC3. Fuente: elaboración propia.

Con relación al diseño Box-Behnken, los resultados sugieren que las condiciones de síntesis influyeron no solo en el grado de reducción del GO, sino también en la respuesta biológica del material. Las muestras con mayor reducción o mayor desorden estructural, como RGO11, RGO12 y RGO9, fueron las que mostraron respuestas celulares más marcadas [57]. Esto indicó que parámetros como el tiempo de reacción, la temperatura y el volumen del extracto pueden modificar propiedades fisicoquímicas relevantes para la interacción célula-material. Estudios recientes sobre rGO verde han reportado que los materiales reducidos con extractos vegetales pueden presentar respuestas citotóxicas diferenciales entre células normales y cancerígenas, dependiendo de su composición, tamaño, funcionalización y condiciones de síntesis [16], [17], [18], [57], [58].

El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre las muestras evaluadas, con un valor de $p = 0,001$ tanto en células Vero como en PC3. Esto indica que al menos una de las muestras presentó una respuesta de viabilidad distinta de las demás. Sin embargo, los coeficientes de determinación obtenidos, $R^2 = 44,78$ % para Vero y $R^2 = 44,98$ % para PC3, sugieren que la variabilidad de la respuesta celular no puede explicarse únicamente por el tipo de muestra, sino que podrían intervenir otros factores, como la dispersión del material, la agregación, la sedimentación, la concentración efectiva en contacto con las células y la heterogeneidad superficial.

En algunas muestras se observó una respuesta no lineal en función de la concentración, compatible con un posible comportamiento hormético [59]. Este tipo de respuesta dosis-dependiente puede observarse en sistemas biológicos cuando una sustancia ejerce efectos distintos según su concentración. Sin embargo, para confirmar este fenómeno sería necesario aumentar el número de concentraciones, incluir más réplicas y aplicar modelos específicos de análisis dosis-respuesta, ya que la interpretación de respuestas no lineales requiere un diseño estadístico adecuado [60].

En conjunto, el ensayo MTT evidenció que la mayoría de las muestras de rGO presentaron baja citotoxicidad frente a las células Vero y una respuesta variable frente a las células PC3. Las muestras RGO11, RGO12 y RGO9 mostraron los efectos más relevantes sobre la viabilidad celular, lo cual puede relacionarse con su grado de reducción, estructura, funcionalización residual y comportamiento coloidal. Estos resultados sugieren que la síntesis verde mediante extracto de té verde permite obtener materiales con respuestas biológicas diferenciadas; sin embargo, se requieren ensayos complementarios de apoptosis, estrés oxidativo, daño de membrana y captación celular para establecer con mayor precisión los mecanismos involucrados.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se sintetizó óxido de grafeno reducido (rGO) mediante una ruta verde, empleando el extracto acuoso de té verde (*C. sinensis*) como agente reductor. El diseño experimental Box-Behnken permitió organizar sistemáticamente las condiciones de síntesis y comparar los efectos del volumen de extracto, la temperatura y el tiempo de reacción sobre las propiedades del material obtenido.

Los resultados de la caracterización confirmaron la reducción parcial del GO. Los análisis FTIR evidenciaron una disminución de la intensidad de las bandas asociadas a grupos funcionales oxigenados, mientras que la DRX mostró el desplazamiento del pico principal hacia mayores ángulos 2θ y una reducción del espaciado interlamelar. Asimismo, con los datos obtenidos por EDS y XPS se confirmó el aumento de la relación C/O respecto al GO de partida, lo que respalda la eliminación parcial de oxígeno superficial durante la síntesis verde.

Las muestras RGO11, RGO12 y RGO8 presentaron las mayores evidencias del alcance de la reducción del GO según los resultados de FTIR, DRX y EDS. Estas muestras estuvieron asociadas principalmente a los mayores tiempos de reacción o a las temperaturas más altas, lo que sugiere que el tiempo y la temperatura fueron variables relevantes en la reducción química del GO. Adicionalmente, los resultados también muestran que el proceso es igualmente

influenciado por la interacción entre el volumen del extracto de té verde, la temperatura y el tiempo de reacción.

El análisis por SEM mostró una morfología laminar con pliegues, arrugas y zonas de apilamiento, que son características típicas de materiales del tipo rGO. Por su parte, el DLS evidenció tamaños hidrodinámicos a escala micrométrica y con distintos grados de polidispersidad, lo que indica la formación de agregados y una estabilidad coloidal variable entre las muestras. Estos resultados confirmaron que la reducción verde modificó tanto la química superficial como la organización estructural y coloidal del material.

La evaluación preliminar de la viabilidad celular mediante MTT mostró una baja citotoxicidad general en células Vero y una respuesta variable en células PC3. Las muestras RGO11, RGO12 y RGO9 presentaron los mayores efectos sobre la viabilidad celular, posiblemente relacionados con su grado de reducción, defectos estructurales, la funcionalización residual y el comportamiento coloidal. No obstante, estos resultados deben tomarse como una primera aproximación, por lo que se requieren estudios complementarios sobre apoptosis, estrés oxidativo, daño de membrana y captación celular para poder establecer mecanismos biológicos más específicos.

En conjunto, los resultados demuestran que el extracto de té verde utilizado puede llegar a actuar como un agente reductor en la síntesis verde de rGO y que el diseño experimental Box-Behnken adoptado constituye una herramienta útil para comparar los parámetros de síntesis y orientar la selección de muestras con propiedades diferenciadas. Esta estrategia se presenta como una alternativa sostenible para la obtención de rGO, con aplicación potencial en nanotecnología y en estudios biomédicos exploratorios.

5. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

Los autores desean agradecer a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle por financiar parte de la investigación a partir del proyecto “Estudio de propiedades anticancerígenas de nanopartículas de óxido de grafeno frente a células de cáncer óseo” de la Convocatoria Interna 111-2018 (CI 21026).

6. REFERENCIAS

[1] R. Urcuyo Solórzano *et al.*, “Perspectivas y aplicaciones reales del grafeno después de 16 años de su descubrimiento,” *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 50, no. 1, pp. 51-85, Jan. 2021. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v50n1.90134

[2] J. L. García-Bello *et al.*, “Grafeno: producción, caracterización y aplicaciones,” *Tecnol. Química (Santiago de Cuba)*, vol. 43, no. 1, pp. 59-80, Jan.-Apr. 2023. https://www.researchgate.net/publication/373396611_Grafeno_produccion_caracterizacion_y_aplicaciones

[3] S. Yadav *et al.*, “An Update on Graphene Oxide: Applications and Toxicity,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 40, pp. 35387–35445, Oct. 2022. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03171

[4] N. Farooq *et al.*, “Graphene Oxide and Based Materials: Synthesis, Properties, and Applications – A Comprehensive Review,” *MatSci Express*, vol. 1, no. 4, pp. 185-231, Jul. 2024. https://doi.org/10.69626/mse.2024.0185

[5] V. Marsala *et al.*, “Structural, Morphological, and Antibacterial Attributes of Graphene Oxide Prepared by Hummers’ and Brodie’s Methods,” *Molecules*, vol. 30, no. 2, p. 240, Jan. 2025. https://doi.org/10.3390/molecules30020240

[6] N. I. Zaaba *et al.*, “Synthesis of Graphene Oxide Using Modified Hummers Method: Solvent Influence,” *Procedia Eng.*, vol. 184, pp. 469-477, 2017. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.04.118

[7] S. Priyadarsini *et al.*, "Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application," *J. Nanostruct. Chem.*, vol. 8, no. 2, pp. 123-137, Jun. 2018. https://doi.org/10.1007/s40097-018-0265-6

[8] S. Tamang *et al.*, "A concise review on GO, rGO and metal oxide/rGO composites: Fabrication and their supercapacitor and catalytic applications," *J. Alloys Compd.*, vol. 947, p. 169588, Jun. 2023. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2023.169588

[9] R. Saini *et al.*, "Green Synthesis of Reduced Graphene Oxide Using the Tinospora cordifolia Plant Extract: Exploring Its Potential for Methylene Blue Dye Degradation and Antibacterial Activity," *ACS Omega*, vol. 9, no. 18, pp. 20304-20321, May. 2024. https://doi.org/10.1021/acsomega.4c00748

[10] N. F. B. Mohd Ithnin, and W. W. Liu, "Exfoliation of Graphite into Graphene Oxide and Reduction by Plant Extract to Synthesize Graphene," *Int. J. Nanoelect. Mater.*, vol. 17, no. 2, pp. 284-287, May. 2024. https://doi.org/10.58915/ijneam.v17i2.718

[11] E. Vatandost *et al.,* "Green tea extract assisted green synthesis of reduced graphene oxide: Application for highly sensitive electrochemical detection of sunset yellow in food products," *Food Chemistry: X,* vol. 6, p. 100085, Jun. 2020. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100085

[12] P. Parthipan *et al.,* "Eco-friendly synthesis of reduced graphene oxide as sustainable photocatalyst for removal of hazardous organic dyes," *J. King Saud Univ. Sci.,* vol. 33, no. 4, p. 101438, Apr. 2021. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101438

[13] X. Weng *et al.*, "Impact of synthesis conditions on Pb(II) removal efficiency from aqueous solution by green tea extract reduced graphene oxide," *Chem. Eng. J.*, vol. 359, pp. 976-981, Mar. 2019. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.089

[14] E. T. Mombeshora, and E. Muchuweni, "Dynamics of reduced graphene oxide: synthesis and structural models," *RSC Adv.*, vol. 13, no. 26, pp. 17633-17655, Jun. 2023. https://doi.org/10.1039/D3RA02098C

[15] T. Subha *et al.*, "Green Synthesis, Characterization and Optimization of Silver Nanoparticles from Carica Papaya using Box Behnken Design and its Activity against Dental Caries Causing Streptococcus sp," *Chem. Data Collect.*, vol. 51, p. 101139, Jun. 2024. https://doi.org/10.1016/j.cdc.2024.101139

[16] A. S. Kadhim, and Z. S. A. Al-Ali, "Green Synthesis of Reduced Graphene Oxide Nanosheets using Iraqi Rhus coriaria Fruits Extract and a Study of Its Anticancer Activity," *Iraqi J. Sci.*, vol. 65, no. 11, pp. 6253-6266, Nov. 2024. https://doi.org/10.24996/ijs.2024.65.11.5

[17] Y. Budama-Kilinc *et al.*, "Environmentally friendly green synthesis of reduced graphene oxide using Laurus nobilis, characterization and evaluation of in vitro anticancer activity," *Mater. Res. Express*, vol. 12, no. 1, p. 015602, Jan. 2025. https://doi.org/10.1088/2053-1591/ada41d

[18] A. S. Kodous *et al.*, "Gamma radiation assisted green synthesis of hesperidin-reduced graphene oxide nanocomposite targeted JNK/SMAD4/MMP2 signaling pathway," *Sci. Rep.*, vol. 14, p. 11535, May. 2024. https://doi.org/10.1038/s41598-024-60347-5

[19] F. del C. Salinas-Pérez *et al.*, "Pruebas toxicológicas para la evaluación de nanomateriales: Artículo de revisión," *Pädi Bol. Cient. Cienc. Básicas Ing. ICBI*, vol. 11, no. 5, pp. 88-101, Dec. 2023. https://doi.org/10.29057/icbi.v11iEspecial5.11825

[20] A. Jafari *et al.,* "Silver nanoparticles inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells: an experimental report," *World Cancer Res. J.,* vol. 9, p. e2242, Mar. 2022. https://doi.org/10.32113/wcrj_20223_2242

[21] K. Jamil *et al.*, "Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Catharanthus roseus and its cytotoxicity effect on Vero cell lines," *Molecules*, vol. 27, no. 19, p. 6191, Sep. 2022. https://doi.org/10.3390/molecules27196191

[22] A. Zhou *et al.*, "H2O2-Free strategy derived from Hummers method for preparing graphene oxide with high oxidation degree," *FlatChem*, vol. 38, p. 100487, Mar. 2023. https://doi.org/10.1016/j.flatc.2023.100487

[23] M. M. Maciel Blindes *et al.*, "Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification," *J. Food Eng.*, vol. 241, pp. 97-104, Jan. 2019. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.006

[24] Y. Wang *et al.*, "Facile Synthesis of Soluble Graphene Via a Green Reduction of Graphene Oxide in Tea Solution and its Biocomposites," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 4, pp. 1127-1133, Mar. 2011. https://doi.org/10.1021/am1012613

[25] X. Colom Fajula et al., "Análisis estructural de Óxidos de Grafeno (GO) y Óxidos de Grafeno reducidos (RGO)," Afinidad, vol. 77, no. 591, pp. 167-174, 2020. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7762528

[26] P. Kumar Singh *et al*., "An electrochemical approach for bulk production of reduced graphene oxide from graphite oxide followed by thermal reduction," *Mod. Phys. Lett. B*, vol. 37, no. 21, p. 2350057, 2023. https://doi.org/10.1142/S0217984923500574

[27] E. Quagliarini *et al*., "The influence of protein corona on graphene oxide: implications for biomedical theranostics," *J. Nanobiotechnol.*, vol. 21, p. 267, Aug. 2023. https://doi.org/10.1186/s12951-023-02030-x

[28] K. Tewatia *et al*., "Synthesis of graphene oxide and its reduction by green reducing agent," *Mater. Today Proc.*, vol. 44, no. Part 6, pp. 3933-3938, 2021. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.294

[29] N. Chadha *et al.*, "A new insight into the structural modulation of graphene oxide upon chemical reduction probed by Raman spectroscopy and X-ray diffraction," *Carbon Lett.*, vol. 31, no. 6, pp. 1125-1131, Dec. 2021. https://doi.org/10.1007/s42823-021-00234-5

[30] H. Kaftelen-Odabaşi, "Evaluation of morphological, structural, thermal, electrical, and chemical composition properties of graphene oxide, and reduced graphene oxide obtained by sequential reduction methods," *Carbon Trends*, vol. 17, p. 100429, Dec. 2024. https://doi.org/10.1016/j.cartre.2024.100429

[31] J. Soni *et al*., "A Green and Ecobenign Protocol for Reduction of Graphene Oxide Using Curry Leaf and Tulsi Seed Extracts and Their Catalytic, Dye Removal, and Antimicrobial Applications," *Polycyclic Aromatic Compounds*, vol. 47, no. 7, pp. 4566-4583, Sep. 2023. https://doi.org/10.1080/10406638.2023.2254902

[32] A. Khan *et al.*, "Comparative analysis of graphene oxide (GO) reduction methods: impact on crystallographic, morphological, and optical properties," *Graphene 2D mater*., vol. 9, pp. 101-109, Jun. 2024. https://doi.org/10.1007/s41127-024-00072-y

[33] Y. Cao *et al*., "Subnanometric Stacking of Two-Dimensional Nanomaterials: Insights from the Nanotexture Evolution of Dense Reduced Graphene Oxide Membranes," *ACS Nano*, vol. 17, no. 5, pp. 5072-5082, Mar. 2023. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00155

[34] S. Mao, H. Pu, and J. Chen, "Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress," *RSC Adv.*, vol 2, no. 7, p. 2643–2662, Mar. 2012. https://doi.org/10.1039/C2RA00663D

[35] M. K. Fathy *et al*., "Preparation and Qualification of Reduced Graphene Oxide by Different Reduction Methods," *Trans. Electr. Electron. Mater*., vol. 25, no. 6, pp. 732-744, Dec. 2024. https://doi.org/10.1007/s42341-024-00548-x

[36] L. Destiarti *et al*., "Facile synthesis of reduced graphene oxide using *Caesalpinia sappan* L. extract as green reducing agent," *Next Mater.*, vol. 2, p. 100134, Jan. 2024. https://doi.org/10.1016/j.nxmate.2024.100134

[37] S. Ochigbo *et al.*, "Facile synthesis and optimization of graphene oxide reduction by annealing in hydrazine vapour in ambient air for potential application in perovskite solar cells," *Sci. World J.*, vol. 19, no. 1, pp. 194-199, May. 2024. https://doi.org/10.4314/swj.v19i1.26

[38] I. Padron-Ramirez *et al*., "Exploring the use of fast electron backscattering for the determination of the C/O ratios: possible applications to graphene oxide and reduced graphene oxide," *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol*., vol. 15, p. 035014, Aug. 2024. https://doi.org/10.1088/2043-6262/ad6cc1

[39] B. Anegbe *et al.*, "Graphene oxide synthesis and applications in emerging contaminant removal: a comprehensive review," *Environ. Sci. Eur.*, vol. 36, p. 15, Jan. 2024. https://doi.org/10.1186/s12302-023-00814-4

[40] W. Widanarto *et al.*, "Production of reduced graphene oxide from activated rice husk charcoal using a high-energy ball milling method," *Phys. Scr.*, vol. 98, p. 10590, Sep. 2023. https://doi.org/10.1088/1402-4896/acf34b

[41] B. Bairy *et al.*, "Adsorption kinetics, isotherm and thermodynamics studies for the removal of cationic dyes from environmental wastewater by reduced graphene oxide adsorbent synthesized via greener way," *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol*., vol. 14, no. 1, p. 015004, Mar. 2023. https://doi.org/10.1088/2043-6262/acc01d

[42] B. Bairy *et al*., "Biogenic synthesis of reduced graphene oxide and investigation of adsorption isotherm, kinetics, thermodynamics parameters for water pollution remediation," *Graphene 2D mater.,* vol. 9, pp. 137-152, Jun. 2024. https://doi.org/10.1007/s41127-024-00078-6

[43] D. Sengottuvelu *et al.*, "Effects of Surface Area and Particle Size of Graphite and Graphene Nanoplatelets on Their Oxidation and Subsequent Use in the Modification of Asphalt Binder," *ChemRxiv*, Dec. 2023. https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-cz5kp

[44] N. Maslekar *et al.*, "Maintaining Colloidal Stability of Polymer/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite Aqueous Dispersions Produced via In Situ Reduction of Graphene Oxide for the Preparation of Electrically Conductive Coatings," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 6, no. 7, 5177-5186, Apr. 2023. https://doi.org/10.1021/acsanm.2c05076

[45] Y. Xiao *et al.*, "Synthesis and Functionalization of Graphene Materials for Biomedical Applications: Recent Advances, Challenges, and Perspectives," *Adv. Sci.*, vol. 10, no. 9, p. 2205292, Mar. 2023. https://doi.org/10.1002/advs.202205292

[46] C. Li, Z. Zhuang, X. Jin, and Z. Chen, "A facile and green preparation of reduced graphene oxide using Eucalyptus leaf extract," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 422, p. 469–474, Nov. 2017. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.06.032

[47] T. C. Lebepe *et al.*, "NIR-II window absorbing graphene oxide-coated gold nanorods and graphene quantum dot-coupled gold nanorods for photothermal cancer therapy," *Nanotechnol. Rev.*, vol. 12, no. 1, Jun. 2023. https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0541

[48] N. F. Abu Kasim *et al.*, "Comparison study between two different precursors of RGO/AuNPs one pot synthesis," *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 015014, Mar. 2024. https://doi.org/10.1088/2043-6262/ad2dc7

[49] S. Alotibi *et al.*, "Sustainable and Cost-Efficient Production of Micro-Patterned Reduced Graphene Oxide on Graphene Oxide Films," *Coatings*, vol. 14, no. 5, p. 534, 2024. https://doi.org/10.3390/coatings14050534

[50] F. K. F. dos Santos *et al.*, "Graphene and Natural Products: A Review of Antioxidant Properties in Graphene Oxide Reduction," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 10, p. 5182, May. 2024. https://doi.org/10.3390/ijms25105182

[51] G. Utkan *et al.*, "Production of Reduced Graphene Oxide by Using Three Different Microorganisms and Investigation of Their Cell Interactions," *ACS Omega*, vol. 8, no. 34, pp. 31188-31200, Aug. 2023. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03213

[52] O. Akhavan *et al.*, "Increasing the antioxidant activity of green tea polyphenols in the presence of iron for the reduction of graphene oxide," *Carbon*, vol. 50, no. 8, pp. 3015-3025, Jul. 2012. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.02.087

[53] D. Guo *et al.*, "Natural tea polyphenol functionalized graphene anode for simultaneous power production and degradation of methyl orange dye in microbial fuel cells," *RSC Adv.*, vol. 14, no. 21, pp. 11572-11582, May. 2024. https://doi.org/10.1039/d4ra00613e

[54] M. Pelin *et al.*, "Role of Chemical Reduction and Formulation of Graphene Oxide on Its Cytotoxicity towards Human Epithelial Bronchial Cells," *Nanomaterials*, vol. 13, no. 15, p. 2189, Jul. 2023. https://doi.org/10.3390/nano13152189

[55] J. Khan, and M. Jaafar, "Reduction efficiencies of natural substances for reduced graphene oxide synthesis," *J. Mater. Sci.*, vol. 56, pp. 18477-18492, Sep. 2021. https://doi.org/10.1007/s10853-021-06492-y

[56] W. Feng *et al.*, "Graphene oxide leads to mitochondrial-dependent apoptosis by activating ROS-p53-mPTP pathway in intestinal cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 146, p. 106206, May. 2022. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106206

[57] L. Ou *et al.*, "Toxicity of graphene-family nanoparticles: A general review of the influence of physicochemical properties on biological effects," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, no. 57, Oct. 2016. https://doi.org/10.1186/s12989-016-0168-y

[58] Z. M. Alaizeri *et al.*, "Green synthesis of ZnO-TiO_2/RGO nanocomposites using Senna surattensis extract: a novel approach for enhanced anticancer efficacy and biocompatibility," *RSC Adv.*, vol. 14, no. 24, pp. 16685-16695, May. 2024. https://doi.org/10.1039/D4RA01634C

[59] C. Cornelius *et al.*, "Hormesis and vitagenes in aging and longevity: mitochondrial control and hormonal regulation," *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, vol. 16, no. 2, pp. 73-89, Dec. 2013. https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0051

[60] F. Kappenberg *et al.*, "Guidance for statistical design and analysis of toxicological dose-response experiments, based on a comprehensive literature review," *Arch. Toxicol.*, vol. 97, pp. 2741-2761, Oct. 2023. https://doi.org/10.1007/s00204-023-03561-w

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Juan Daniel Micolta Galeano: conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, redacción del borrador original, revisión y edición.

Oscar Montes Beltran: conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, redacción del borrador original.

Carlos David Grande Tovar: conceptualización, análisis formal, metodología, supervisión, revisión y edición.

David Martiliano: análisis formal, metodología, revisión y edición.

Juan David Rodríguez Macías: análisis formal, metodología, revisión y edición.

Daniel Insuasty Delgado: análisis formal, metodología, revisión y edición.

Jose Herminsul Mina Hernández: conceptualización, metodología, supervisión, revisión y edición.

DECLARACIÓN DE USO DE IA

Durante la elaboración del manuscrito, los autores utilizaron ChatGPT (OpenAI) versión GPT-4o de 2024, como herramienta de apoyo exclusivamente para mejorar aspectos de redacción y coherencia del texto previamente desarrollado. El contenido generado por la herramienta fue revisado y ajustado por los autores, quienes verificaron su pertinencia y asumen la responsabilidad por el contenido final del documento.