



Universidad del Papaloapan

Terra Uberrima, Mens Aperta

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC A PARTIR
DE EXTRACTOS DE *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera***

PRESENTA

KEYLA MAULEÓN TOLENTINO

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. ARIANA A. HUERTA
HEREDIA**

CO-DIRECTOR DE TESIS

**DR. MARIO VALERA
ZARAGOZA**

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBI/009
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 8 de febrero de 2019

C. KEYLA MAULEÓN TOLENTINO

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Aurelio Ramírez Hernández	UNPA	Presidente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACYT	Vocal
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo	Cátedras CONACYT	1er Suplente
Dra. Ileana Vera Reyes	CIQA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Beu Lo-tama, chi ji ju



VICE-RECTORIA
ACADEMICA

Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.

- C.c.p. Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia - Director de tesis.
- C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Aranal - Jefe de Servicios Escolares
- C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad Universitaria
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 0 (281)8722233



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/078
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 21 de febrero de 2019

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la **C. Keyla Mauleón Tolentino**, matrícula **16140008**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Biosíntesis de nanopartículas de óxido de zinc a partir de extractos de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleifera***" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

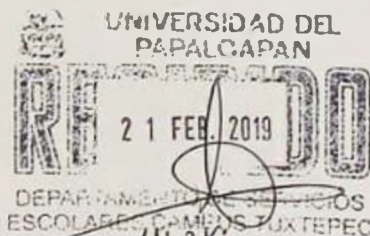
Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Keyla Mauleón Tolentino
C.c.p. Archivo



CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

CONTENIDO

RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1. Nanopartículas.....	12
2.2 Síntesis de nanopartículas.....	13
2.3 Óxido de zinc	14
2.3.1 Capacidad antimicrobiana del óxido de zinc.....	16
2.4 <i>Stevia rebaudiana</i>	17
2.5 <i>Moringa oleífera</i>	19
III. ANTECEDENTES	21
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo General	25
5.2 Objetivos Específicos.....	25
VI. METODOLOGÍA	26
6.1. Obtención del material vegetal.....	26
6.1.1 Obtención de fracciones con diferente polaridad.....	26
6.1.2 Caracterización por placa fina de los extractos	27
6.1.3 Cuantificación de fenoles.....	28
6.2 Síntesis de nanopartículas.....	29
6.3 Caracterización de las síntesis.....	29
6.3.1 Espectroscopia UV-Vis	30
6.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	30
6.3.3 Difracción de rayos X (DRX).....	30
6.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)	31
6.3.5 Microscopía electrónica	31
6.4 Determinación del efecto citotóxico de las nanopartículas de ZnO.....	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1 Extracto hidroalcohólico de <i>Stevia rebaudiana</i> y <i>Moringa oleífera</i>	33
7.1.1 Extracción líquido-líquido de <i>Stevia rebaudiana</i> y <i>Moringa oleífera</i>	33
7.2. Cromatografía en capa fina para identificación de compuestos fenólicos y glucósidos de esteviol presentes en los extractos de <i>Stevia</i>	34

7.3	Análisis de FT-IR para el extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> y sus fracciones...	38
7.4	Espectros de FT-IR para el extracto de <i>Moringa oleífera</i> y sus fracciones..	42
7.5	Espectros de absorción UV-Vis para el extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> y sus fracciones.....	45
7.6	Espectros de absorción UV-Vis de extracto de <i>Moringa</i> y sus fracciones ...	47
7.7	Análisis térmico para el extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> y sus fracciones SH, SA, SB, SAR.	48
7.8	Análisis térmico para el extracto de <i>Moringa oleífera</i> y sus fracciones MH, MA, MB, MAR.	51
7.9	Reacciones preliminares con los extractos de <i>Stevia</i> y <i>Moringa</i>	53
	Se realizaron algunas reacciones con la finalidad de establecer el tiempo de reacción adecuado.....	53
7.9.1	Tiempo de reacción con el extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	53
7.9.2	Tiempo de reacción con el extracto de <i>Moringa oleífera</i>	60
7.10	Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> y fracciones.	63
7.11	Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extracto de <i>Moringa oleífera</i> y fracciones.....	64
7.12.	Espectros de FT-IR para las reacciones y productos de reacción con <i>Stevia rebaudiana</i>	65
7.13.	Espectros de FT-IR para las reacciones y productos de reacción con <i>Moringa Oleífera</i>	69
7.14	Espectros de absorción UV-vis del extracto de <i>Stevia</i> (S) y fracciones SH, SA, SB, SAR, con su respectiva reacción de síntesis.....	72
7.15	Espectros de absorción Uv-Vis de las síntesis de nanopartículas con <i>Moringa oleífera</i>	73
7.16	Análisis térmico de los productos de reacción con el extracto <i>Stevia rebaudiana</i> y sus fracciones SH, SA, SB, y SAR	75
7.17.	Análisis térmico de los productos de reacción con el extracto <i>Moringa oleífera</i> y sus fracciones MH, MA, MB, y MAR	77
7.18	Patrones de DRX de los productos de reacción con el extracto <i>Stevia rebaudiana</i> y sus fracciones SH, SA, SB, y SAR	78
7.19	Espectro de difracción de rayos X de las reacciones con el extracto de <i>Moringa</i> y las fracciones MH, MA, MB, MAR.	80
7.20	Morfología de nanopartículas formadas a partir de extractos de <i>Stevia</i> y su fracción n-butanol, extracto de <i>Moringa</i> y fracción acuosa residual.....	81
7.21	Ensayo MTT con nanopartículas de ZnO y extracto de <i>Stevia</i> y <i>Moringa</i> ..	85

7.22	Dispersión de Nanopartículas en películas de almidón.....	87
7.22.1	Análisis FT-IR para las películas de almidón con nanopartículas	90
7.22.3	Patrones de difracción de DRX para las películas de almidón con extracto de <i>Stevia</i> y con las fracciones y sus productos de reacción.	91
7.22.4	Patrones de difracción de DRX de las películas del extracto de <i>Moringa</i> , fracciones y los productos de reacción	92
VIII.	CONCLUSIONES	95
IX.	ANEXO	96
X.	REFERENCIAS	101

DEDICATORIA

A mi madre. Rosario Tolentino

Por ser un ejemplo para ser feliz y por acompañarme en todo momento con esa calidez que la invade y que contagia.

A mi familia.

Por ser partícipes de mis decisiones y poder contar con su apoyo, en especial a mi tía Isabel.

A mi cómplice. Oscar Arturo

Porque no importa la situación tú estás conmigo y así quisiera seguir, coincidiendo a cada instante.

“Coincidencias tan extrañas de la vida

Tantos siglos, tantos mundos, tanto espacio y coincidir”...

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis, Dra. Ariana y Dr. Valera, a los que agradezco la oportunidad de trabajar en su equipo nano. Dra. por su entusiasmo, su tiempo y conocimiento, por su apoyo para concluir, muchas gracias. Dr. Valera, por hacerme ver la realidad de una investigación, la disposición y su conocimiento, fueron necesarios para lograr esta tesis, gracias por todo.

A mis guías en este proyecto, sin duda sin su apoyo esto no sería posible, al Dr. Omar por ser un ejemplo a seguir, siempre pendiente, compartiendo materiales, conocimiento, muchas gracias, al Dr. Erick, y al Dr. Paul, por hacer las preguntas necesarias y objetivas y lograr cada una de las etapas de este trabajo. Al Dr. Peña por su tiempo y conocimientos por las correcciones en este trabajo, y el préstamo de materiales. Al Dr. Aurelio por su enseñanza de vida, el correcto uso de equipos, las correcciones en este trabajo y el tiempo dedicado el cual valoro mucho, al Dr. Meza y al Dr. Abad por siempre estar pendientes.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR) especialmente a Frank Manuel por ser una excelente persona y profesor, realizar la microscopía electrónica en este trabajo, por todas las atenciones prestadas y enseñarme que la ciencia debe estar llena de valores, acciones correctas y debe ser siempre compartida, muchas gracias.

A mi papá por mostrarme el camino de la educación y el resguardo en la música, los libros y a mantenerme en pie aunque todo caiga.

Alamsin ya con más de 7 años de amistad vas caminando conmigo en cada tesis, gracias por tu amistad que valoro mucho, a mi buen amigo Edgar por tantos momentos compartidos, y a todas aquellas personas que hicieron los días más agradables.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad del Papaloapan por su apoyo en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) fueron sintetizadas utilizando extractos de las plantas *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera*, partiendo del precursor metálico, nitrato de zinc. Las nanopartículas de ZnO fueron caracterizadas por difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados mostraron la obtención del compuesto ZnO en fase wurtzita. De acuerdo a los resultados, algunas familias de metabolitos del extracto de *Stevia rebaudiana* contenidos en la fracción butanólica y en la fracción acuosa residual, además del extracto crudo de *Moringa* participan activamente en la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (NPs). Los estudios de microscopía electrónica de barrido permitieron conocer la morfología casi esférica de las nanopartículas de óxido de zinc con tamaños menores a los 100 nm.

Las nanopartículas obtenidas a partir de los extractos se dispersaron en una matriz de almidón y se analizaron por DRX, FT-IR, y SEM, observándose dispersiones aglomeradas.

Nanopartículas fueron probados en un ensayo de viabilidad celular (MTT) con células de cáncer de mama de la línea MCF-7. Los resultados son prometedores, dando a conocer que las nanopartículas sintetizadas con extracto de *Moringa* lograron disminuir la viabilidad en todas las concentraciones probadas.

I. INTRODUCCIÓN

El interés por el desarrollo en el área de la nanotecnología aumenta con el paso del tiempo, por la posibilidad de controlar las propiedades de un material a nivel nanométrico y potencializar sus capacidades. Las nanopartículas (NPs) son un conjunto de átomos que forman partículas con una dimensión menor a 100 nm. Las metodologías para la síntesis de nanopartículas van en aumento, precisamente por la obtención de propiedades (mecánicas, eléctricas, magnéticas, ópticas, catalíticas) distintas respecto al material a escala macroscópica. Así mismo, la escala nanométrica permite una mayor superficie de contacto. Esto, favorece la incorporación de nanopartículas en diversos campos, tales como la biomedicina, electrónica, informática, etc.

Las nanopartículas semiconductoras han sido estudiadas desde la década anterior, no solo por sus propiedades físicas y químicas, sino también por sus aplicaciones. El óxido de zinc es uno de los semiconductores más estudiados debido a sus propiedades antimicrobianas y de protección a la irradiación UV. El óxido de zinc se investiga para usos en medicina, especialmente para la marcación de células y en la administración de medicamentos (Tang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010), así como por sus propiedades antibacterianas (Zhang *et al.*, 2007). Productos tan comunes como protectores solares o cremas para rozaduras, contienen nanopartículas de ZnO (Gong *et al.*, 2006). Las nanopartículas de óxido de zinc se encuentran en diodos láser (Fujita *et al.*, 2014), celdas solares (Nicolaev *et al.*, 2016; Ohashi, 2017), fotodetectores (Park *et al.*, 2015) y en sistemas de fotocatalisis (Di Mauro *et al.*, 2015).

La síntesis de nanopartículas de óxido de zinc se ha llevado a cabo por diferentes metodologías. El presente trabajo se centra en utilizar por separado extractos de las plantas *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera* para sustituir reactivos como hidróxido de sodio (NaOH), considerando que los extractos pueden ser obtenidos

con mayor facilidad y que presentan metabolitos con estructuras similares al reactivo mencionado. Con ello, es posible darle un valor agregado a la obtención de nanopartículas de óxido de zinc por partir de una metodología amigable con el medio ambiente. Existen reportes de síntesis de nanopartículas de ZnO con extractos de plantas. Sin embargo, en las metodologías de síntesis reportadas utilizan temperaturas por encima de los 400 °C para la formación de las NPs-ZnO (Salam *et al.*, 2014; Santhoshkumar *et al.*, 2017; Ramesh *et al.*, 2015, Yuvakkumar *et al.*, 2014, Senthilkumar *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se muestra la síntesis de nanopartículas de ZnO tipo wurtzita con extractos de plantas obtenidas a relativas bajas temperaturas (menores a 150 °C) además se probaron en una línea celular de cáncer de mama.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son un conjunto de átomos que se encuentran en dimensiones no mayores a 100 nm, en al menos una de sus dimensiones. En la **Figura 1** se observan algunas morfologías que pueden adoptar las nanopartículas. Estas morfologías dependen de las variables de síntesis.

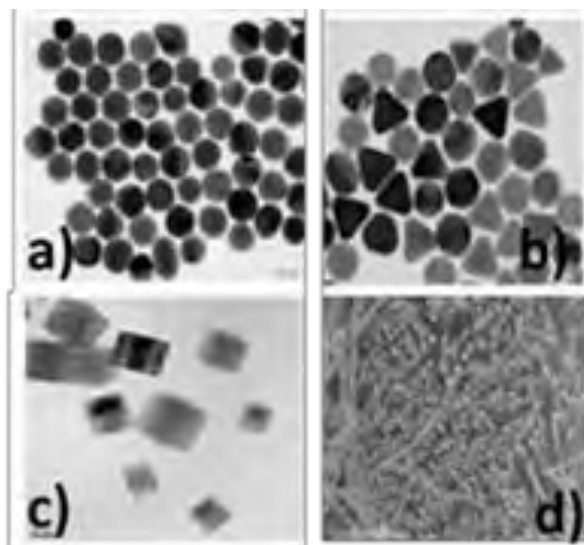


Figura 1. Micrografías obtenidas por SEM de nanopartículas: a) nanoesferas, b) nanotriángulos con nanoesferas, c) nanocubos d) nanotubos (Tiwari *et al.*, 2012)

Las NPs presentan características específicas de coloración, reactividad química, y relación superficie/volumen. Las propiedades químicas, físicas, eléctricas, ópticas etc. de las nanopartículas pueden ser significativamente diferentes de las propiedades de los materiales a mayor escala (Menéndez, 2010). El interés por estudiar a los nanomateriales se ha incrementado en los últimos años, debido a las propiedades de estos y a la gran demanda que podrían tener, con aplicaciones en diversos campos como la biomedicina, industria farmacéutica, industria automotriz, etc., permitiendo con ello mejorar o crear nuevos productos.

Las nanopartículas pueden ser catalogadas de acuerdo a su componente nanométrico y/o a su morfología (Mora, 2013) y se encuentran dentro de la clasificación de los nanomateriales, basado en el número de dimensiones 1D, 2D

o 3D que están fuera del rango de nanoescala (<100 nm) (Tiwari *et al.*, 2012). En nanomateriales de dimensión cero (0D), todas las dimensiones se miden dentro de la nanoescala de modo general los nanomateriales 0D son nanopartículas. En los nanomateriales unidimensionales (1D), una dimensión está fuera de la nanoescala. Esta clase incluye nanotubos, nanorods y nanocables. En los nanomateriales bidimensionales (2D), dos dimensiones están fuera de la nanoescala. Esta clase incluye grafeno, nanopelículas. Los nanomateriales tridimensionales (3D) son materiales que no se limitan a la nanoescala en ninguna dimensión. Esta clase puede contener polvos a granel, dispersiones de nanopartículas, haces de nanocables y nanotubos.

2.2 Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se lleva a cabo mediante dos líneas de seguimiento (Zanella, 2012), los métodos físicos, cuando componentes a granel se rompen en unidades cada vez más pequeñas mediante mecanismos físicos y los métodos químicos, cuando precursores actúan como centros de nucleación, dando lugar a la formación de *clusters* cuyo crecimiento continuo a medida que se sigan agregando los átomos, formándose así, partículas de mayor tamaño. Las metodologías van cambiando para optimizar el proceso, reducción de costos de operación, reducción de compuestos tóxicos, siendo las variables de síntesis parte esencial en la morfología y tamaño de la partícula y por ende de las propiedades y características de las mismas. La introducción de componentes biológicos en la síntesis de nanopartículas, tales como microorganismos, vitaminas o metabolitos obtenidos de extractos de plantas, entre otros, es de gran interés, al ser productos de fácil obtención y no contaminantes al medio ambiente (Salinas, 2012). Los extractos de plantas han sido utilizados por contener con características reductoras y estabilizantes de nanopartículas.

Aún no es claro el mecanismo que se sigue para la síntesis de nanopartículas, utilizando extractos de plantas. Sin embargo, los mecanismos propuestos son para una reacción redox, por la capacidad reductora de los componentes celulares,

como proteínas, carbohidratos, ácidos orgánicos, fenoles y otros metabolitos presentes en los extractos, que a su vez pueden funcionar como estabilizadores de las nanopartículas formadas (Haverkamp *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013), Ahmed *et al.* (2017) mencionan en su trabajo que el mecanismo de síntesis de NPs es dependiente de los fitoquímicos tales como alcaloides, fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, terpenoides, carbohidratos, etc. Este comportamiento puede estar relacionado con un solo metabolito o bien con un conjunto de metabolitos. Algunos autores han reportado diferentes grupos funcionales que pueden intervenir en la biosíntesis de NPs. Por ejemplo; los alcoholes, aldehídos, aminas, carboxilos, cetonas, sulfhidrilos (Baker *et al.*, 2013; Rai y Yadav, 2013; Huang *et al.*, 2015). Se ha reportado también que algunas familias de compuestos como los terpenoides, flavonoides, polifenoles, azúcares reductores, glutatión y ascorbato tienen grupos que actúan directamente en la biosíntesis, mientras que otros, como las proteínas funcionan como agentes estabilizantes, formando por adsorción una cubierta orgánica (Rai y Yadav, 2013). Otra propuesta, es un mecanismo ligante, explicado con base a las biomoléculas, como fenoles, flavonoides, carotenoides, presentes en los extractos de las plantas, que actúan como agentes de ligación. Los grupos hidroxilo de las biomoléculas, forman complejos agentes con las sales precursoras y se ligan con iones de zinc, y a su vez, comienza el proceso de nucleación y posteriormente causa la reducción y la configuración de las NPs, donde al ser llevadas a temperaturas por encima de los 400 °C, el sistema sufre una descomposición directa liberando así a las NPs. (Nava *et al.*, 2017).

2.3 Óxido de zinc

El óxido de zinc (ZnO) es un compuesto inorgánico no tóxico, que en su estado puro se encuentra como polvo blanco, estable a temperatura ambiente y poco soluble en agua. Este compuesto ha despertado un interés tecnológico debido a sus propiedades físicas y químicas, las cuales son aprovechadas en numerosas aplicaciones, por lo que tiene un largo historial de uso seguro, no es irritante y es compatible con la piel. En la antigua India se encontraron registros de uso de ZnO

para enfermedades oculares. En el primer siglo d. C., el griego Dioscórides lo utilizó para la elaboración de ungüentos. En 1025 fue usado por primera vez en el tratamiento de enfermedades de la piel. En la actualidad, se usa en diferentes productos, tales como revestimientos, bloqueadores solares, en pigmentos, en pomadas antisépticas, como inhibidor del crecimiento de hongos en pintura, como acelerador y activador para la vulcanización del caucho, también actúa como una capa protectora para el propio zinc en celdas solares, recubrimientos para enlatados, protectores solares (Chopra *et al.*, 1984; Norton *et al.*, 2004). El ZnO cristaliza como una estructura hexagonal típica wurtzita (PDF Card No: 2300113), en condiciones ambientales normales, donde los átomos de oxígeno y zinc están organizados de forma que los átomos de oxígeno se sitúan en una estructura distorsionada (Fortunato *et al.*, 2009). Esta estructura de ZnO muestra picos característicos obtenidos por difracción de rayos X en 2θ igual a: 31.73 plano [100], 34.43 plano [002], 36.21 plano [101], 47.55 plano [102], 56.56 plano [110], 62.82 plano [103], 66.30 plano [200], 67.92 plano [112] y 69.02 plano [201]. El ZnO también puede cristalizar en forma de blenda de zinc y de sal de roca, tal como se muestra en la **Figura 2**. De las tres formas estructurales, la más estable es la wurtzita, donde los átomos de oxígeno y zinc están organizados de forma que los átomos de O se sitúan en una estructura hexagonal cerrada, mientras que los átomos de Zn ocupan el centro de la estructura hexagonal distorsionada (Fortunato *et al.*, 2009).

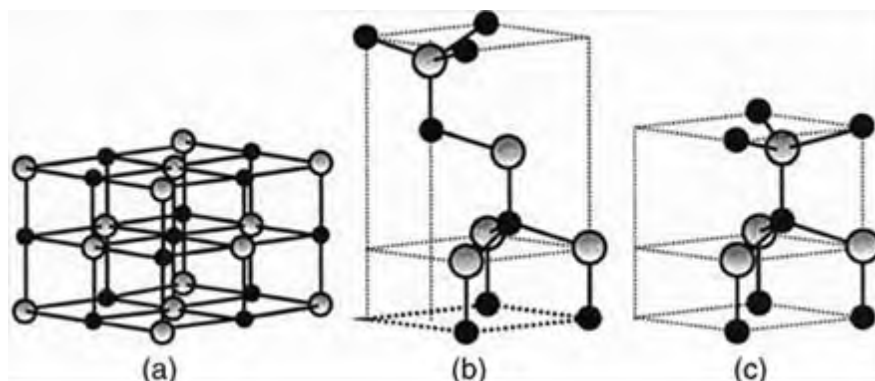


Figura 2. Estructuras cristalinas de ZnO: (a) sal de roca cúbica, (b) blenda de zinc y (c) wurtzita hexagonal. Las esferas sombreadas en gris y negro representan átomos de Zn y O respectivamente (Fortunato *et al.*, 2009).

El ZnO tiene una densidad de 5600 Kg/m^3 , una masa molar de $81,40 \text{ g/mol}$, punto de fusión de $1975 \text{ }^\circ\text{C}$ y punto de ebullición de $2360 \text{ }^\circ\text{C}$. Presenta una banda prohibida relativamente amplia de $\sim 3.3 \text{ eV}$ a temperatura ambiente (Kołodziejczak-Radzimska y Jesionowski, 2014)

2.3.1 Capacidad antimicrobiana del óxido de zinc

El efecto antimicrobiano del óxido de zinc en los microorganismos patógenos se debe a tres mecanismos de acción principales: generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés); acumulación de NPs-ZnO en la membrana y liberación de iones Zn^{2+} , tal como se muestra en la **Figura 3**.

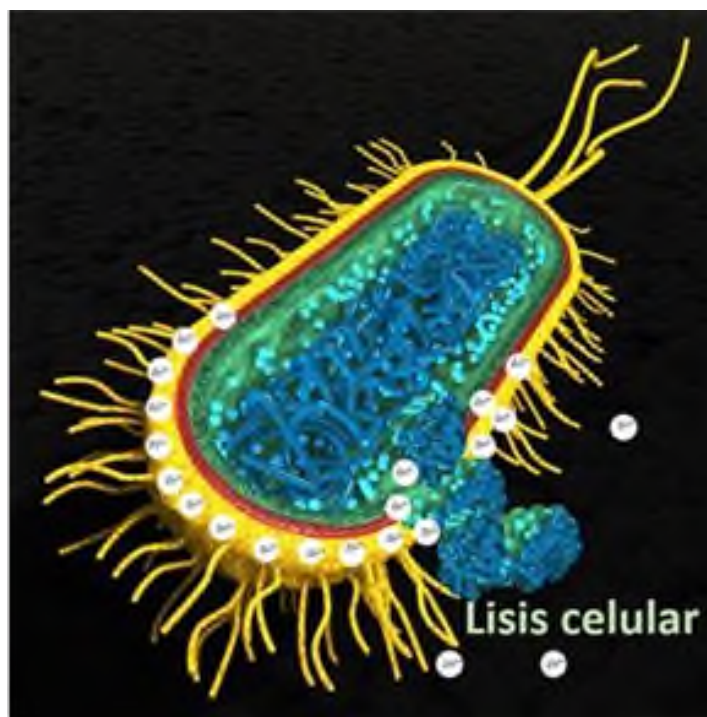


Figura 3. Mecanismo de acción del óxido de zinc con liberación de iones Zn^{2+} sobre las células (Adaptada de Sondi *et al.*, 2004).

La liberación de ROS en soluciones acuosas es desencadenada por la luz (tanto ultravioleta como visible), la cual genera pares electrón–hueco en la superficie de las NPs-ZnO (Lipovsky *et al.*, 2009). Incluso bajo condiciones de oscuridad, las NPs-ZnO son capaces de detener el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*. Este

comportamiento lo atribuyen principalmente a la liberación del anión superóxido, o a modos de acción alternativos de las NPs-ZnO (Huh *et al.*, 2011). Las ROS ocasionan una fuga de contenido intracelular debido al daño oxidativo a las proteínas y lípidos de la membrana celular bacteriana, conllevando a una eventual muerte celular. Aunado a esto, se ha determinado que dicho estrés oxidativo posee un débil potencial mutagénico en los microorganismos (Hajipour *et al.*, 2012). Cuando los iones penetran en el interior de la célula, a través de unos transportadores de metales presentes en su membrana, compitiendo con ellos por los lugares de captación, los iones actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana (respiración celular) y una vez en el interior de la célula alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía y modificando su material genético (Sondi 2004). El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse, como en el caso de la *Escherichia coli* y las bacterias Gram-negativas. Se ha reportado que la cantidad de iones Zn^{2+} liberada por nanopulvos de ZnO es muy superior que la liberada por partículas de mayor tamaño de este mismo compuesto. Asimismo, se considera a los iones Zn^{2+} como agentes bacteriostáticos y no como bacteriocidas, ya que estos suelen unirse a la membrana bacteriana. Alvarado *et al.*, (2014) y Padmavathy *et al.*, (2008), mencionan que la actividad antimicrobiana se ve afectada por el tamaño de partícula. La ventaja de usar este compuesto inorgánico como agente antimicrobiano, es que es un ion metálico esencial en todo organismo y por lo tanto metabolizable, pero a su vez exhibe una actividad antimicrobiana fuerte, incluso cuando se administra en pequeñas concentraciones.

2.4 *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana es una planta perenne de las *Asteraceae* (Compositae) de algunas regiones de América del Sur, tales como Paraguay y Brasil (Brandle *et al.*, 1998). El género *Stevia* tiene más de 300 variedades. Sin embargo, *Stevia rebaudiana* Bertoni es la única especie con principios edulcorantes (Grashoff, 1972). Actualmente, *Stevia* es conocida por su sabor dulce, por lo que se ha

convertido en una alternativa a los edulcorantes y se han extendido los cultivos de esta a otras regiones del mundo. De acuerdo a Sharma *et al.*, (2006) las hojas de *Stevia* contienen una gran cantidad de agua (80 a 85%), ácido ascórbico, β -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc, etc. Entre los productos químicos encontrados están la apigenina, austroinilina, avicularin, β -sitoesterol, ácido cafeíco, campesterol, cariofileno, centaureidin, ácido clorogénico, clorofila a, kaempferol, luteolina, quercetina, estigmasterol, ácidos orgánicos, polisacáridos, hormonas vegetales, así como metabolitos secundarios en una mezcla compleja de triterpenos, taninos, aceites volátiles, quercetina, ácido clorogénico, y glucósidos diterpenos (Alvarenga, 2015). Algunas de las estructuras de estos compuestos se muestran en la **Figura 4**. Dentro de los compuestos más abundantes se encuentran los glucósidos de esteviol que contienen al esteviol como estructura principal. Los glucósidos de esteviol son estructuralmente diterpenos de cuatro anillos con la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-13 y un grupo carboxilo en la posición C-19 (Rajasekaran *et al.*, 2008; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010).

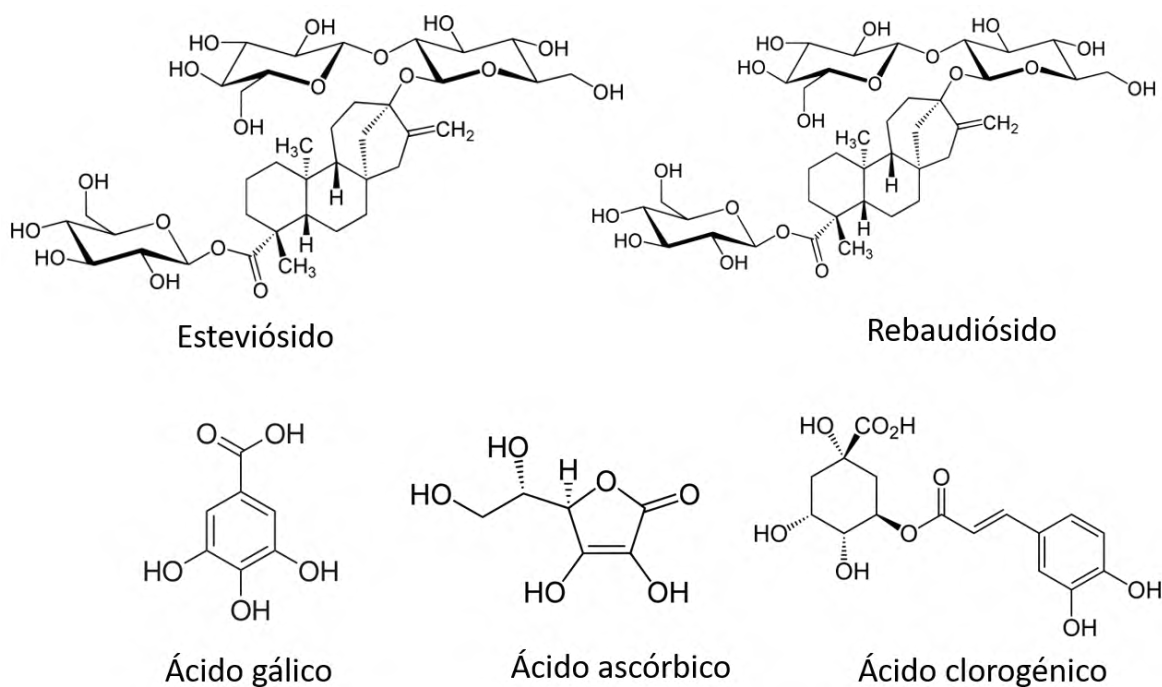


Figura 4. Estructuras de compuestos en *Stevia rebaudiana* (Alvarenga, 2015).

Los principales glucósidos de esteviol que están presentes en la hoja de *Stevia*, son el esteviósido y el rebaudiósido A, también contiene otros componentes minoritarios como los rebaudiósidos C, D, E y F y el dulcósido A. Woelwer-Rieck *et al.*, (2010) indicaron que el esteviolbiónido y el rebaudiósido B se forman durante los procesos de extracción. Las estructuras de glucósidos se localizan generalmente en las hojas de la planta y su composición varía de acuerdo a las condiciones ambientales y su especie (Brandle *et al.*, 1978).

Además de la capacidad de los edulcorantes, algunos estudios sugieren que los extractos de *Stevia*, están dotados de propiedades terapéuticas, ya que poseen metabolitos antihiperoglucémicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, con efectos antitumorales, antidiarreicos, diuréticos e inmunomoduladores (Chatsudthipong *et al.*, 2009). Estudios de toxicidad han demostrado que los esteviósidos no tienen efectos mutagénicos, teratogénicos o carcinógenos y que además presentan capacidad antimicrobiana, en contraste con los edulcorantes artificiales (González *et al.*, 2014).

2.5 *Moringa oleífera*

Moringa oleífera es un árbol caducifolio perteneciente a la familia Moringaceae, se originó en la India y se propagó en países del Sur de África (Goja *et al.*, 2013), es de raíces tuberosas y gruesas, hoja verde claro, de floración abundante (Morton, 1991). *Moringa oleífera* contiene ramnosa, glucosinolatos, isotiocianatos, (Bennet *et al.*, 2003), flavonoides como kaempferol, rhamnatin, isoquercitrina y kampferitrina (Goyal *et al.*, 2007), compuestos alcaloides como moringin y moringinina, además de compuestos específicos que contienen actividad hipotensora, anticancerosa y antibacteriana, que incluyen 4-(4'-O-acetil-a-L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato, 4-(a-L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato, niazimicin, pterygospermin, bencill isotiocianato y 4-(a-L-ramnopiranosiloxi) bencil glucosinolato (Fahey, 2005). En su composición también se encuentran vitaminas, minerales, fitoquímicos como carotenoides, fenoles, flavonoides y alcaloides. Las estructuras de algunos compuestos se muestran en

la **Figura 5**. Por lo tanto, la planta es reportada como antiulcerosa (Caceres, 1991), antiinflamatoria (Ezeamuzie *et al.*, 1996), antifúngica (Nwosu *et al.*, 1995), con actividades hipoglucémicas (Faizi *et al.*, 1994), con actividad antibiótica (Das *et al.*, 1957), antioxidante (Kumar *et al.*, 2003), además de presentar eficacia en la purificación del agua mediante floculación, sedimentación y antibiosis (Olsen, 1987). *Moringa oleífera* es conocida como un nuevo recurso natural para la alimentación por contener un alto poder nutritivo (Rashid *et al.*, 2008). Sus hojas son una fuente rica de β -caroteno, proteínas, vitamina C, calcio, potasio, ácido ascórbico, fenoles y carotenoides, los cuales actúan como una buena fuente de antioxidantes (Rashid *et al.*, 2007). Los diferentes compuestos presentes en todas las partes del árbol han sido utilizados en la medicina tradicional para la inflamación, enfermedades infecciosas, cardiovasculares, trastornos gastrointestinales, hematológicos y hepatorenales. También, se ha utilizado en la industria de los alimentos como aditivo, principalmente en cárnicos para aumentar sus propiedades nutritivas, aprovechando su gran cantidad de antioxidantes y sustancias antimicrobianas (Asensi *et al.*, 2017).

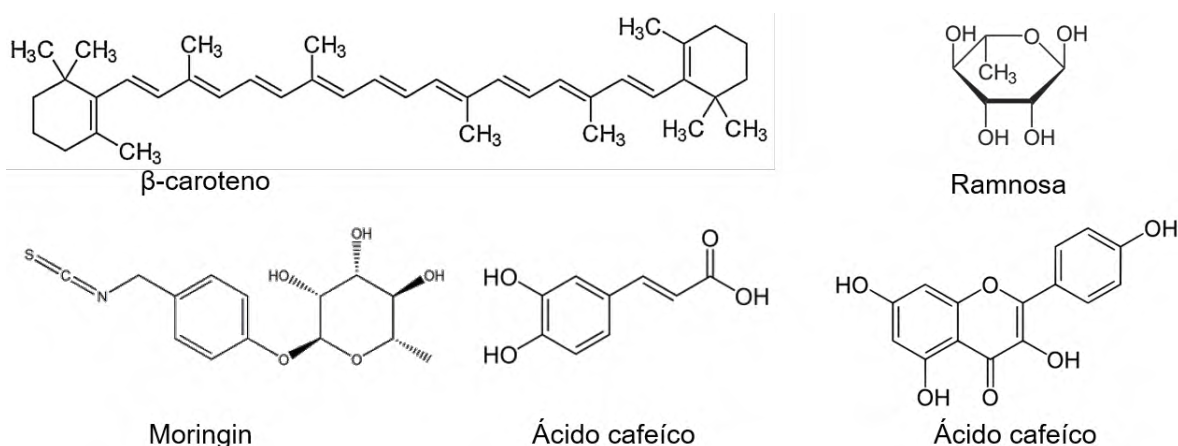


Figura 5. Estructuras de algunos compuestos presentes en *Moringa oleífera* (Goyal *et al.*, 2007).

III. ANTECEDENTES

Gardea *et al.*, (2002) reportaron por primera vez la posibilidad de utilizar extractos de plantas para la síntesis a escala nanométrica de metales en estado cerivalente. Desde entonces, se ha demostrado que los extractos de plantas son buenos estabilizadores de nanopartículas sin la necesidad del uso de estabilizantes comerciales, presentando excelentes propiedades que no aglomerar a las partículas.

Rodríguez *et al.*, (2013) mostraron que los glucósidos de esteviol, principales constituyentes de *Stevia rebaudiana*, actúan como plantillas biológicas en la síntesis de nanopartículas. Estas moléculas poseen la particularidad de interaccionar entre ellas mediante sus porciones hidrofílicas y los fragmentos hidrofóbicos, logrando formar estructuras nanométricas. Estas estructuras poseen la particularidad de ensamblarse con las especies inorgánicas, agregarse y formar unidades tubulares (nanovarillas o nanofibras).

Las plantas utilizadas en el presente trabajo han sido reportadas para síntesis de nanopartículas, principalmente metálicas. En el caso de *Stevia rebaudiana*, Mishra *et al.*, (2010), Varshney *et al.*, (2010), Yilmax *et al.*, (2011), Sadeghi *et al.*, (2015), utilizaron extractos de esta planta para la obtención de nanopartículas. En el caso de *Moringa oleífera*, Prasad *et al.*, (2011), Anad *et al.*, (2015), Elumalai *et al.*, (2015), Sujitha *et al.*, (2015), Ezhilarasi *et al.*, (2016), Matinise *et al.*, (2017) sintetizaron nanopartículas metálicas con extractos de esta planta.

La síntesis de NPs-ZnO ha sido reportada por Lakshmeesha *et al.*, (2014), quienes propusieron mecanismos para esta síntesis, los cuales implican la reducción de iones de nitrato de zinc para formar compuestos intermediarios, complejos con grupos OH fenólicos, presentes en taninos hidrolizables, que posteriormente sufren oxidación, que se forma con la reducción de zinc a

nanopartículas de óxido de zinc. La formación de NPs-ZnO puede estar relacionada con interacciones entre ácidos fenólicos, tales como ascórbico, glucósidos y ácido gálico, Abdul *et al.*, (2014) reportaron la síntesis de NPs-ZnO llevando el producto de reacción a calcinación, y proponiendo un mecanismo de reacción redox.

Sentikumar *et al.*, (2014), Morales *et al.*, (2016), Ramesh *et al.*, (2015). Elumalai *et al.* (2015) y Matinise *et al.*, (2017) reportaron la formación de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extractos de *Moringa oleífera*. Estudios por FT-IR del extracto acuoso de las hojas, revelaron la presencia de fitoconstituyentes como aminoácidos, alcaloides, flavonoides y fenólicos. Los autores consideraron a estas moléculas como activas para la estabilización de las nanopartículas al interactuar con la superficie del zinc. En 2016, se propone un nuevo mecanismo que se muestra en la **Figura 6**, explicado con base a biomoléculas como fenoles, flavonoides, carotenoides, presentes en los extractos de las plantas, que actúan como agentes de ligación. De acuerdo al mecanismo, los grupos hidroxilo de las biomoléculas forman complejos agentes con las sales precursoras y se ligan con iones de zinc, que a su vez comienzan el proceso de nucleación y posteriormente causa la reducción y la configuración de las NPs. La temperatura también tiene un papel importante porque el sistema sufre una descomposición directa cuando se calcina, además proponen una temperatura de 400 °C, que conduce a la liberación de las NPs-ZnO. Este mecanismo es propuesto por Karnan *et al.*, 2016.

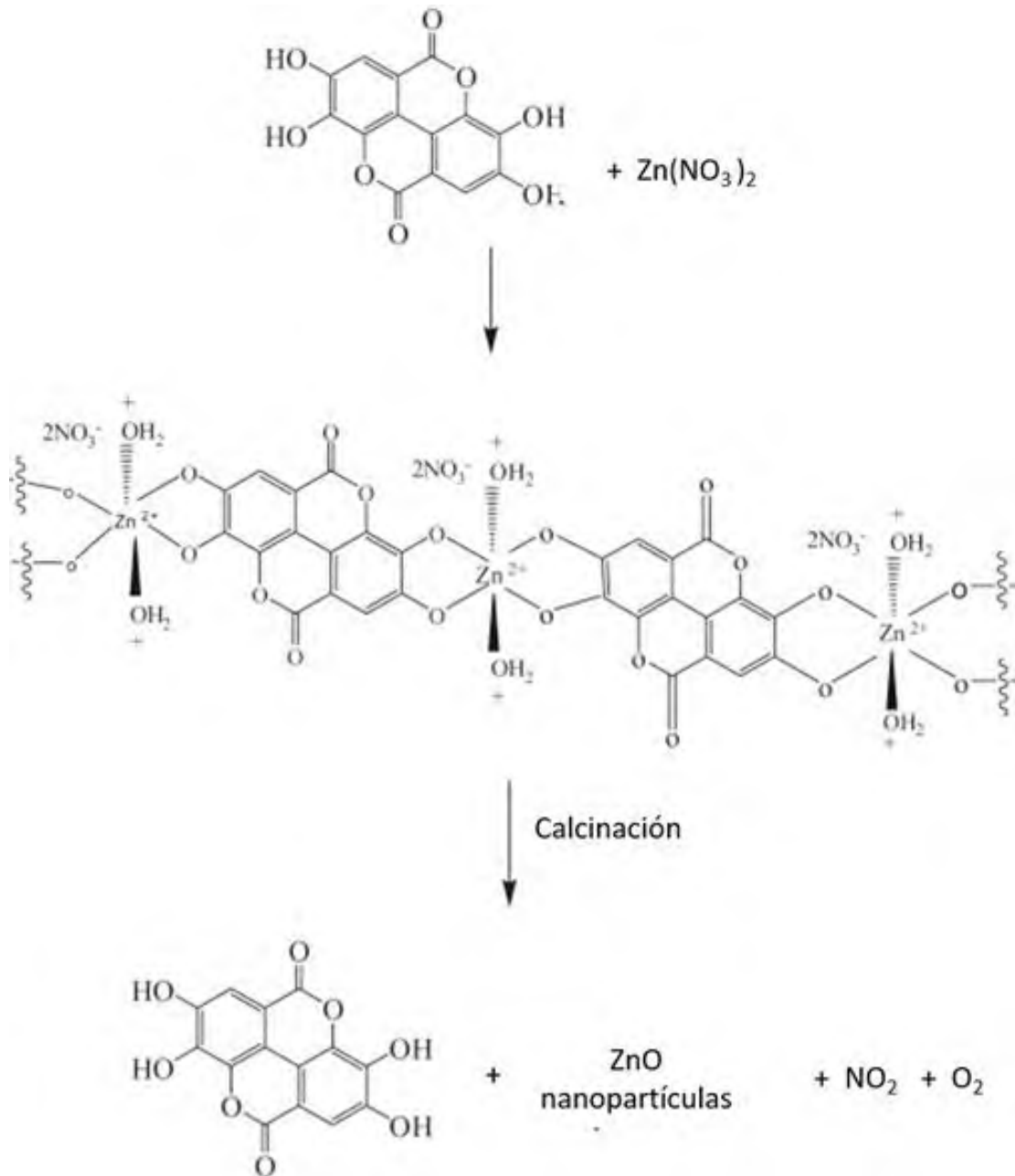


Figura 6. Mecanismo propuesto por Karnan *et al.*, (2016)

IV. HIPÓTESIS

Los extractos de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera* contienen algunos metabolitos que son capaces de reducir sales de nitrato de zinc a nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) estabilizadas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Obtener nanopartículas de óxido de zinc a partir de extractos de *Stevia rebaudiana* y/o *Moringa oleífera*.

5.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de ZnO usando extractos hidroalcohólicos de *Stevia rebaudiana* y/o *Moringa oleífera*.
- Evaluar fracciones de los extractos de *Stevia rebaudiana* y/o *Moringa* para la obtención de nanopartículas de ZnO.
- Caracterizar estructural, morfológica y térmicamente a las nanopartículas de ZnO.
- Evaluar la actividad biológica de las nanopartículas de ZnO.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Obtención del material vegetal

Se utilizaron hojas de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera*, se secaron y se llevaron a peso constante, posteriormente se trituraron. Se realizó una extracción hidroalcohólica considerando una relación de 1:10 entre el material vegetal y el disolvente. La solución hidroalcohólica utilizada fue metanol-agua (80:20). La extracción se realizó durante 24 h. El extracto se filtró a vacío, usando mallas y por último papel de poro fino. Los disolventes del extracto se evaporaron a presión reducida utilizando un rotavapor marca Buchi 300 a 50 °C. Los extractos se secaron a 40 °C y se conservaron en congelación hasta su uso.

6.1.1 Obtención de fracciones con diferente polaridad

A partir de los extractos se realizaron extracciones secuenciales con polaridad creciente. Esto se detalla en la **Figura 7**. Para ello, se diluyeron por separado 2 g de cada extracto en 50 mL de agua. A esta dilución se le agregó la misma cantidad de hexano grado reactivo en un embudo de separación, se agitó y se dejó reposar hasta separar. Una vez separada la fracción orgánica, la fracción acuosa se le realizó el mismo procedimiento anterior, pero con acetato de etilo. Después de la separación de la fase con acetato de etilo, la fase acuosa fue combinada con n-butanol, quedando al final una fase acuosa residual. Las fases orgánicas y la fase acuosa residual se guardaron para su caracterización y para la síntesis de NPs.

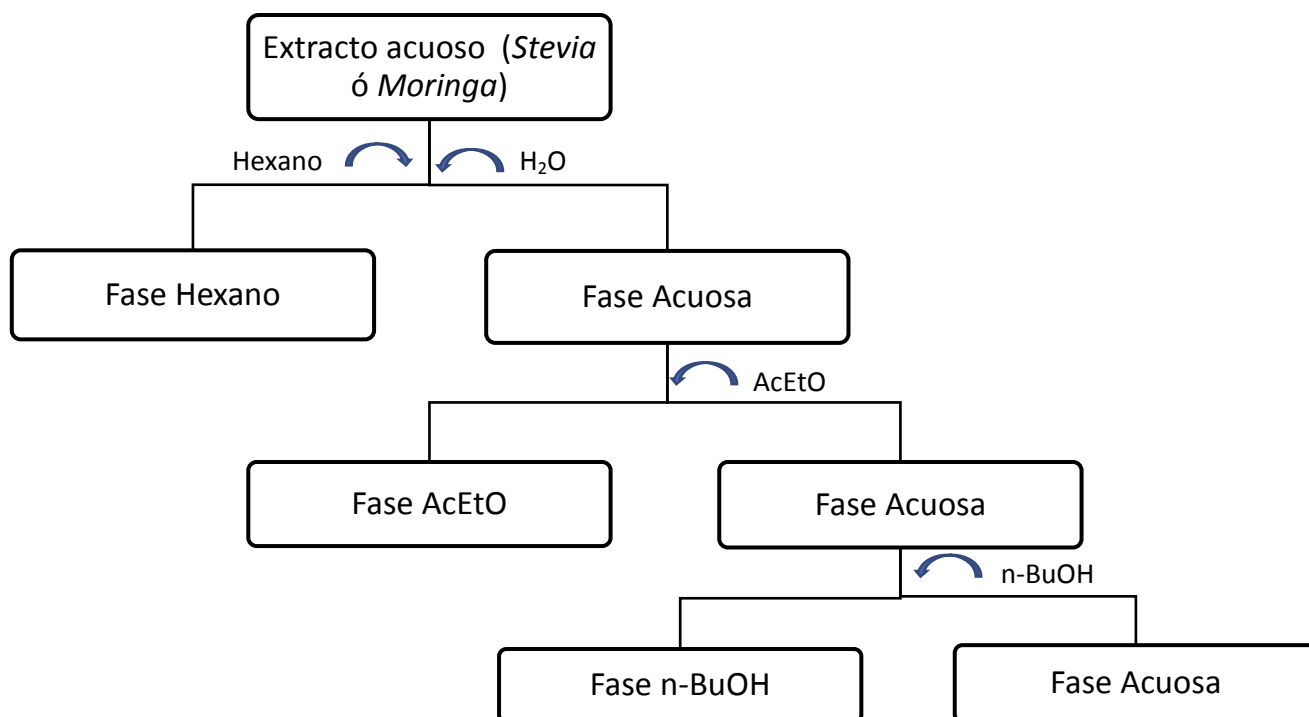


Figura 7. Fraccionamiento del extracto por polaridad creciente

6.1.2 Caracterización por placa fina de los extractos

Para la caracterización de los extractos se realizaron cromatografías en capa fina (TLC) en acetato de etilo-acetona-diclorometano-metanol-agua (40:30:12:10:6 v/v/v/v) para la identificación de fenoles.

Para la separación de glucósidos de esteviol los extractos obtenidos S, SH, SA, SB, SAR, se resuspendieron en agua. Posteriormente se aplicaron 5 μ L en la placa cromatográfica de sílica gel 60 F254, como estándares se utilizaron esteviósido (S3572-Sigma Aldrich) y rebaudiósido A (1432-Sigma Aldrich). Para la separación de las muestras las placas se colocaron en una cámara cromatográfica saturada utilizando la fase móvil que consistió en acetato de etilo, etanol, acetona y agua (10:2:4:4 v/v/v/v). Las placas se revelaron con una solución de orcinol al 0.5% el cual se prepararon en metanol: ácido sulfúrico (95:5, v/v), posteriormente se calentó ligeramente (Reis *et al.*, 2011). Para la separación de los fenoles se

aplicaron 165 µg de cada fracción en la placa cromatografía, se utilizó la fase móvil acetato de etilo:acetona:diclorometano:metanol:H₂O (40:30:12:10:8, v/v/v/v/v). Se utilizó como estándar el ácido clorogénico (500590-Sigma-Aldrich) y ácido gálico (27645-Sigma-Aldrich), las placas fueron reveladas con cloruro férrico al 1% el cual fue preparado en metanol:H₂O (1:1, v/v).

La identificación de glucósidos de esteviol (GE) y fenoles se realizó por comparación con los estándares empleados y su factor de retención (R_f). Para determinar el R_f se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{L_c}{L_s}$$

Donde:

L_c = Longitud que recorrió cada compuesto, desde la zona de punteo de la muestra hasta la altura alcanzada.

L_s = Longitud que recorrió el disolvente desde la zona de punteo hasta el frente del solvente.

6.1.3 Cuantificación de fenoles

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo siguiendo la técnica de Folin-Ciocalteu Shohael *et al.*, (2006) con algunas modificaciones. Se utilizaron 50 µL de muestra diluida, 1120 µL de agua desionizada, 50 µL del reactivo de Folin, la mezcla se reposó por 6 min y posteriormente se agregaron 234 µL de carbonato sódico al 20% (p/v). Después de 30 minutos se cuantificaron en un espectrofotómetro UV-Vis a 760 nm. El contenido de compuestos fenólicos se determinó utilizando una curva de calibración de ácido gálico (**Figura 8**), a diferentes concentraciones (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25, 30, 35) utilizando como solución estándar una solución de ácido gálico a una concentración de 1 mg/mL⁻¹

disuelta en agua destilada. Los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico/g de muestra. (mg EAG/g_{Ext}).

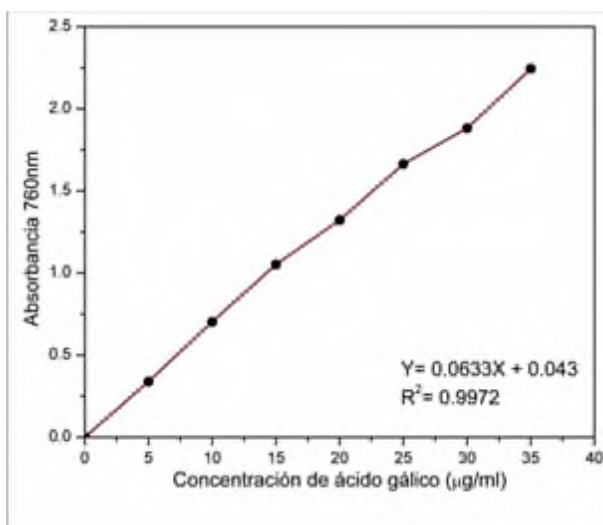


Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico

6.2 Síntesis de nanopartículas

Se realizó un análisis previo de las condiciones de obtención de las nanopartículas usando *Stevia rebaudiana*, principalmente del tiempo de reacción. Se llevaron a cabo tres reacciones a 1, 2 y 3 h. Los productos de reacción fueron secados durante 3 h a una temperatura de 110 °C. En el caso de *Moringa oleífera* también se hizo un análisis previo de la temperatura de reacción con 60 °C y 80 °C, por lo que se determinaron las siguientes condiciones de experimentación. 2 g de extracto de *Moringa* en 50 mL de agua destilada fue calentado a 60 °C y a 80 °C por separado, se le adicionó nitrato de zinc hexahidratado ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) 1M, adquirido de Aldrich Sigma Co. Los productos de reacción fueron secados durante 3 h a una temperatura de 110°C.

6.3 Caracterización de las síntesis

La caracterización de la materia prima y los productos de reacción se caracterizaron por UV-Vis, FT-IR, DRX y SEM para comprobar su composición.

6.3.1 Espectroscopia UV-Vis

Los productos de reacción, fueron analizados mediante un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop) se realizó un barrido de 200 nm a 800 nm.

6.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se utilizó para identificar los grupos funcionales presentes en la sal precursora, en los extractos de las plantas utilizadas, así como en sus respectivas fracciones. Se analizaron también los productos de reacción que se generaron y películas de almidón elaboradas con los productos de reacción. Los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro Dynascan modelo Spectrum 100, Perkin Elmer, utilizando un interferómetro de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Los espectros FTIR fueron obtenidos en un rango de 4000 a 515 cm^{-1} .

6.3.3 Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X se usó para determinar las señales correspondientes a los planos de difracción del óxido de zinc. Esta técnica permitió deducir la formación del compuesto. El análisis se realizó con los productos de reacción obtenidos, así como de las películas de almidón elaboradas con los productos de reacción. Los patrones de difracción se obtuvieron con un difractómetro de Rayos X marca Bruker Axs, modelo D8 Advance, con un generador de radiación de $\text{Cu K}\alpha$, con filtro de Ni y rejillas de 1 mm y para las películas se usaron rejillas de 6 mm. El análisis de los productos de reacción se llevó a cabo a 40 kV y 30 mA, desde 5 a 80° en 2θ , con un tamaño de paso de 0.1 y para las películas de 10 a 70 ° en 2θ con un tamaño de paso de 0.1.

6.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

Mediante esta técnica se analizaron los cambios durante la descomposición térmica de los extractos de las plantas, así como de los productos de reacción. Esto permitió seleccionar una temperatura adecuada para la síntesis, así como la concentración del compuesto ZnO en el producto de reacción y las principales temperaturas de degradación. Se utilizó un analizador térmico simultáneo STA 6000 de Perkin Elmer. Muestras de 10 ± 0.5 mg se sometieron a un calentamiento de 30 a 800 °C, a una velocidad de 20 °C/min, bajo una atmósfera inerte de nitrógeno con flujo de 20 ml/min.

6.3.5.1 Películas de almidón

Se realizaron películas de almidón, mezclando glicerol con agua en agitación constante. Posteriormente, se agregó el producto de reacción en un 0.5%, así para cada fracción, hasta lograr una mezcla homogénea. A continuación, se añadió almidón de plátano y se llevó a una temperatura de 85 °C durante 30 minutos, se vació en una superficie de teflón, y se secó a 50 °C durante 5 horas. Las películas se almacenaron para su posterior análisis.

6.3.5 Microscopía electrónica

Con el fin de observar el tamaño, morfología y composición de las NPs-ZnO, se analizaron muestras de los productos de reacción en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-IT300LV. Para observar la dispersión de las NPs-ZnO fue necesaria una preparación previa, la cual consistió en tomar partes pequeñas de las películas de almidón que contenían a las NPs-ZnO y sumergirlas en nitrógeno líquido, para fracturadas dentro del mismo. Las muestras fueron analizadas en la zona de fractura criogénica. Los estudios por SEM fueron realizados dentro de las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), unidad Oaxaca.

6.4 Determinación del efecto citotóxico de las nanopartículas de ZnO.

Se realizaron pruebas biológicas de los productos de reacción y de los extractos de las plantas. Inicialmente, se tomó una muestra de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 resuspendida en medio de cultivo, suplementado MEM (10 % de suero fetal bovino y antibiótico) y se colocó 50 μ l con 100,000 células para cada pozo en cajas de 20 pozos. Se incubó 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂, para permitir su adherencia. Se preparó la muestra (nanopartículas de ZnO, extracto de *Stevia* y *Moringa*), en medio MEM y se añadió por triplicado a cada pozo. Se tomó en cuenta un control por cada muestra problema. De tal manera que al añadir 50 μ L al pozo tuviera las concentraciones 0.5 μ g/ml y diluciones sucesivas 1:20. Se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h para permitir que la sustancia actúe en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo. Se descartó el medio. Se añadió 10 μ L de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (0.5 mg/ml) en medio MEM. Se incubó por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán. Se descartó el medio y se agregó DMSO para su lectura en cajas de 96 pozos. Los cultivos se dejaron a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán fueron disueltos y se tomó su lectura a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracto hidroalcohólico de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera*

Se utilizaron 1680 g y 670 g de hojas secas de *S. rebaudiana* y *M. oleífera* respectivamente, para obtener un extracto hidroalcohólico (**Figura 9**). Se recuperaron 552 g de extracto de *Stevia* y 145.5 g de extracto de *Moringa*, lo que indica un rendimiento de extracción para *Stevia* de 32.8%, rendimiento mayor de lo expuesto por Marín *et al.*, (2004) y 21.6% para *Moringa*.

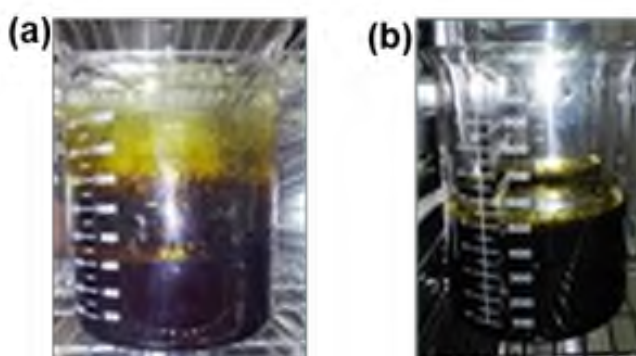


Figura 9. Extractos hidroalcohólicos. (a) *S. rebaudiana* y (b) *M. oleífera*.

7.1.1 Extracción líquido-líquido de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera*

Se realizaron extracciones líquido-líquido a partir del extracto hidroalcohólico de ambas plantas por separado, para fraccionar y separar a los metabolitos presentes en los extractos (ver **Figura 7** en la parte de metodología). Esto con la finalidad de fraccionar por polaridad (no polar/medianamente polar/polar) a los compuestos de los extractos. Los rendimientos de las fracciones con los extractos de *Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera* se muestran en la Tabla 1. Para las fracciones de *Stevia*, se observa un rendimiento mayor para la fracción acuosa residual con un 48.1 %, seguido de la fracción n-butanol con un 39.2 %. En el caso de *Moringa*, se obtuvo un rendimiento mayor para la fracción acuosa residual, hasta un 63.8 %, seguido de la n-butanol con un 20.1 %, respecto a la fracción de acetato de etilo de *Stevia* se obtuvo un rendimiento menor esto puede deberse porque contiene

familias de compuestos mayormente polares. El comportamiento de extracción en ambas plantas es similar.

Tabla 1. Rendimiento de extracción con los extractos de *Stevia* y *Moringa*.

Fracciones de <i>Stevia</i>	Rend. (%)	Fracciones de <i>Moringa</i>	Rend. (%)
S	32.8	M	21.6
SH	2.30	MH	4.00
SA	10.10	MA	1.30
SB	39.2	MB	20.1
SAR	48.1	MAR	63.8

7.2. Cromatografía en capa fina para identificación de compuestos fenólicos y glucósidos de esteviol presentes en los extractos de *Stevia*

La identificación de los compuestos fenólicos para el extracto (S) y las fracciones de *Stevia* se realizó por cromatografía en capa fina, utilizando ácido clorogénico (Rf:0.4) y ácido gálico (Rf:0.85) como compuestos de referencia. Al comparar los Rf obtenidos de las muestras con los estándares, se observó que posiblemente el extracto crudo (S), la fracción acetato de etilo (SA) y acuosa residual (SAR) contienen clorogénico y ácido gálico. El extracto crudo S mostró 7 bandas, la fracción SH no mostró bandas, SA presentó 7 bandas, SAR 2 bandas y SB 7 bandas que dieron positivo con el revelador cloruro férrico. Lo que se correlaciona con el contenido total de compuestos fenólicos mostrados en la Tabla 2. El contenido de fenoles totales (FT) del extracto crudo de *Stevia* (S) fue de 129.8 GAE g⁻¹ muestra seca. Shukla *et al.*, (2012) reportaron un FT de 56,74 mg GAE g⁻¹ muestra seca. Gawel-Bęben *et al.*, (2015) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos en extractos de hojas secas de *S. rebaudiana* y reportaron fenólicos como ácido cafeico, clorogénico y ferúlico; y flavonoides como catequina, epicatequina, luteolina y rutina.

Los resultados mostrados en la **Figura 10** indican que S y las fracciones SA y SAR contienen ácido gálico. De acuerdo a Abdul *et al.*, (2014), el ácido gálico es un compuesto descrito como facilitador para la síntesis de nanopartículas, así también otros compuestos químicos como catequina y ácido clorogénico.

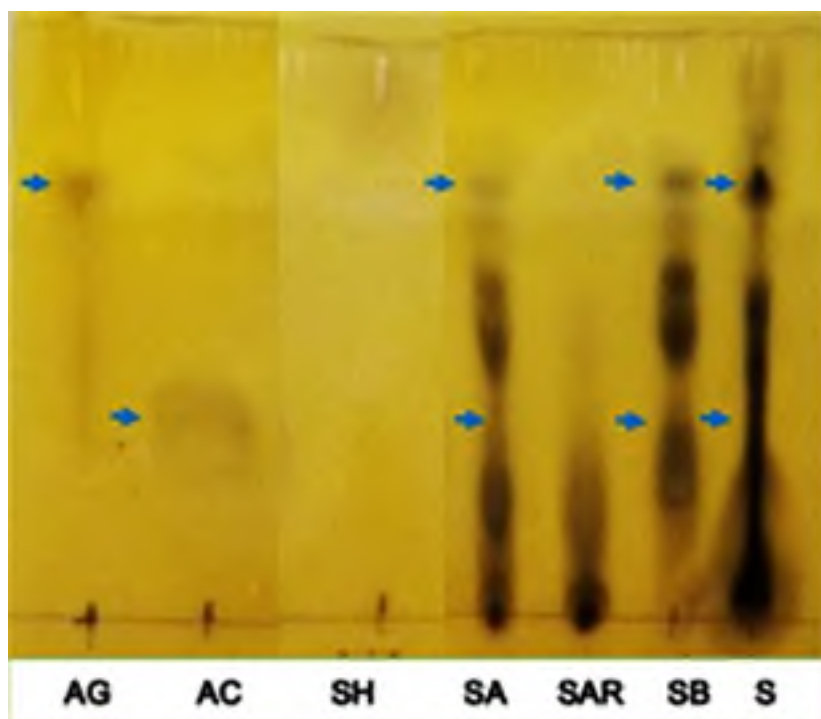


Figura 10. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico y de las fracciones de *S. rebaudiana* con el sistema de elución: acetato de etilo-etanol-acetona-H₂O (15:3:6:6, v/v/v/v) revelado con cloruro férrico al 1%. Las etiquetas indican las fracciones con hexano, acetato de etilo, acuosa residual y n-butanol (SH, SA, SAR y SB) además del extracto crudo (S) y ácido gálico (AG) y ácido clorogénico (AC).

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos en las fracciones del extracto de *Stevia rebaudiana*

Fracción	µgEAG/(mgExt)
S	129.8
SH	20.6
SA	149.6
SB	136.9
SAR	131.9

En la **Figura 11** se muestran los resultados de la cromatografía en capa fina de las fracciones para la identificación de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana*. Se utilizaron como estándar al esteviósido y rebaudiósido A, con R_f de 0.4 y 0.3, respectivamente. La coloración morada que indica la presencia de esteviósidos y

rebaudiósidos ocurre por la unión del orcinol con los glucósidos de esteviol. Al comparar los Rf obtenidos de las muestras con los estándares se observó que en la fracción n-butanol (SB) permanecían mayoritariamente los glucósidos de esteviol, además de que la fracción SA se revelaron otros compuestos glicosilados que se observan en coloración café (**Figura 11**). Ramesh *et al.*, (2015) y Rodríguez *et al.*, (2013) reportan contenidos hasta 21% para esteviósido y hasta 12% para rebaudiósido A en la planta de *Stevia*. De acuerdo a Rodríguez *et al.*, (2013) estos compuestos tienen la capacidad de actuar como plantillas biológicas para la síntesis de nanopartículas.

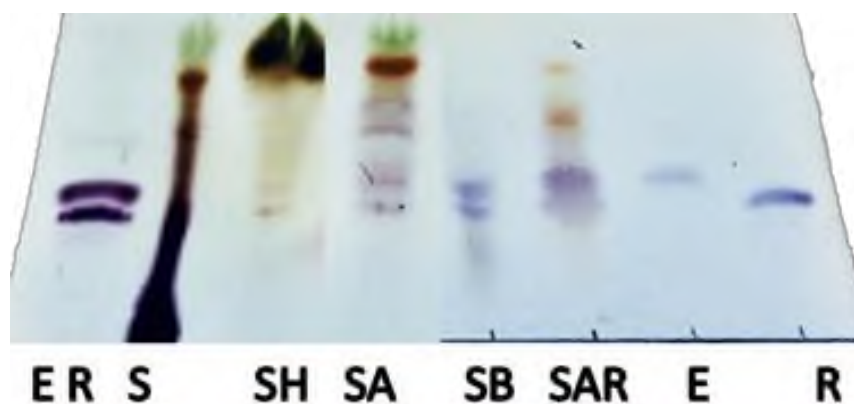


Figura 11. Cromatografía en capa fina de extracto hidroalcohólico y fracciones de *S. rebaudiana* revelado con orcinol al 0.5%. Sistema de elución: acetato de etilo-etanol-acetona-H₂O (15:3:6:6, v/v/v/v). Donde los estándares son etiquetados como E: esteviósido y R: rebaudiósido A y las fracciones son etiquetas como: SH fase orgánica de hexano, SA fase orgánica de acetato de etilo, SB fase orgánica de n-butanol y SAR fase acuosa residual.

7.2.1 Cromatografía en capa fina para compuestos fenólicos con los extractos de *Moringa*

La **Figura 12** muestra los resultados de la cromatografía en capa fina de las fracciones de *Moringa*. Al comparar los Rf obtenidos de las muestras con los estándares se observó que posiblemente el extracto crudo (M), la fracción n-butanol (MB), acuosa residual (MAR) contienen clorogénico y sólo la fracción n-butanol posiblemente presenta ácido gálico. El extracto crudo M presentó 6

bandas, la fracción MH no presentó bandas, MA presentó 3 bandas, MB 4 bandas, y MAR 3 bandas que dieron positivo con el revelador cloruro férrico. Lo que se correlaciona con el contenido total de compuestos fenólicos indicados en la Tabla 3. Guzmán *et al.*, (2017) han reportado la presencia de ácido gálico, ácido cumárico, rutina y ácido clorogénico en la planta de *Moringa*, con contenidos altos de los mismos. Los compuestos fenólicos han sido reportados como metabolitos reductores y estabilizantes de precursores metálicos (Landeros *et al.*, 2015).

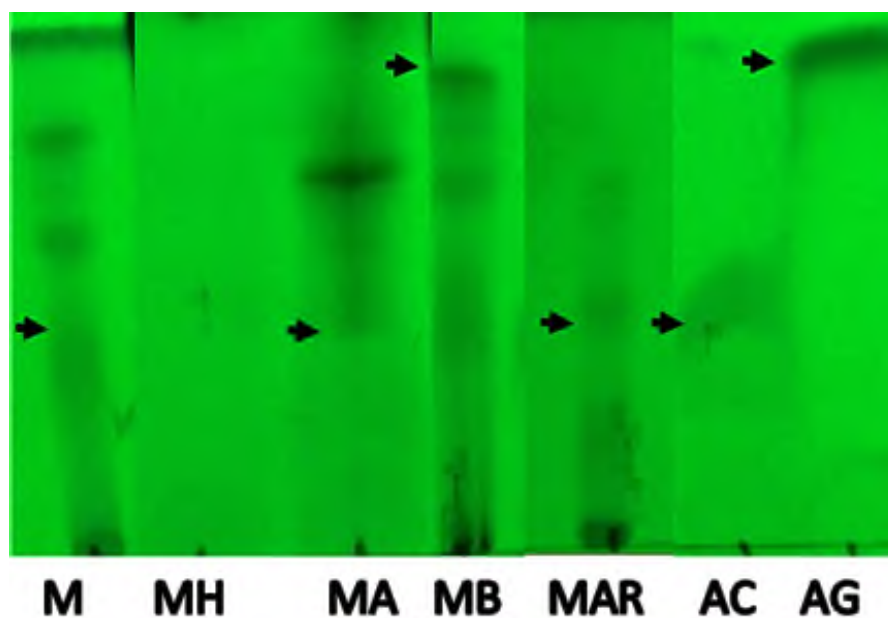


Figura 12. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico y fracciones de *M. oleífera* observada a 254 nm con el sistema de elución acetato de etilo-etanol-acetona-H₂O (15:3:6:6, v/v/v/v). M, MH, MA, MAR, AC y AG.

Los datos mostrados en la Tabla 3 indican que las mayores concentraciones de fenoles se obtuvieron en la fase de n-butanol (MB). Con el extracto crudo (M) se obtuvieron 64.9 mg GAE g⁻¹ muestra seca. Guevara-Medina y Rovira-Quintero (2012), reportaron valores promedio de 18.865 mg GAE g⁻¹ muestra seca en el extracto crudo de *Moringa*. De acuerdo a Katiyar y Mukhtar (1997) los factores que influyen en la cantidad de polifenoles presentes en una hoja pueden variar de acuerdo a las condiciones geográficas y procesamiento. Adicionalmente, el

método de Folin-Ciocalteu no es muy específico, debido a una gran cantidad de sustancias interferentes, que incluyen, en el caso de *Moringa* y *Stevia*, azúcares, ácidos orgánicos e iones metálicos. Además, la influencia del agente de extracción no es despreciable (Prior *et al.*, 2005; Wölwer-Rieck, 2012). Por lo tanto, no es sorprendente que los resultados del contenido de FT en *S. rebaudiana* y *Moringa oleífera* difieran significativamente de algunos ya reportados cuando se utiliza este ensayo. Sin embargo, la técnica es exclusiva para conocer el contenido en la muestra utilizada, conocer la concentración de las estructuras de tipo fenólicas y relacionarlas con la síntesis de NPs.

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos en las fracciones del extracto de *Moringa oleífera*

Fracción	µg EGA / mg extracto
M	64.9
MH	70.8
MA	79.3
MB	125.3
MAR	78.1

7.3 Análisis de FT-IR para el extracto de *Stevia rebaudiana* y sus fracciones

Se obtuvieron espectros de infrarrojo, con el objetivo de identificar los principales grupos funcionales de las fracciones, asociarlos con algunos compuestos bioactivos e identificar si presentan interacción en la síntesis de NPs. El análisis FT-IR del extracto de *Stevia* y de cada una de las fracciones se muestra en la **Figura 13**. En el inciso (a) que representa al extracto crudo de *Stevia*, la banda en 3619 cm^{-1} está relacionada con el agua de la muestra, también con los hidroxilos de la celulosa presentes en la planta. La banda en 1703 cm^{-1} corresponde a una vibración de estiramiento del grupo carbonilo. La señal a 1444 cm^{-1} corresponde a la vibración característica de C=C. La señal de vibración de los grupos fenólicos se observa 1269 cm^{-1} . Las vibraciones de alcoholes secundarios, así como bandas correspondientes a alcoholes, terciarios se presentan en 1161 cm^{-1} , 1149 cm^{-1} y primarios en 1020 cm^{-1} . También se puede observar la vibración de flexión

del enlace -CH en 816 cm^{-1} . Este espectro concuerda con lo reportado por Bravo *et al.*, (2009).

En el espectro (b) correspondiente a la fracción hexano de *Stevia*, se observa la banda de absorción del grupo OH, menos intenso que en el extracto crudo, ya que la fracción contiene compuestos no polares. Una banda intensa en 2948 cm^{-1} correspondiente a la vibración asimétrica del enlace -CH , que puede estar relacionado con las clorofilas que se arrastran en esta fracción. El pico para el grupo carbonilo se presenta en 1738 cm^{-1} así como la vibración de flexión del enlace C-O en 1212 cm^{-1} , aunque no tan intensa como en el extracto crudo, este enlace es típico de fenoles. Además se observa un pico en el intervalo 1091 cm^{-1} , que están relacionados con residuos disacáridos y alcoholes primarios. En 792 cm^{-1} corresponde a vibración características de alquenos.

El espectro (c) correspondiente a la fracción acetato de etilo (SA) presenta un pico intenso en 3688 cm^{-1} , atribuido a los grupos OH del agua o de la celulosa. Una vibración de estiramiento del grupo carbonilo en 1731 cm^{-1} . La vibración de flexión de C-O presente en anillos, así como picos de enlaces que corresponden a alcoholes primarios en 1040 cm^{-1} .

El espectro (d) corresponde a la fracción n-butanol (SB), presenta vibraciones de estiramiento de los grupos OH de manera intensa, así como el pico característico del enlace CH que corresponde a alcanos de cadena larga. En 1731 cm^{-1} se observa un pico intenso en comparación con las demás fracciones correspondiente con el grupo carbonilo, que está presente en los glucósidos de esteviol, una familia importante en la composición del extracto de *Stevia* (Goyal *et al.*, 2010). Los picos correspondientes a fenoles en 1226 cm^{-1} y alcoholes primarios en 1106 cm^{-1} se observan también de forma intensa. Esta fracción es la

que presenta la mayor cantidad de vibraciones, en comparación con las fracciones antes descritas.

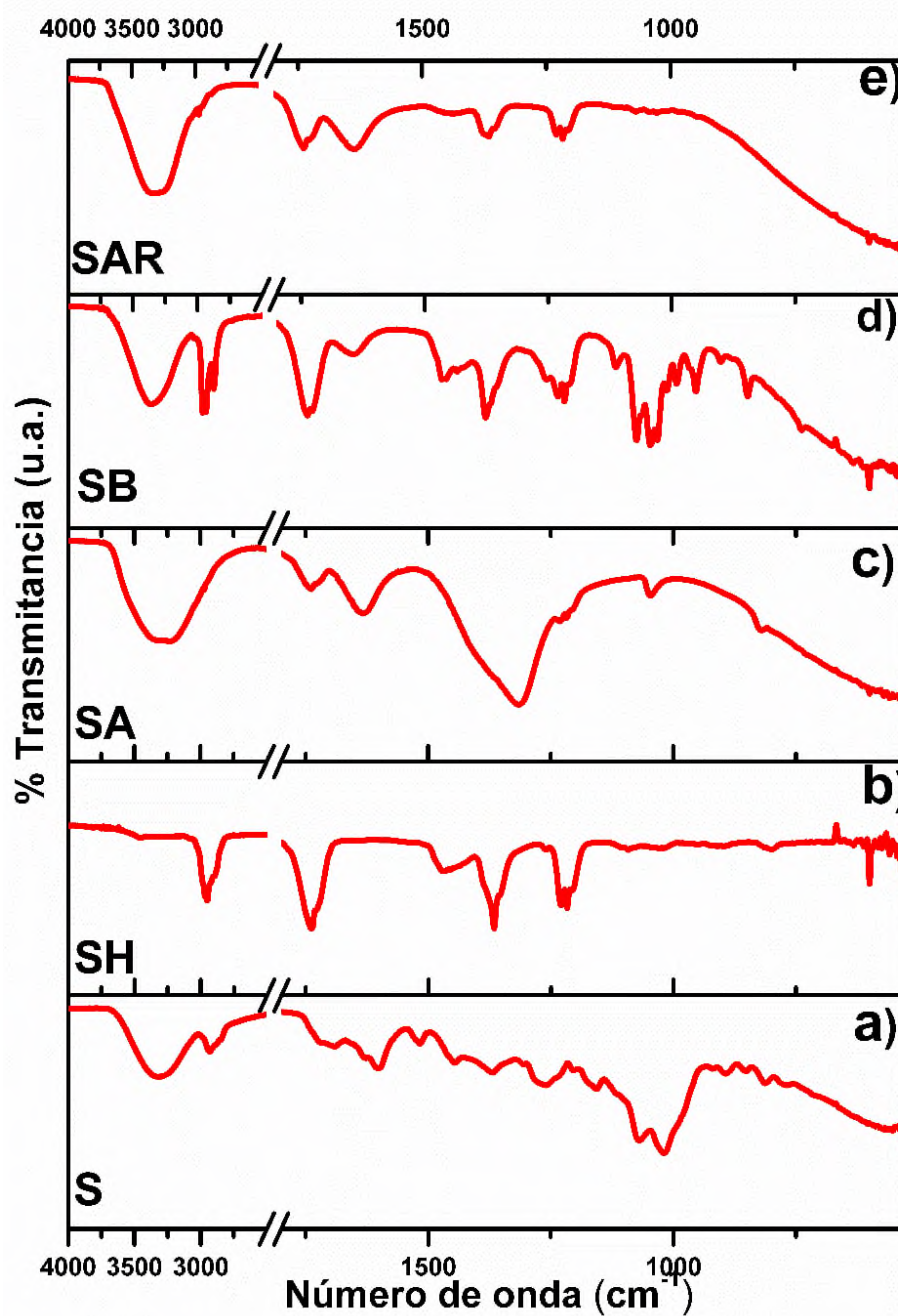


Figura 13. Espectros de FT-IR: (a) extracto de *Stevia*, (b) fracción hexano, (c) fracción acetato de etilo, (d) fracción n-butanol y (e) fracción acuosa residual.

La fracción acuosa residual del extracto de *Stevia* se observa en la figura 13 (e). Se muestra la absorción de humedad en la muestra por la señal en 3400 cm^{-1} . En esta fracción se arrastran todos los metabolitos que son solubles en agua, como los disacáridos, aminas, alcoholes, fenoles, mostrando picos en 1219 cm^{-1} en 1020 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} , correspondiente a los grupos C-O-C, C-O, C-OH respectivamente.

En la **Figura 14** se muestra el espectro FT-IR de ácido gálico, de esteviósido y de rebaudiósido. Estas sustancias son puras y de grado reactivo y de acuerdo a la literatura estas sustancias se encuentran con naturalidad en el extracto (Soejarto *et al.*, 1982). Se usaron con la finalidad tener una referencia y asociar algunos picos de absorción en el análisis previo.

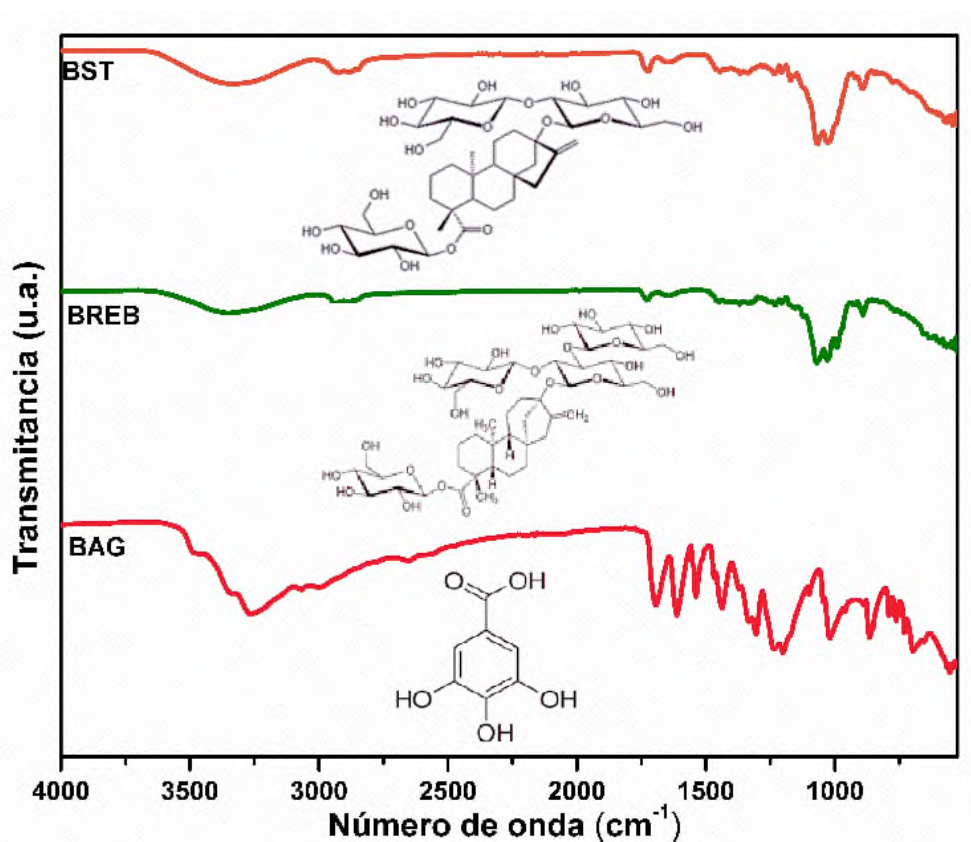


Figura 14. Espectros de FTIR para estándares, esteviósido (BST), rebaudiósido (BREB) y ácido gálico (BAG) con sus respectivas estructuras.

En el espectro de ácido gálico (BAG) de la **Figura 14** se evidencian las bandas de los enlaces C=O en 1700 cm^{-1} , la vibración del enlace C-O-C en 1525 cm^{-1} , la presencia del enlace C=C de los anillos aromáticos en 1423 cm^{-1} , así como la vibración de OH en 1200 cm^{-1} . El espectro del rebaudiósido muestra una banda en 1050 cm^{-1} que pertenece al modo vibracional del enlace C-O y en 1200 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace C-OH. El espectro del esteviósido presenta una banda en 1700 cm^{-1} , la cual corresponde al enlace C=O, así como bandas de absorción para C-O-C y C-OH. Estos grupos funcionales tienen la particularidad de ser reductores.

7.4 Espectros de FT-IR para el extracto de *Moringa oleífera* y sus fracciones

Los espectros de FT-IR del extracto de *Moringa* y sus fracciones se muestran en la **Figura 15**.

El espectro del extracto crudo de *Moringa* (M) contiene un pico intenso en 3696 cm^{-1} , el cual está asociado a la humedad de la muestra y a compuestos que contienen hidroxilos como la celulosa. El pico en 2905 cm^{-1} es un grupo presente en alcanos, que puede encontrarse en la lignina que forma parte estructural de la planta. En 1643 cm^{-1} se presenta la absorción del ácido carboxílico. Una banda en 1200 cm^{-1} corresponde a fenoles (Abdul *et al.*, 2014). En 1111 cm^{-1} se observan alcoholes secundarios y en 1058 cm^{-1} alcoholes primarios, estos últimos reportados por Aquino *et al.*, (2010) como grupos importantes para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas. Morales *et al.*, (2016) reportaron que compuestos que contenían grupos hidroxilos son útiles como agentes reductores de iones metálicos. Yuvakkumar *et al.*, (2016) reportan a los alcoholes como agentes ligantes en el proceso de síntesis de nanopartículas.

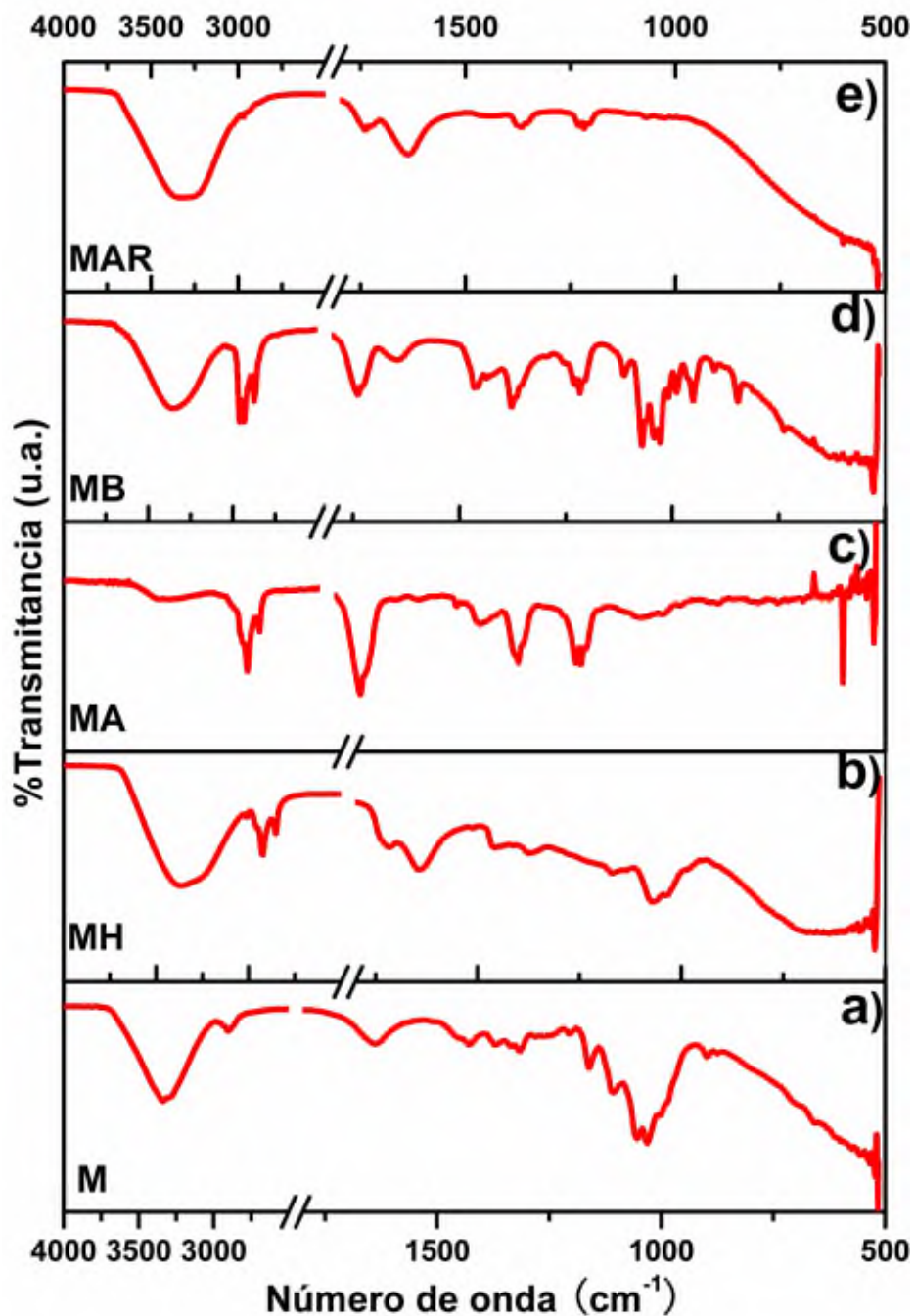


Figura 15. Espectros FTIR del extracto crudo de *Moringa* y sus fracciones.

El espectro del extracto crudo de *Moringa* (M) contiene un pico intenso en 3696 cm⁻¹, el cual está asociado a la humedad de la muestra y a compuestos que contienen hidroxilos como la celulosa. El pico en 2905 cm⁻¹ es un grupo presente en alcanos, que puede encontrarse en la lignina que forma parte estructural de la

planta. En 1643 cm^{-1} se presenta la absorción del ácido carboxílico. Una banda en 1200 cm^{-1} corresponde a fenoles (Abdul *et al.*, 2014). En 1111 cm^{-1} se observan alcoholes secundarios y en 1058 cm^{-1} alcoholes primarios, estos últimos reportados por Aquino *et al.*, (2010) como grupos importantes para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas. Morales *et al.*, (2016) reportaron que compuestos que contenían grupos hidroxilos son útiles como agentes reductores de iones metálicos. Yuvakkumar *et al.*, (2016) reportan a los alcoholes como agentes ligantes en el proceso de síntesis de nanopartículas.

En el espectro (b) se observa el pico intenso de estiramiento del grupo OH, el enlace -CH de alcanos y vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo, de aldehídos y cetonas, presentes también en azúcares y en las estructuras de grasas. Gran parte de las grasas se quedan en la fracción con hexano, los picos de absorción para alcoholes secundarios y primarios se presentan en 1154 cm^{-1} y 1062 cm^{-1} .

El espectro (c) muestra el pico de absorción característico de la hidratación de la muestra (fracción con acetato de etilo), así como el enlace C-H que corresponde a los alcanos. Esta fracción presenta un pico de absorción intenso para el grupo carbonilo en 1738 cm^{-1} que forma parte de proteínas y flavonoides. También, se observan las absorciones características para alcoholes primarios, secundarios y fenoles, teniendo este último el pico más intenso en 1219 cm^{-1} .

La fracción n-butanol se observa en el espectro (d). Aquí se muestran diversas bandas que representan a las estructuras que son más polares, como el pico característico del agua en 3723 cm^{-1} , el grupo carbonilo en 1738 cm^{-1} , así como la vibración del enlace C-O presente en anillos aromáticos, presencia de alcoholes primarios, secundarios, terciarios y fenoles. En el espectro, enlaces como C-O están reportados como agentes reductores o ligantes, uno de los compuestos que

contiene este enlace en el extracto de *Moringa*, es el ácido oleico reportado por Marreno *et al.*, (2014) y Sharma *et al.*, (2016) como un agente estabilizante.

En el espectro (e) se puede observar del lado derecho los grupos pertenecientes a la humedad de la muestra fracción acuosa residual (MAR). La presencia del enlace carbonilo, grupo C-O en anillos aromáticos y los enlaces de alcoholes primarios y fenoles en 1213 cm^{-1} .

7.5 Espectros de absorción UV-Vis para el extracto de *Stevia rebaudiana* y sus fracciones

La **Figura 16**, muestra los espectros de absorción UV-Vis en un barrido de 200 nm a 800 nm.

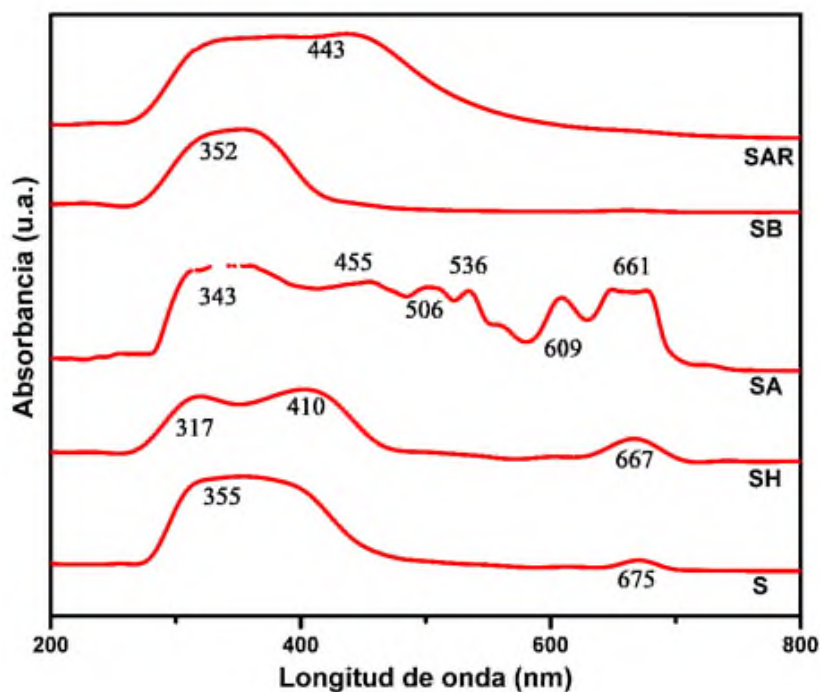


Figura 16. Espectros de absorción UV-Vis para el extracto de *Stevia* (S) y las fracciones SH, SA, SB y SAR.

Los resultados obtenidos en el espectro S, que corresponde al extracto crudo de *Stevia* muestran una banda de absorción entre 275 nm y 450 nm, con un máximo alrededor de los 355 nm. Se considera que alrededor de 290 nm absorben grupos

cromóforos C=O correspondientes a aldehídos y cetonas. Los glucósidos de esteviol que contienen a estos grupos fueron reportados por Lutsenko *et al.*, (2016). Estos compuestos han sido también reportados como posibles plantillas en la formación de nanopartículas (Rodríguez *et al.*, 2013). A los 675 nm se observa una pequeña banda de absorción, la cual puede estar relacionada con la absorción de la clorofila a. Los datos obtenidos concuerdan con el análisis de FT-IR previamente descrito. El espectro de absorción SH de la fracción hexano de *Stevia*, presenta una banda máxima de absorción en 317 nm, que se encuentra relacionada con los compuestos orgánicos presentes en la fracción, anteriormente observados en los espectros FT-IR. Adicionalmente, se muestran señales a 410 nm y 677 nm. El espectro de absorción de SA, presenta absorción en 343 nm, relacionada con grupos cromóforos como C=O, en 455 nm y 506 nm se muestran señales características para carotenos y en 661 nm una banda de absorción que puede estar relacionada con la absorción de la clorofila. El espectro de absorción SB, muestra una banda de absorción en 352 nm, esta señal es más aguda que las mostradas para los extractos S, SH y SA. El espectro de absorción SAR, muestra una señal entre los 272 nm y 529 nm. Dentro de este rango de absorción está implícita la absorción de compuestos orgánicos como fenoles y flavonoides, que se encuentran entre los 200 nm y 300 nm, la absorción del grupo carbonilo, así como de la clorofila.

A la par, se realizó el estudio de UV-Vis de los compuestos estándar que se sabe están en el extracto crudo. En la **Figura 17** se muestra al espectro de ácido gálico (BAG), con una absorción máxima a los 230, debido principalmente por el grupo carbonilo de su estructura. Las muestras de rebaudiósido (BREB) y esteviósido (BST), no mostraron absorciones evidentes. Esto permitirá predecir si alguno de estos dos compuestos permite la síntesis de NPs, ya que la banda de absorción para ZnO alrededor de 400 nm no se verá sobrelapada con señales de los metabolitos.

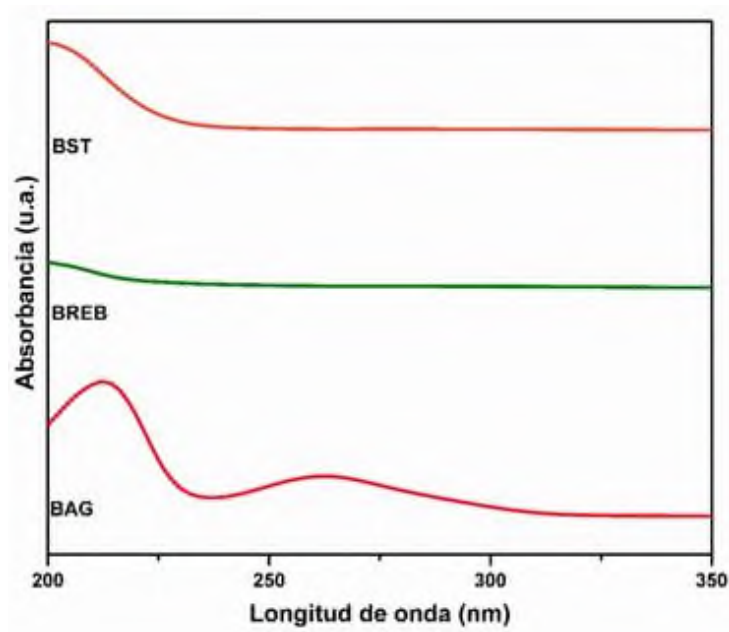


Figura 17. Espectros UV-Vis de los compuestos esteviósido (BST), rebaudiósido (BREB) y ácido gálico (BAG).

7.6 Espectros de absorción UV-Vis de extracto de *Moringa* y sus fracciones

La **Figura 18**, muestra los espectros de absorción UV-Vis del extracto y de las fracciones de *Moringa*.

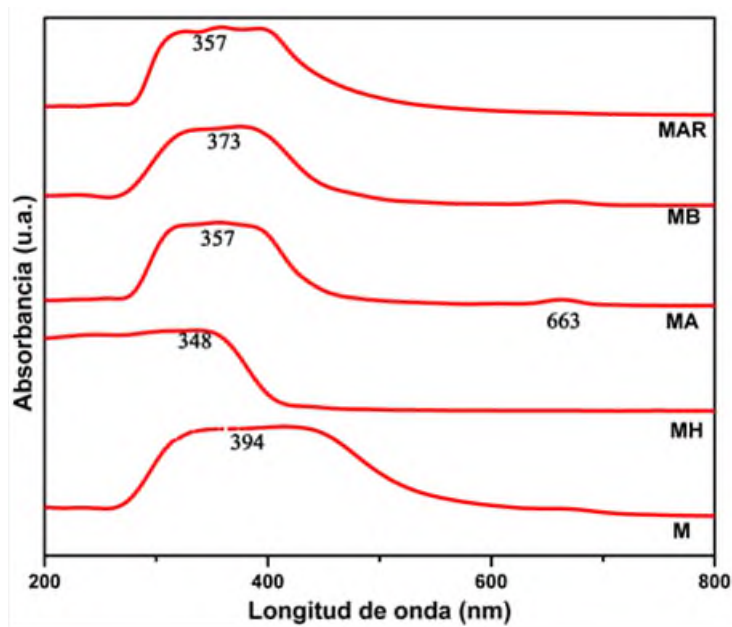


Figura 18. Espectros de absorción UV-Vis para el extracto de *Moringa* (M) y las fracciones MH, MA, MB, MAR.

El espectro de absorción para el extracto de *Moringa* (M), muestra una señal fuerte con una banda de absorción máxima a 394 nm, la cual está relacionada con la presencia de grupos cromóforos que pertenecen a compuestos fenólicos, alcaloides, cetonas, aldehídos, entre otros. El espectro de absorción MH, presenta una banda de absorción máxima en 348 nm, la cual se desplaza respecto al extracto crudo hacia la irradiación UV. Este espectro no muestra la presencia de clorofila a. El espectro de absorción de MA muestra dos bandas, una a 357 nm y otra a 663 nm. Esta última relacionada con la absorción de la clorofila. El espectro de absorción MB presenta una sola señal en 373 nm, la cual pertenece a la absorción de grupos cromóforos, tales como C=O y C-OH. El espectro de absorción de la fracción acuosa residual MAR, presenta una señal en 357 nm, comparando con MB, es una señal más ancha, posiblemente por contener una mayor cantidad de compuestos orgánicos polares, que quedaron del fraccionamiento.

7.7 Análisis térmico para el extracto de *Stevia rebaudiana* y sus fracciones SH, SA, SB, SAR.

En la **Figura 19** se muestran los resultados del análisis termogravimétrico (TGA) para cada muestra y los resultados de derivada de la pérdida de peso. Las gráficas indican los porcentajes de pérdida de peso en cada intervalo señalado. Las curvas de TGA revelaron degradaciones térmicas importantes. En el termograma (a) se muestran las temperaturas de degradación del extracto crudo de *Stevia*, con una pérdida de peso máxima de 40% a los 148 °C. Esto corresponde a la pérdida de humedad y de algunos metabolitos que se degradan a bajas temperaturas. A los 356 °C hay una segunda pérdida importante de 32 %. Después de esta temperatura ya no se observan cambios en la muestra, quedando un residuo de 28%. Compuestos como la hemicelulosa comienzan a descomponerse a temperaturas entre los 220 y 315 °C y la celulosa entre 315 y 400 °C. La descomposición de la lignina tiene lugar en un rango de temperatura de los 200 a los 720 °C. Estos compuestos forman parte estructural de la planta y han

sido reportados por Luengo *et al.*, (2008). Mediante esta técnica no es posible asignar directamente la degradación a familias de metabolitos específicos. Sin embargo, si es posible identificar la cantidad de metabolitos que pueden degradarse a relativas bajas temperaturas y con ello saber que tan estable térmicamente es el extracto.

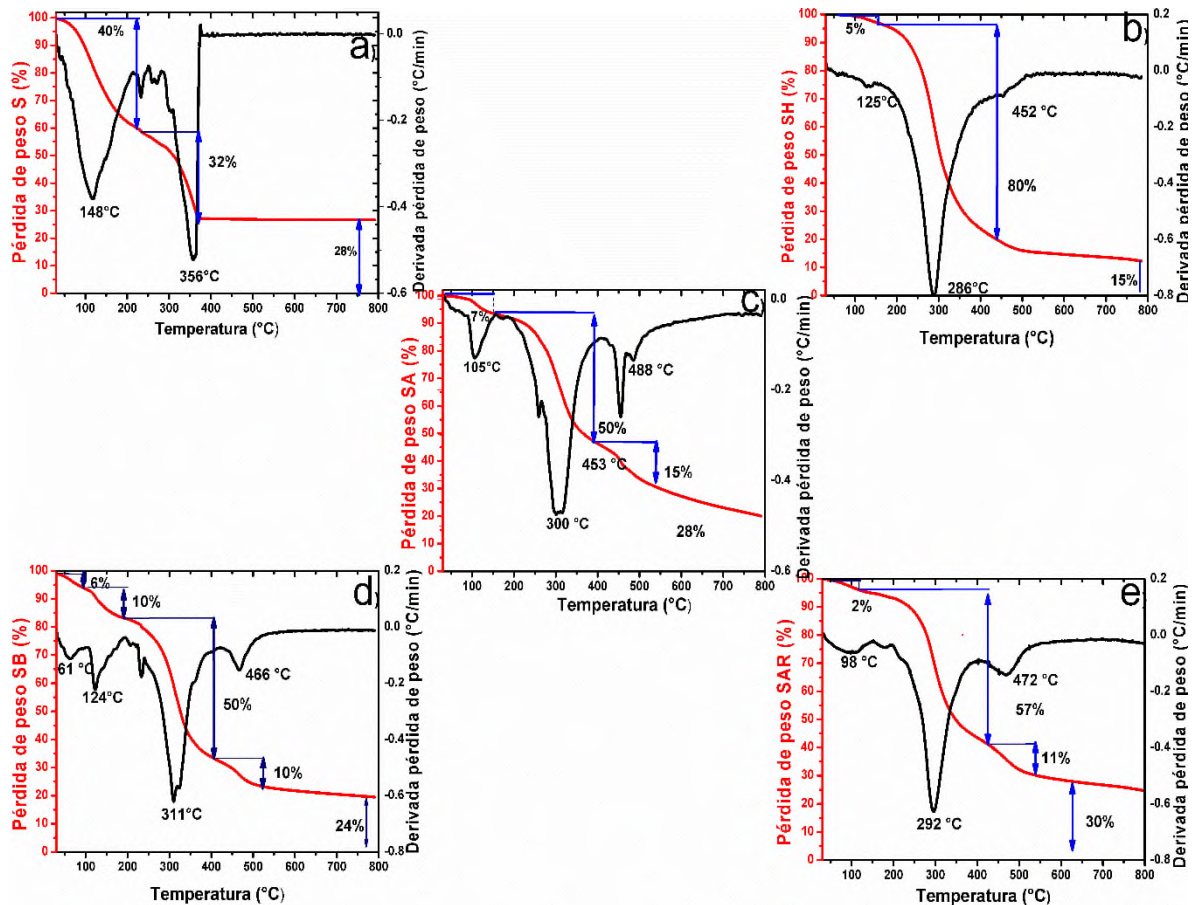


Figura 19. Análisis termogravimétrico de *Stevia* y de las fracciones (a) extracto de *Stevia* (S) (b) fracción hexano del extracto de *Stevia* (SH), (c) fracción acetato del extracto de *Stevia* (SA), (d) fracción-butanol del extracto de *Stevia* (SB) y (e) fracción acuosa residual del extracto de *Stevia* (SAR).

El termograma con el inciso (b) muestra la fracción de hexano, con una pérdida del 5% a los 125°C. Dado que la muestra no contiene compuestos polares, no hay absorción de agua ni de compuestos solubles en agua, consecuentemente no hay pérdida a temperaturas menores de 100 °C. La pérdida mayoritaria es alrededor del 80%, a una temperatura promedio de 286 °C. A diferencia del extracto crudo,

en esta fracción hay compuestos con mayor estabilidad térmica. El residuo es del 15%. El termograma (c) muestra a la fracción de acetato de etilo. En la caída inicial a 105 °C pierde 7% de su peso total. La pérdida máxima es en la temperatura promedio 300 °C con una pérdida alrededor de 50% y tiene un residuo del 28%. El inciso (d) muestra la fracción de n-butanol. Se observa una disminución del peso a los 61 °C con un 6%, posiblemente por la pérdida de compuestos volátiles. Hay otra pérdida de peso a los 124 °C y a los 311 °C en donde se produce la mayor pérdida de peso, posiblemente como consecuencia de la combustión de compuestos como celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos orgánicos con una mayor estabilidad térmica. En el inciso (e) se presenta la fracción acuosa residual con una pérdida a los 98 °C de un 2%, mostrando una caída máxima a una temperatura promedio de 292 °C, también presenta otra pérdida de peso a 472 °C y un residuo del 30 %.

Con el fin de identificar la estabilidad térmica de algunos metabolitos presentes en *Stevia*, se realizaron análisis de TGA a los estándares esteviósido, rebaudiósido y ácido gálico. La **Figura 20** muestra los resultados el esteviósido a) presenta tres pérdidas, a 65 °C, 329 °C y 414 °C, el rebaudiósido b) pérdidas de peso a 81 °C, 331 °C y 416 °C, por último, el ácido gálico a 106 °C, 269 °C y 335 °C., Para los tres casos, la pérdida mayoritaria es la segunda. Como hay pérdida de peso a temperaturas menores o cercanos a 100 °C se considera que existen compuestos volátiles y absorción de agua. Aunque esto ocurre a un bajo contenido, menor del 10 %. Las temperaturas de degradación mostradas por los estándares permitieron ser comparadas con aquellas obtenidas en las fracciones y verificar si alguna de las fracciones contiene a estas familias de metabolitos. También es importante observar que la mayoría de estos metabolitos se degradan por encima de los 250 °C, esto otorga un rango amplio para definir la temperatura de síntesis de nanopartículas.

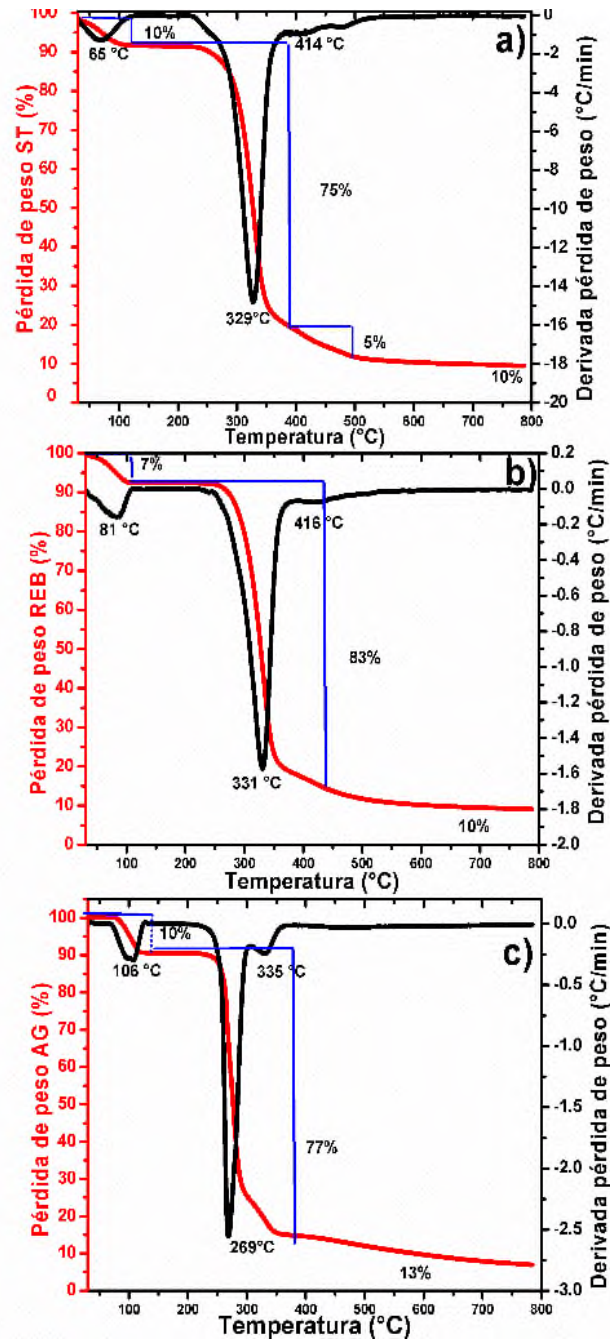


Figura 20. Termogramas de los compuestos: (a) esteviósido (ST), (b) rebaudiósido (REB) (a) ácido gálico (AG)

7.8 Análisis térmico para el extracto de *Moringa oleífera* y sus fracciones MH, MA, MB, MAR.

La **Figura 21** muestra los resultados de TGA de las fracciones con *Moringa*.

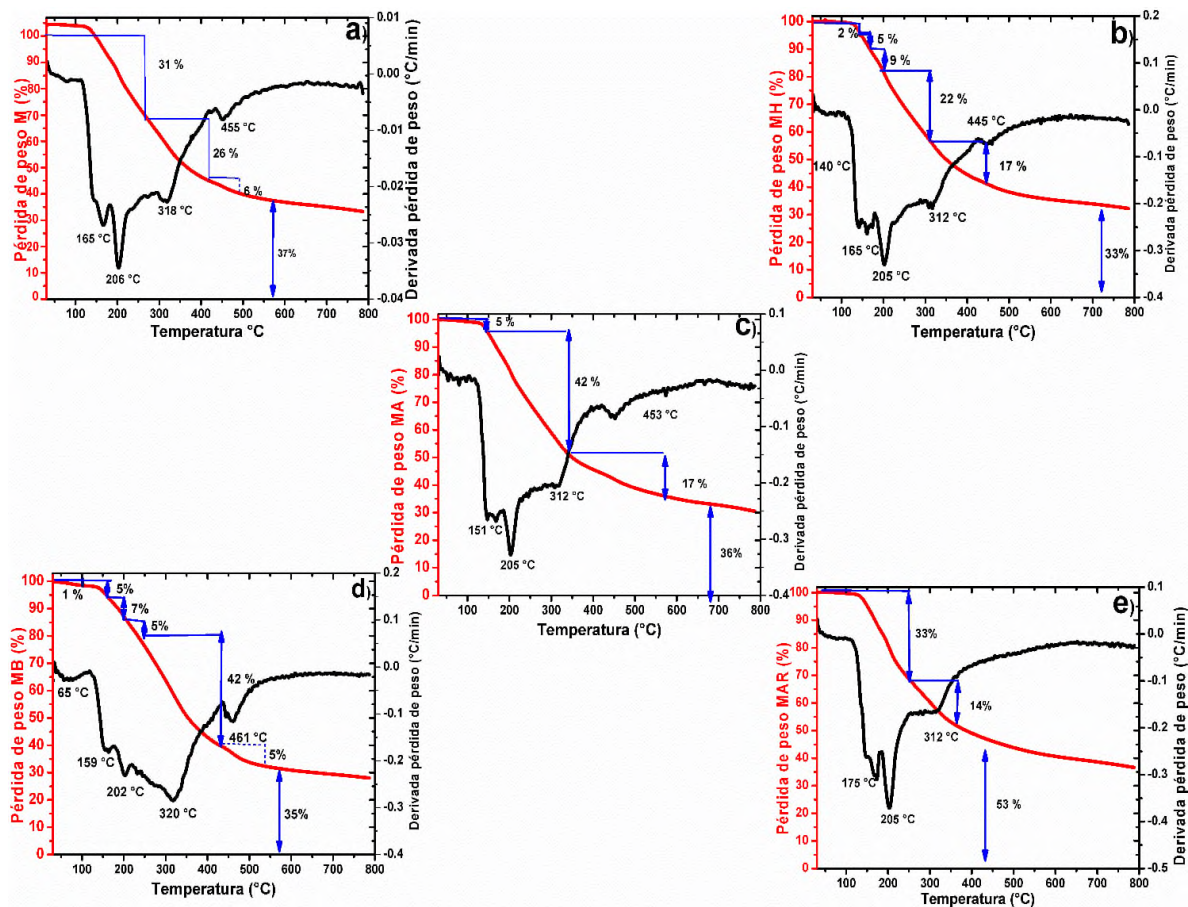


Figura 21. Análisis termogravimétrico de: (a) extracto de *Moringa* M y fracciones, (b) MH, (c) MA, (d) MB y (e) MAR

Las caídas observadas en los termogramas, corresponden a la pérdida y descomposición de los compuestos presentes en las muestras. En el inciso (a) se observa el extracto de *Moringa*, con una caída en la curva de pérdida de peso a los 165 °C, atribuida a los metabolitos termosensibles y a la pérdida de humedad de la muestra, aunque la pérdida representa un 31% de la pérdida total la temperatura es más alta que la utilizada en la síntesis, este resultado es similar a lo reportado por Rashid y Anwar (2008). Además, también se observan tres caídas en 206 °C, 318 °C y 455 °C. El termograma mostrado en el inciso (b) representa a la fracción hexano, con caídas a los 140 °C, 165 °C, 205 °C, 312 °C y 445 °C. La primera pérdida de peso podría ser debido a la descomposición de la materia orgánica de taninos, algunos compuestos fenólicos y terpenos, los cuales pierden

estabilidad antes de los 200 °C. Las de mayor temperatura podrían ser debido a la combustión de los compuestos estructurales de la muestra, como celulosa y lignina. La muestra de la fracción de acetato de etilo se presenta en el inciso (c). Hay pérdidas a 151 °C, 205 °C, 312 °C y 453 °C. El inciso (d) presenta a la muestra MB, que a los 65°C tiene una pérdida inicial de dos caídas pequeñas y una máxima a los 320°C, debido al fraccionamiento realizado. En esta fracción se encuentran mayoritariamente, compuestos orgánicos mayormente polares y compuestos fenólicos, que se pirolizan a estas temperaturas, se muestra un residuo del 33 % quizá por el contenido de cenizas, que puede estar relacionado con el compuesto ZnO. De acuerdo a lo reportado la ceniza está principalmente formada por K, Na, Ca, Mg, Si y P (Díaz-Ramírez *et al.*, 2012). El inciso (e) pertenece a la fracción acuosa residual, con una pérdida inicial del 33 % a una temperatura promedio de 175 °C que corresponde a metabolitos polares como algunas familias de fenoles o flavonoides que están en mayor proporción en esta fracción, seguido de una pérdida máxima a los 312 °C, también se muestra un residuo del 40% debido a la gran cantidad de compuestos residuales del fraccionamiento que corresponden generalmente a cenizas.

7.9 Reacciones preliminares con los extractos de *Stevia* y *Moringa*

Se realizaron algunas reacciones con la finalidad de establecer el tiempo de reacción adecuado.

7.9.1 Tiempo de reacción con el extracto de *Stevia rebaudiana*

A partir del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* se realizó la síntesis de NPs. La síntesis se llevó a cabo con agitación constante a 60 °C, probando tres tiempos 1, 2 y 3 h.

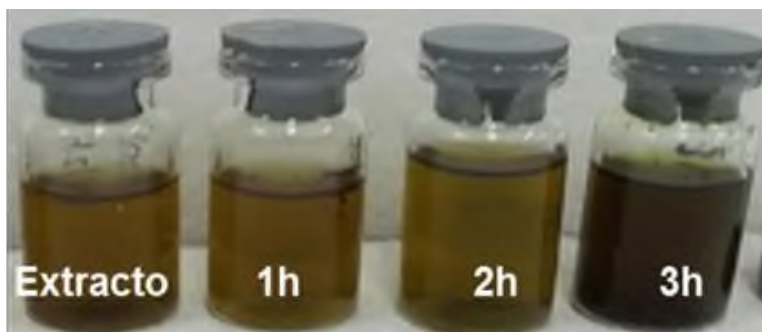


Figura 22. Productos de reacción a diferentes tiempos de reacción con extractos de *Stevia rebaudiana*

La **Figura 22** muestra los productos de reacción obtenidos que muestran un cambio de color significativo a las 3h, en reportes previos de síntesis de nanopartículas metálicas con extractos de plantas, se observan cambios de coloración cuando las nanopartículas se están generando como consecuencia del cambio de la estructura electrónica inducida por el tamaño y la forma de la nanopartícula, es así como la luz es capaz de penetrarlos y esto es suficiente para que llegue a toda la nanopartícula, por lo que todos los electrones empiezan a moverse colectivamente por efecto de esta luz, se desplazan juntos de un lado a otro de la nanopartícula de forma oscilatoria al ritmo que les marque la onda de la luz y cuando esto ocurre, la luz correspondiente se absorbe y se observa la partícula del color de la longitud de onda que queda (Monge, M., 2014). Sin embargo, para el compuesto ZnO esta oscilación es muy débil, por ser un semiconductor, y el cambio de coloración en los productos de reacción puede no deberse a este comportamiento si no a la interacción de los compuestos orgánicos con el precursor.

7.9.1.1 Espectro FT-IR, tiempo de reacción, con *Stevia rebaudiana*

Se llevó a cabo un análisis por FTIR para la obtención de las condiciones de síntesis, comparando la muestra de la sal precursora, el extracto, los productos de reacción y los productos de reacción secados en un horno.

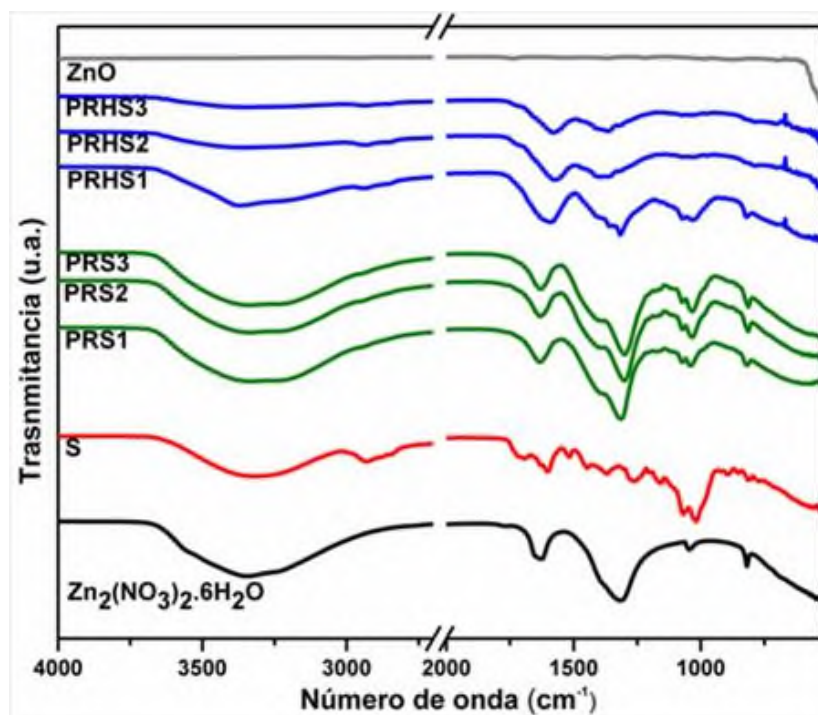


Figura 23. Espectro FT-IR para las reacciones a 1 h, 2 h y 3 h con extracto de *Stevia rebaudiana*.

En la **Figura 23** se presentan los espectro FT-IR, los resultados permitieron diferenciar las vibraciones relacionadas con las diferentes etapas en la síntesis de las NPs. Inicialmente, se observa el espectro de la sal precursora en una línea negra, en rojo al extracto (S), en verde al producto de reacción (PRS), en azul al producto de reacción llevado al horno (PRSH) y en gris al estándar ZnO. La sal precursora ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), tienen picos bien definidos y anchos en 3400 cm^{-1} , que pertenece a la humedad de la muestra, 1700 cm^{-1} una señal clara del grupo carbonilo y en 1500 cm^{-1} la banda de C=C en anillos aromáticos, seguido del espectro del extracto de *Stevia*, anteriormente descrito, esto permite generar un contraste entre la sal y los productos de reacción a diferentes horas, en donde se observa que los enlaces del extracto en 2934 cm^{-1} que pertenece al estiramiento de los grupo metilo y 1700 cm^{-1} al grupo carbonilo desaparecen para el espectro de los productos de reacción, debido quizá a que los enlaces perdieron su estabilidad y su estructura cambió que puede deberse a una interacción con el precursor, que estaría explicado por un mecanismo de reacción. En los espectros

de los productos de reacción, que se encuentran en verde, se observa la degradación de la sal, así como de algunos enlaces del extracto, hasta esta etapa los tiempos de reacción no han influido considerablemente en la síntesis, ya que los espectros PRS1, PRS2, y PRS3, mantienen los mismos picos de absorción con una intensidad similar, en azul es claramente definido que el tiempo de reacción es importante para llevar a cabo la síntesis, ya que los productos de reacción llevados al horno se diferencian notablemente. PRSH1 mantiene el pico de absorción en 1063 cm^{-1} que pertenece a la vibración del enlace C-O de alcoholes principalmente, el pico en 1300 cm^{-1} y un pico a los 798 cm^{-1} pertenecen a la sal. Esto indica que no hubo una conversión total de los reactivos en la síntesis. Sin embargo, esto sugiere que a esta condición de reacción hay cambios importantes y/o interacciones entre el precursor y el extracto, que al aumentar el tiempo de reacción y de acuerdo a los espectros PRS2 y PRS3 se lleva a cabo la reacción. En el espectro PRS3 las bandas representativas de los metabolitos ya no son visibles y sólo se observa un pequeño pico alrededor de 1200 cm^{-1} que corresponde a los compuestos fenólicos. Se considera que bajo estas condiciones la sal es transformada a ZnO, esto es importante para la toma de decisión en cuanto a tiempo de reacción.

7.9.1.2 Espectros DRX para las reacciones utilizando extracto de *Stevia* y fracciones

La **Figura 24**, muestra los patrones de difracción de rayos X de los productos de reacción a partir de extracto de *Stevia* en los tiempos de reacción de 1, 2 y 3 h.

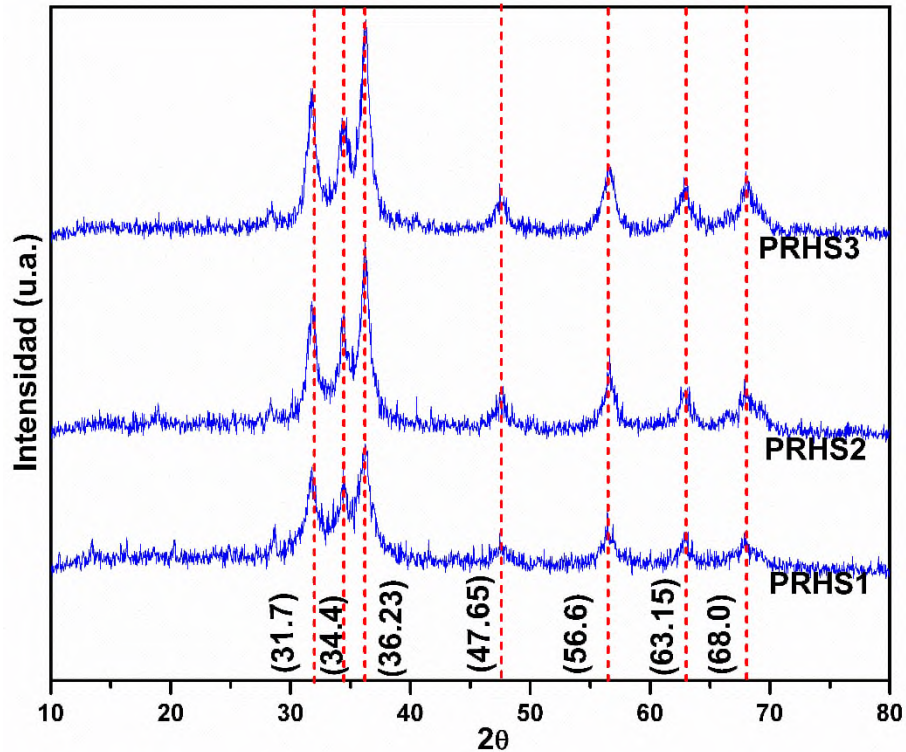


Figura 24. Patrones de DRX para reacciones con extracto de *Stevia rebaudiana* a los tiempos de reacción de 1 h (PRHS1), 2 h (PRHS2) y 3 h (PRHS3).

La **Figura 24** muestra los patrones de difracción de los productos de reacción con temperatura de secado de 110°C , para los tres tiempos de reacción analizados se observaron picos característicos de óxido de zinc bien definidos a $2\theta = 31^\circ, 34^\circ, 36^\circ, 48^\circ, 56^\circ, 63^\circ, 68^\circ$ y 78° , los cuales corresponden a los planos (100), (002), (101), (110), (103), (103), (100), (004), respectivamente de la estructura cristalina tipo wurtzita de ZnO. Es evidente también que la intensidad de las señales se incrementa en función del tiempo de reacción, lo cual indica una mayor cantidad de producto obtenido. De acuerdo a lo reportado por Aquino *et al.*, (2016), el ZnO se obtiene a una temperatura cercana a los 400°C cuando se utiliza el precursor nitrato de zinc, concluyendo que el nitrato de zinc pierde el 86 % de la humedad a los 160°C , sin convertirse a óxido de zinc. La temperatura de reacción utilizada en el presente trabajo fue de 60°C y la temperatura de secado de 110°C , las cuales están muy por debajo del requerimiento convencional para obtener ZnO. Este resultado es contundente para definir que los metabolitos de *Stevia rebaudiana*

provocan la formación de ZnO, a relativas bajas temperaturas. Esto puede estar relacionado con lo reportado por Nava *et al.*, (2017) quienes proponen un mecanismo ligante, que es favorecido por los metabolitos presentes en *Stevia* y puede ser la causa de formación del ZnO a tan bajas temperaturas. Esto llevó a probar una temperatura más baja de secado de 70 °C, el producto fue analizado por DRX. Aunque los resultados dieron positivo para la obtención de ZnO (**Figura 25**) los picos se muestran con una intensidad de señal menor que en la temperatura de secado a 110 °C.

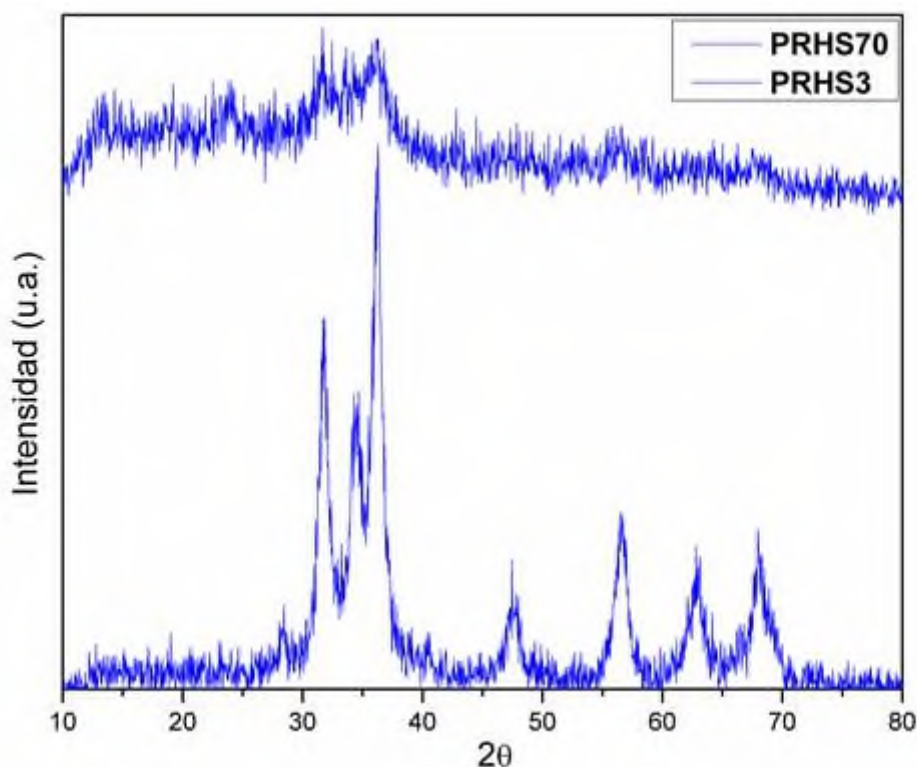


Figura 25. Patrones de DRX de reacciones con extracto de *Stevia* para dos temperaturas de secado, a 70 °C y a 110 °C.

Para conocer el tipo de estructura cristalina, se realizó a uno de los patrones de difracción, el refinamiento Le Bail (**Figura 26**) y se obtuvieron los datos h,k,l correspondientes, de esta forma se corrobora la obtención de ZnO, en su estructura tipo wurtzita, que a su vez se compara con el patrón de ZnO comercial

mostrado en la **Figura 27**, este tipo de estructura es la más estable por lo que es interesante su obtención con este método de síntesis ya que resulta un proceso relativamente fácil, económico y amigable con el ambiente en comparación con los métodos químicos y fisicoquímicos.

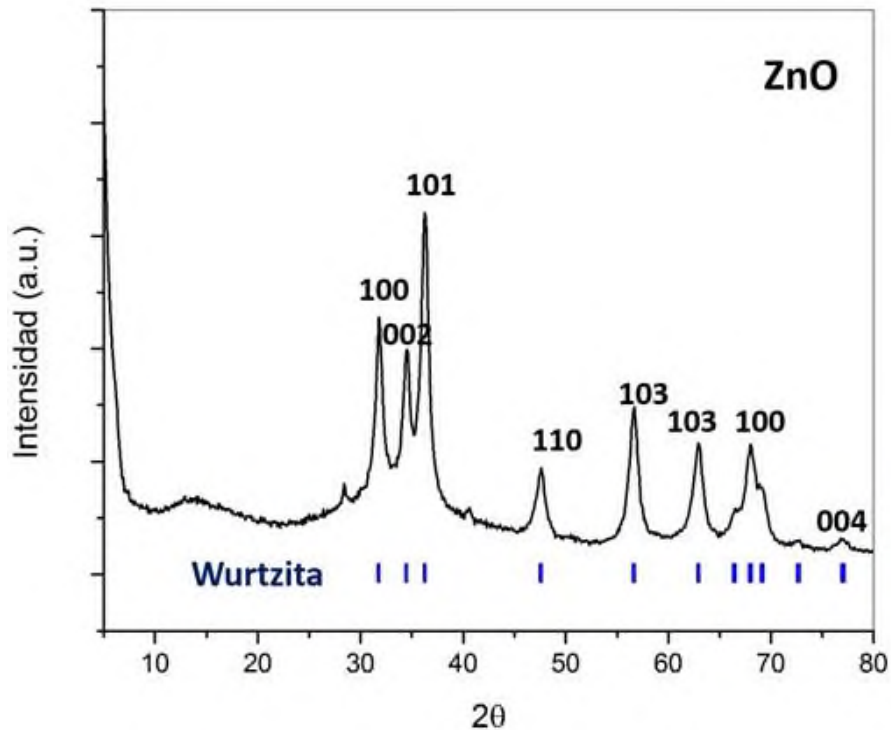


Figura 26. Refinamiento Le Bail para la reacción a 3 h con extracto de *Stevia rebaudiana*.

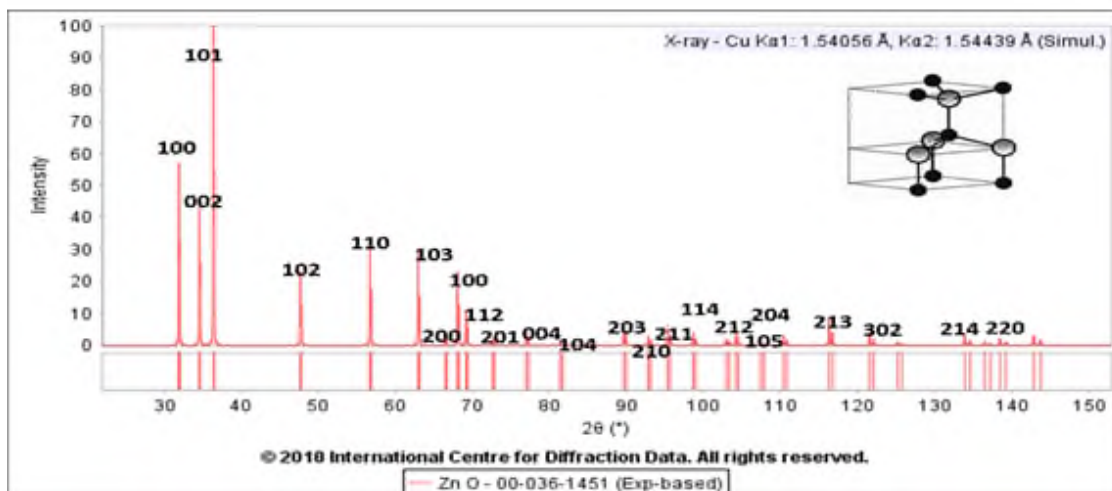


Figura 27. Patrón de DRX del óxido de zinc.

7.9.2 Tiempo de reacción con el extracto de *Moringa oleífera*

Tal como se observa en la **Figura 28** y al igual que con *Stevia rebaudiana*, los experimentos con *Moringa oleífera* no muestran un cambio en el color en función del tiempo de reacción. De acuerdo a lo reportado, el cambio de coloración suele ser indicativo de presencia de nanopartículas. Generalmente, los productos son evaluados por espectroscopía UV-vis, en donde ocurren señales de absorción correlacionadas con las nanopartículas. Este fenómeno se debe a una característica optoelectrónica llamada resonancia del plasmón, la cual ocurre en nanopartículas metálicas, debido a que sus electrones se encuentran libres. En los semiconductores esto no es posible, porque la energía suministrada por el haz de luz UV es utilizada para realizar el brinco electrónico de la banda de valencia a la banda de conducción. No obstante, el cambio de coloración en estas reacciones puede ocurrir y puede ser consecuencia de interacciones de la sal precursora con los metabolitos del extracto.

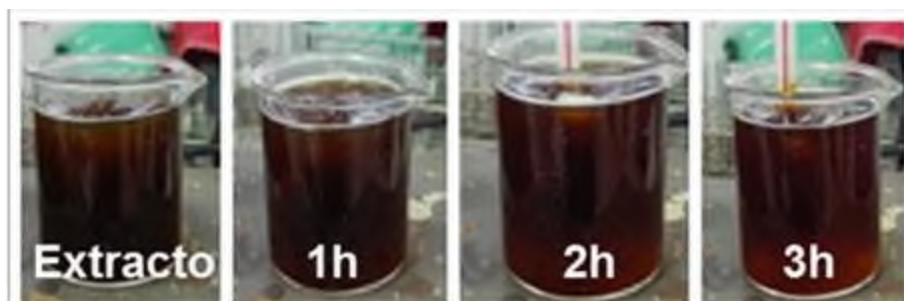


Figura 28. Productos de reacción a diferentes tiempos con extractos de *Moringa oleífera*.

7.9.2.1 Espectro FT-IR, tiempo de reacción, con *Moringa oleífera*

El análisis de temperatura de reacción es importante por lo que se realiza FT-IR, para observar si los compuestos orgánicos tienen un papel importante en la síntesis. De acuerdo a la **Figura 29**, la cual contiene la sal precursora, el extracto crudo de *Moringa*, los productos de reacción a tres diferentes tiempos de reacción y productos de reacción secados y como referencia el ZnO comercial.

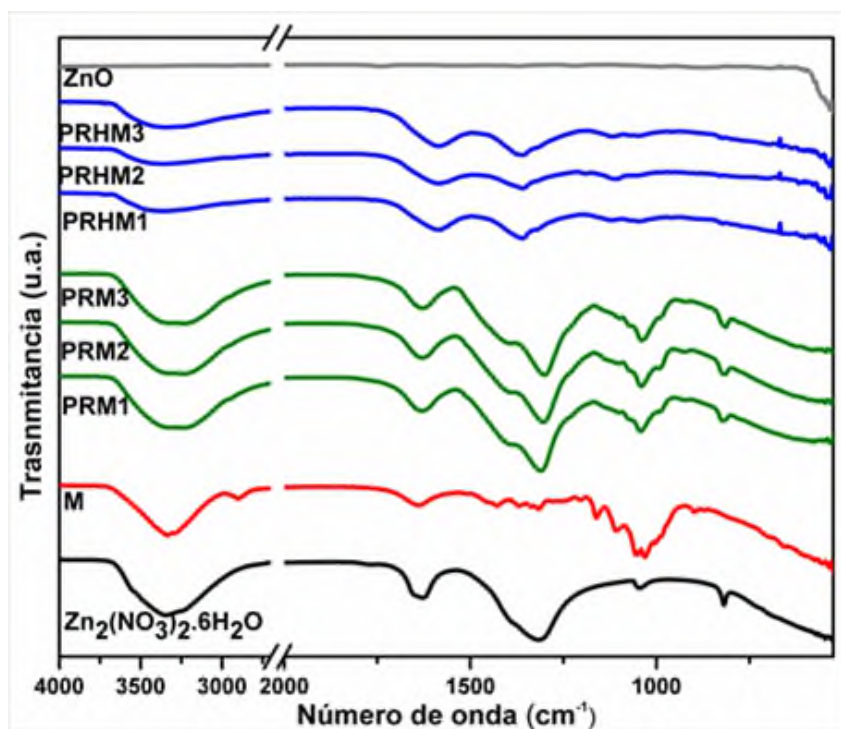


Figura 29. Espectros de IR del extracto de *Moringa* y sus reacciones líquidas y producto de secado a 1 h, 2 h, y 3 h

Se observa la presencia de grupos funcionales como OH en 3300 cm^{-1} , C-OH (1200 cm^{-1}), alquenos en 2900 cm^{-1} , también se puede ver un pico pronunciado en 1200 cm^{-1} correspondiente a los fenoles, alcoholes primarios y alcoholes secundarios ($-\text{CH}_2\text{-OH}$) en 3200 cm^{-1} así como a ácidos carboxílicos en 1700 cm^{-1} para el extracto, y bandas bien definidas para la sal en 1311 cm^{-1} que corresponde al enlace NO_3^- . De acuerdo a la variación del tiempo de síntesis a $60\text{ }^\circ\text{C}$ en 1, 2 y 3 h los espectros de FTIR indican que no existe un cambio contundente en las reacciones. Sin embargo, los compuestos presentes del extracto se degradan con el tiempo y con la temperatura de secado, debido a que hay una disminución de señales, permaneciendo sólo el enlace C-O en 1600 cm^{-1} y enlaces C-OH, se realizó DRX para comprobar la presencia del compuesto.

7.9.2.3 Difracción de rayos X para las reacciones con el extracto de *Moringa*

La **Figura 30**, muestra los patrones de difracción de las reacciones con el extracto de *Moringa* a 1, 2 y 3 h. Los patrones mostraron picos en valores distintos del

ZnO, algunos de estos corresponden a la sal precursora. De acuerdo con el análisis, los resultados indican la formación de un compuesto distinto. Contrariamente, con lo que ocurrió con el extracto de *Stevia* que desde 1 h de reacción se observa la presencia del compuesto. Por lo que se planteó utilizar una temperatura distinta de reacción, que más adelante se presenta.

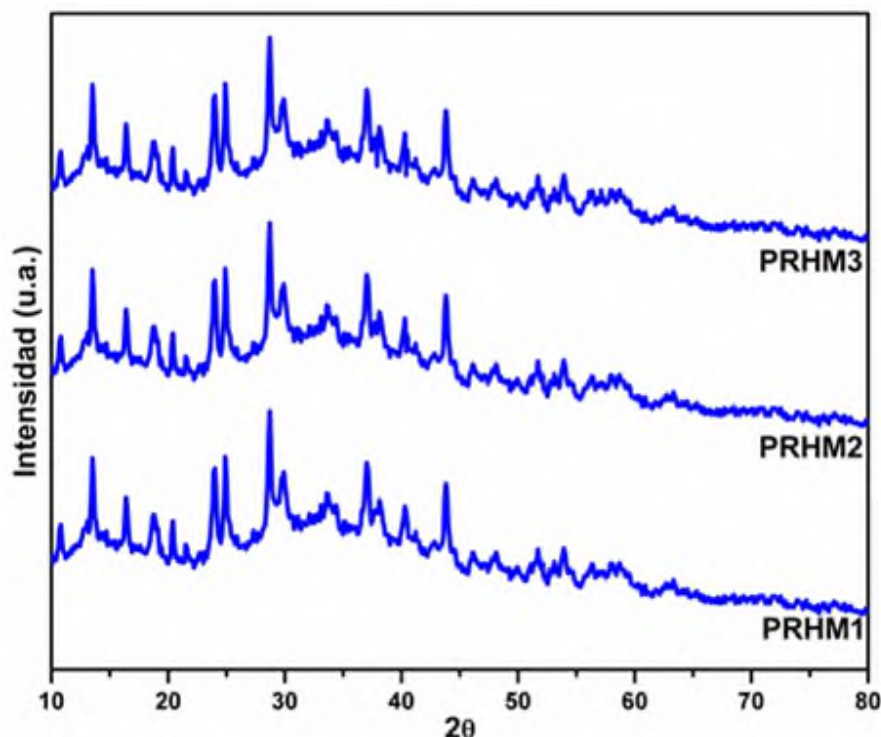


Figura 30. Patrones de DRX de los productos de reacción con el extracto de *Moringa oleifera* obtenidos a 1 h (PRHM), 2 h (PRHM2) y 3 h (PRHM3).

El tiempo de síntesis y la temperatura son variables importantes para llevar a cabo una conversión total de los reactivos, por tal motivo, se optó incrementar la temperatura de síntesis a 80 °C cuando se usa *Moringa*. En la **Figura 31**, se muestra el patrón de difracción del producto de reacción, con un tiempo de reacción de 3 h, 400 rpm y 80 °C de temperatura de reacción. Es evidente que los picos son característicos del ZnO y se encuentran bien definidos $2\theta = 31.7^\circ$, 34.38° , 36.23° , 47.81° , 56.4° , 63.1° , 68.26° , los cuales corresponden a los planos (100), (002), (101), (110), (103), (103), (100), respectivamente de la estructura cristalina tipo wurtzita de ZnO.

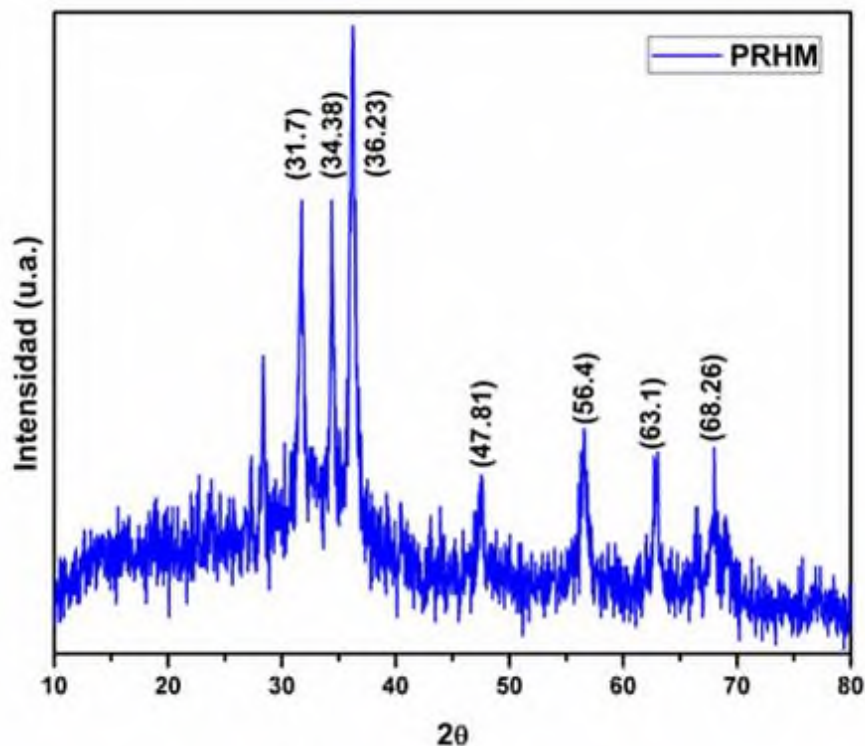


Figura 31. Patrón de DRX del producto de reacción con el extracto de *Moringa oleífera* obtenido a 80°C durante 3 h.

7.10 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extracto de *Stevia rebaudiana* y fracciones.

Se llevaron a cabo las reacciones usando las condiciones de síntesis para *Stevia* de la siguiente manera: 60 °C como temperatura de síntesis, 1 M de sal precursora, 400 rpm y 3 h de reacción, con 3 h de secado a 110°C. Los productos de reacción se muestran en la **Figura 32**, con el extracto o la fracción y su respectiva síntesis. Cada uno muestra una coloración distinta, la cual tiene que ver con los metabolitos presentes en cada producto. Por ejemplo, se observa que la fracción SA es miscible y que su producto de reacción PRSA forma un precipitado, esto puede deberse a que contiene algún tipo o conjunto de compuestos que pueden reaccionar con la temperatura pero que no sea propio de la generación del compuesto, sin embargo es de importancia para el estudio.



Figura 32. Fracciones de extracto de *Stevia* con sus respectivos productos de reacción.

En la **Figura 33**, se muestran los productos de reacción después de ser secados, PRHS y PRSHB son polvos finos con una coloración gris, que se diferencian del resto, ya que tuvieron una reacción espontánea que conllevó a la obtención de los polvos que se utilizaron para su caracterización.



Figura 33. Productos obtenidos de las reacciones con extracto de *Stevia* después del secado a 110 °C

7.11 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extracto de *Moringa oleífera* y fracciones.

Para la obtención de las reacciones con las fracciones de *Moringa*, se optó por emplear las condiciones de síntesis siguientes: 80 °C, 1 M de sal precursora, 400 rpm, y 3 h de reacción, con 3 h de secado a 110°C. Se obtuvieron las reacciones mostradas en la **Figura 34**, cada uno muestra una coloración distinta por los metabolitos presentes en cada una de las fracciones y es probable que su cambio se deba a la sensibilidad de los mismos.

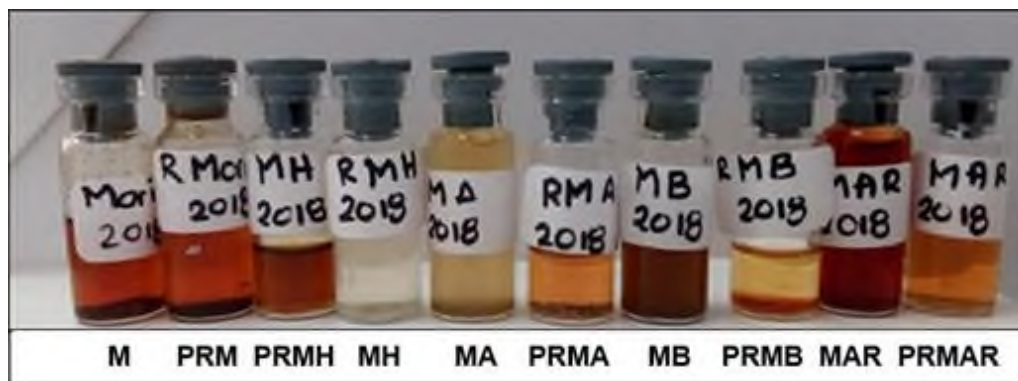


Figura 34. Fracciones de *Moringa* con sus respectivos productos de reacción.

En **Figura 35**, se muestran los productos de reacción secos, que al igual que los productos de reacción sin secar se muestran de distinto color. Los productos con el extracto crudo de *Moringa* y la fracción de butanol, son polvos muy finos con tonalidad gris obtenidos a dos horas de horno de forma espontánea, diferenciándose del resto, estos polvos permitieron realizar caracterizaciones en equipos que requieren el compuesto en forma de polvo y para complementar los análisis que se describirán más adelante.

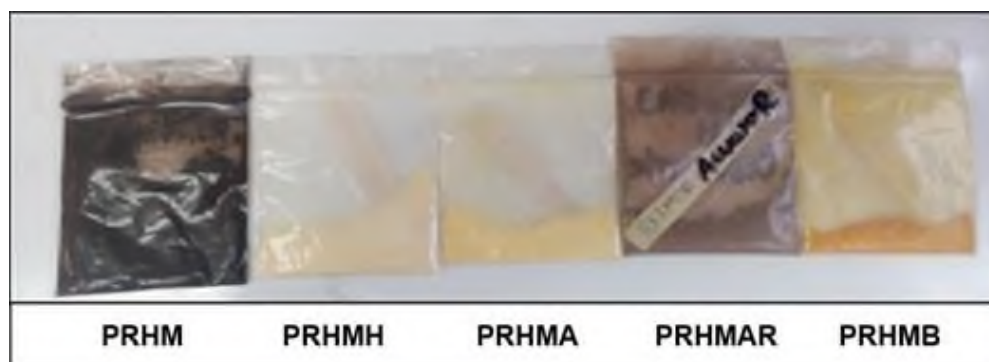


Figura 35. Productos de las reacciones líquidas con extracto de *Moringa* obtenidos a 110 °C

7.12. Espectros de FT-IR para las reacciones y productos de reacción con *Stevia rebaudiana*

En la **Figura 36** se observan las muestras, el espectro de la sal precursora en línea negra, el extracto o la fracción en rojo, el producto de reacción en verde, el producto de reacción seco, en azul y el espectro de ZnO comercial se indica con una línea gris. Se describen las comparaciones.

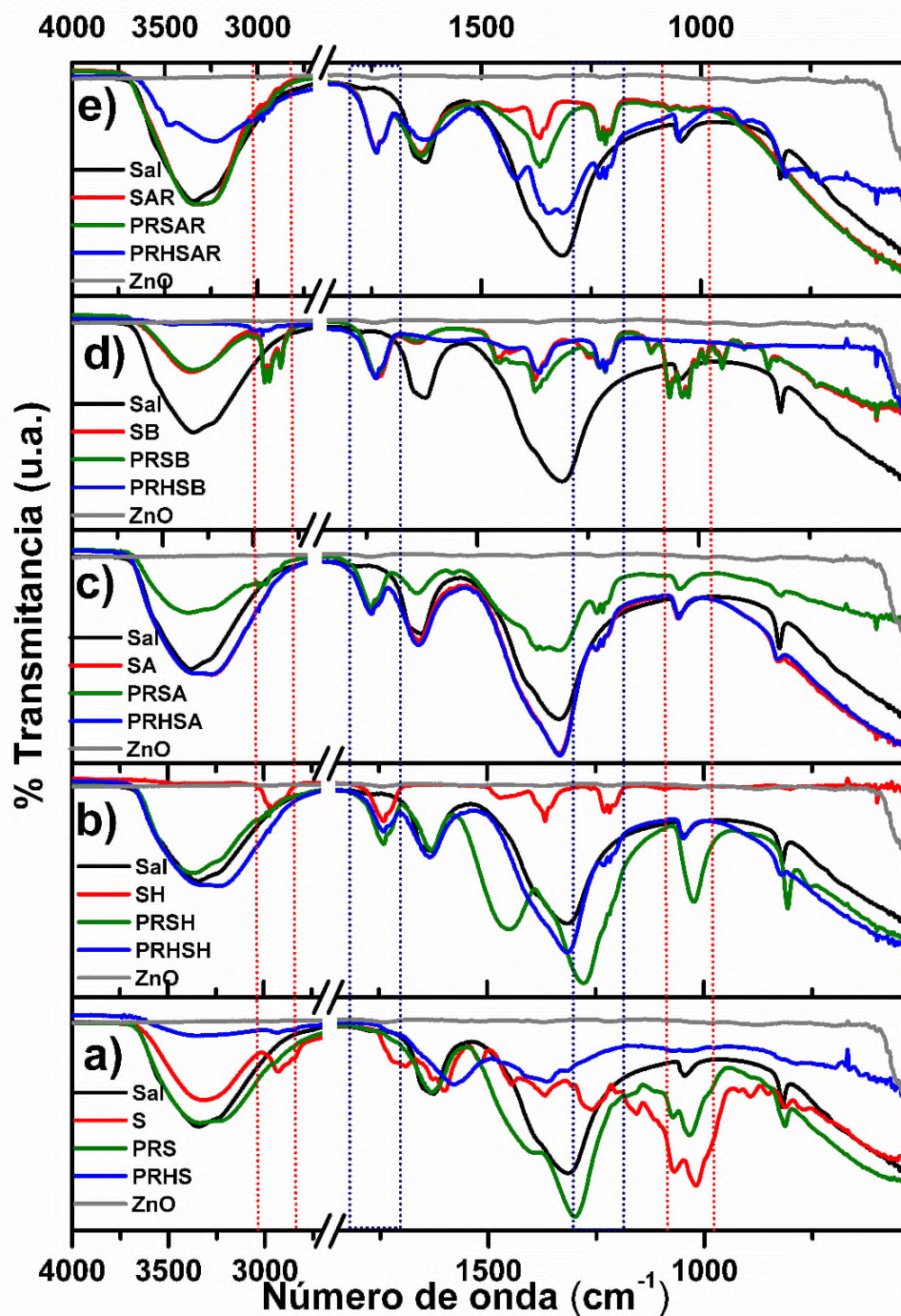


Figura 36. Espectros de FT-IR de la sal precursora, el extracto de *Stevia* y su fracción, el producto de reacción, el producto de reacción seco y el ZnO comercial. (a) extracto de *Stevia*, (b) fracción de hexano, (c) fracción de acetato de etilo, (d) fracción de n-butanol, (e) fracción acuosa residual

En la **Figura 36 (a)** se observa la degradación del enlace C-H en 2931 cm^{-1} del estiramiento de los grupos metilo en el producto de reacción, así como 1728 cm^{-1}

del estiramiento del grupo carbonilo, 1692 cm^{-1} corresponde al ácido carboxílico insaturado/aromático, las bandas en $1560\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ pertenecen a aminas ($-\text{NH}_2$). En el intervalo de $1519\text{ cm}^{-1}\text{-}1191\text{ cm}^{-1}$ se observa el solapamiento de la señal de la sal precursora. Esto implica que no se ha llevado a cabo la conversión total de la misma, por lo que no es posible definir si los enlaces pertenecientes al extracto se degradaron o permanecen para el producto de reacción. El enlace C-O que se presenta en 1156 cm^{-1} en el extracto, no se observa en PRHS esto lleva a suponer la degradación del mismo en los tiempos de reacción, o bien por la temperatura utilizada, así mismo para el enlace C-C en 894 cm^{-1} . En el producto de reacción se pueden observar la absorción de compuestos de la sal precursora en 1296 cm^{-1} y en 810 cm^{-1} , lo que indica que no existe una conversión total de la sal, a su vez se observa un ensanchamiento de la señal en 1573 cm^{-1} y 1378 cm^{-1} , esto puede ser por la interacción de los compuestos orgánicos con la sal, sin embargo, no se presenta la absorción característica del ZnO alrededor de los 600 cm^{-1} . En trabajos reportados con extractos de plantas, se ha mencionado que los compuestos fenólicos entre ellos ácido gálico, ácido ascórbico, quercetina, pueden ser reductores y estabilizantes en la síntesis de NPs (Landeros y Rosas., 2015). Estos compuestos absorben alrededor de los 1200 cm^{-1} . A pesar de no distinguirse en el espectro de la muestra PRS por el solapamiento de la señal, si se logra observar un ensanchamiento de la señal y puede deberse a este comportamiento.

En la **Figura 36 (b)** muestra a la fracción SH en comparación con los PR y PRH y a su vez con la sal precursora y el ZnO, de la misma manera que en el producto de reacción se degradó el enlace metilo en 2956 cm^{-1} , pero permanecieron los enlaces en 1740 cm^{-1} y 1462 cm^{-1} . Los demás enlaces que pertenecen a la fracción no se observan los cambios por el solapamiento de la señal de la sal, manteniéndose durante el proceso de síntesis la absorción de la sal. Para el PRHSH se mantienen los cambios a excepción de la degradación de la absorción en 815 cm^{-1} que pertenece a la sal, en esta fracción se puede deducir que la

concentración de los compuestos en la fracción o bien que los metabolitos no tienen la particularidad de llevar a cabo la síntesis ya que la conversión de la sal no ocurrió.

El espectro de la **Figura 36 (c)** está relacionado con la fracción SA, y la misma comparación de los incisos anteriores, y no presenta cambios significativos, manteniendo los mismos enlaces que pertenecen al extracto hasta la PRHSH, a pesar de contener enlaces como C-O, C=O y OH que han demostrado ser partícipes, y puede deberse a la interacción del grupo de familias que hay en esta fracción, o la concentración de los mismos, entre otros factores, ya que a su vez permanece la sal hasta el producto de reacción seco.

La fracción SB, se observa que tiene enlaces mayormente definidos y menos sobrelapados que en las fracciones anteriores, ya que proviene de un fraccionamiento que definió mejor a los enlaces, es comparada con los espectros PRSB en donde se observa que permanecen para PRS los enlaces de la fracción ocurriendo solamente un ensanchamiento de la señal desde 1436 cm^{-1} - 1270 cm^{-1} , cabe destacar que en esta etapa de síntesis ya no se observan las señales de la sal precursora, como en las demás fracciones. Esto es relevante, ya que exhibe a una familia de metabolitos presentes en la fracción que interaccionaron con la sal y permanecieron en el producto de reacción, cabe señalar que dicha fracción contiene compuestos fenólicos en su mayoría, entre los que destacan, ácido gálico, ácido clorogénico, esteviósido y rebaudiósido, revelado en TLC en este trabajo y reportado por Wojewoda *et al.*, (2018) y algunos autores como Abdul *et al.*, que reportaron al ácido gálico como facilitador de la síntesis y Rodríguez *et al.*, (2013) a los esteviósidos utilizados como plantillas. El producto de reacción llevado al horno fue la única muestra que tuvo una absorbancia en 600 cm^{-1} y un comportamiento similar al ZnO comercial.

En la **Figura 36 (e)** se muestra a la fracción acuosa residual, en comparación con la PRSAR, PRHSAR y la sal precursora, se mantienen el estiramiento del C=O y las vibraciones en 1217 cm^{-1} pertenecientes a los fenoles. No obstante, en el PRHSAR se observa la presencia de los enlaces de la sal, lo que lleva a suponer que a pesar de contener enlaces parecidos a la fracción SB, la concentración no es la suficiente para que exista una conversión total.

7.13. Espectros de FT-IR para las reacciones y productos de reacción con *Moringa Oleífera*

De igual manera que para *Stevia* se realizó el análisis FT-IR para los productos con *Moringa*. En la **Figura 37 (a)** se observa la degradación del enlace metilo en 2902 cm^{-1} , en 1428 cm^{-1} la vibración de la estructura de los anillos aromáticos C=C, la banda a 1365 cm^{-1} correspondiente a cetonas, los alcoholes primarios, secundarios, y terciarios en 1162 cm^{-1} , 1106 cm^{-1} y 1044 cm^{-1} respectivamente. Así como aminas en 900 cm^{-1} , las cuales permanecen al producto de reacción. 1630 cm^{-1} de C=O y 1311 cm^{-1} , los cuales pertenecen a la sal. Para el PRHM se ensancha la banda en 1582 cm^{-1} y la absorción en 1353 cm^{-1} que pertenece a la sal ya no es tan intensa, permaneciendo el enlace de alcoholes secundarios en 1114 cm^{-1} , en el espectro no se indica el comportamiento del pico característico del ZnO. Sin embargo, más adelante se revela su presencia. Esta fracción contiene una ventana amplia de familias de metabolitos, y aunque se presenta la formación del compuesto, no ocurre la síntesis en su totalidad, esto puede deberse a la concentración o la variedad de estos grupos, que hicieron un impedimento para que se llevara a cabo la síntesis en su totalidad. Matinise *et al.*, (2017) reporta un comportamiento similar, aunque en su trabajo manejan temperaturas de calcinación de $500\text{ }^{\circ}\text{C}$.

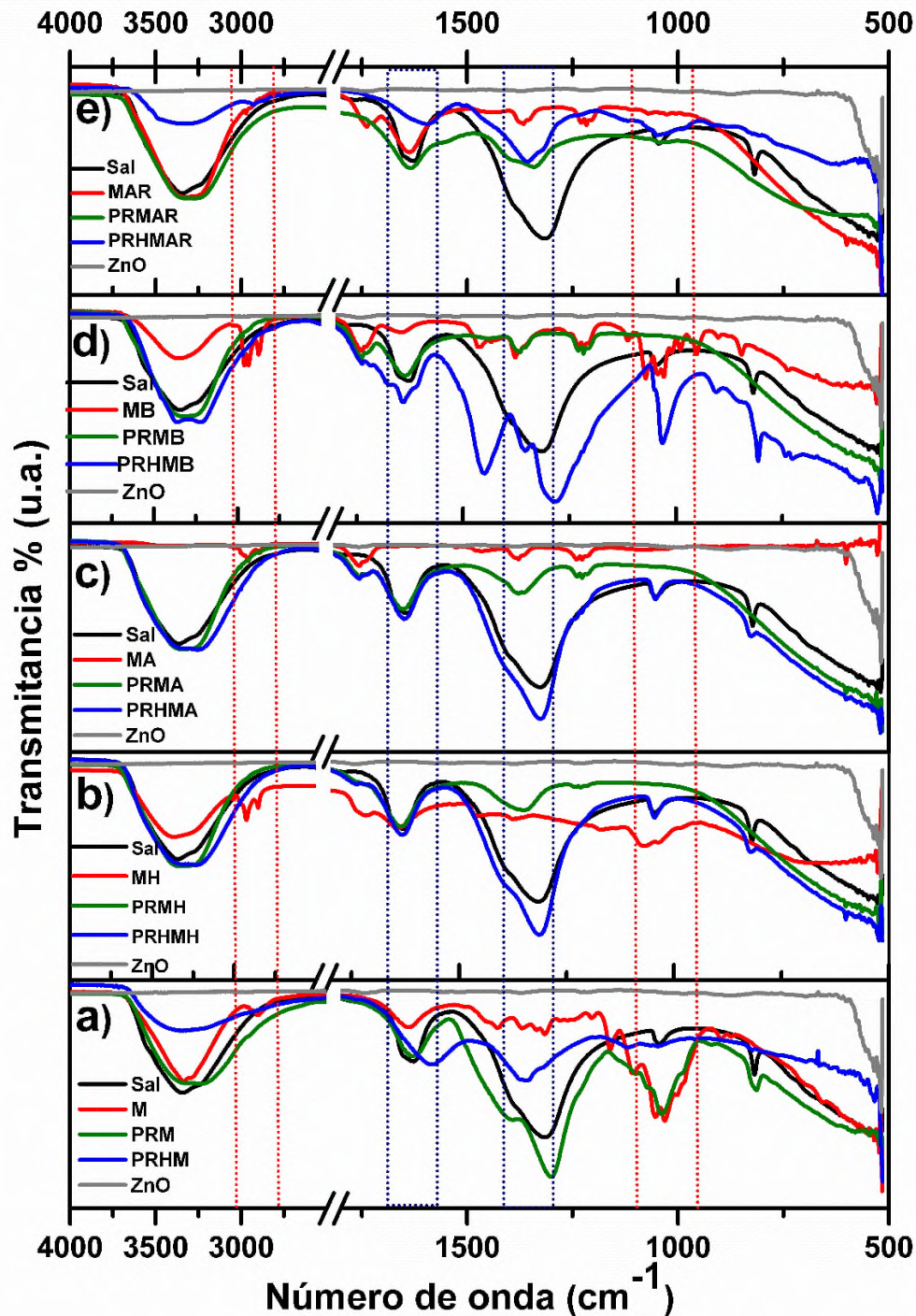


Figura 37. Espectros de FT-IR de la sal precursora, extracto de la planta o su fracción, producto de reacción, producto de reacción llevado al horno y ZnO comercial, a) extracto de *Moringa*, b) fracción de hexano del extracto, c) fracción acetato de etilo, d) fracción de n-butanol del extracto de *Moringa*, e) fracción acuosa residual

En la **Figura 37 (b)** del espectro PRMH, no se observan las bandas en 2920 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} y 1071 cm^{-1} , las cuales pertenecen a la fracción MH, se considera que se han degradado durante de síntesis. Para el PRMH se observa un espectro parecido a la sal precursora, presentando el mismo patrón que para SH. La **Figura 37 (c)** correspondiente a la fracción MA, muestra menor diversidad de enlaces que para el producto de reacción. Las bandas han sido sobrelapadas en su totalidad por las bandas de la sal, las cuales predominan en el PRMH. Los espectros de la fracción MB mostrados en la **Figura 37 (d)**, tienen la presencia de metilos (2950 cm^{-1}), los cuales son completamente degradados en la síntesis y los enlaces que perteneces a la fracción son sobrelapados en PRMB por las bandas de la sal. Para PRMB se observan enlaces C=O (1726 cm^{-1}), cetonas (1354 cm^{-1}) y fenoles (1228 cm^{-1}) sin comportamiento de óxido. Esta fracción permitió observar que los compuestos bioactivos de la misma, permiten una conversión total de la sal, pero que aún existen interrogantes del mecanismo de síntesis, ya que a pesar de ser compuestos que puede reducir la sal, su especificidad es importante. En la **Figura 37 (e)** se muestran los espectros relacionados a la fracción MAR, en el PRMAR no se observa el enlace C=O de la fracción MAR y ocurre un ensanchamiento de la señal que se encuentra entre 1729 cm^{-1} y 1554 cm^{-1} . Esto está relacionado con la interacción de los compuestos bioactivos y la sal, perdiendo intensidad de absorción del pico más característico del precursor en 1337 cm^{-1} , a diferencia de la MB en el espectro PRMAR, ya no se presentan todas las bandas de la sal. PRHMAR muestra humedad, así como absorción en 1600 cm^{-1} , en 1353 cm^{-1} y 1038 cm^{-1} . Su comportamiento resulta interesante, ya que el espectro tiene similitud con PRHM, esta fracción contiene después de MB la mayor concentración de fenoles totales en el fraccionamiento, dentro de los fenoles reportados se encuentran ácido gálico, ácido cafeico, rutina y catequina. El ácido gálico se detectó por TLC realizada previamente en este trabajo. Estos compuestos fenólicos han sido reportados por ser metabolitos que reducen al precursor metálico y ser estabilizantes al mismo tiempo (Landeros *et al.*, 2015).

7.14 Espectros de absorción UV-vis del extracto de *Stevia* (S) y fracciones SH, SA, SB, SAR, con su respectiva reacción de síntesis.

Los espectros de absorción UV-vis de las reacciones se observan en la **Figura 38**.

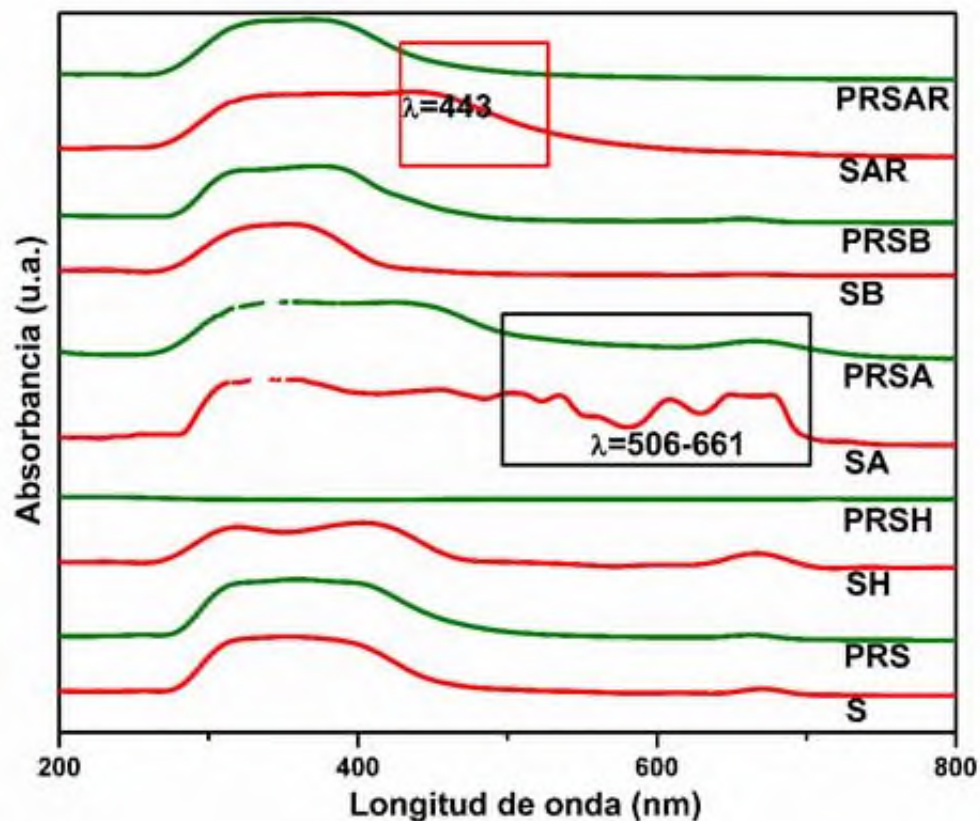


Figura 38. Espectros de absorción del extracto de *Stevia* (S) y fracciones SH, SA, SB, SAR, con su respectivo producto de reacción.

La absorción corresponde al extracto de *Stevia* o la fracción (rojo) y la absorción del producto de reacción (verde). Inicialmente, se compara el extracto (S) vs el producto de reacción (PRS), el cual presenta un ensanchamiento de la señal y la degradación del grupo cromóforo a los 675 nm presente en el extracto. Esto puede deberse a una reacción de los compuestos en la etapa de síntesis. Sin duda, es difícil definir por esta técnica la presencia del compuesto ZnO que absorbe a 400 nm (Zak *et al.*, (2011), porque el extracto sobrelapa la señal a esta longitud de onda. El espectro en verde, representa la fracción SH y su respectivo producto de

reacción, es importante observar que el extracto contiene tres señales que se degradan por completo en la reacción. Esto puede deberse a que la cantidad de compuestos en la fracción no fueron los adecuados para llevar a cabo la síntesis, quedando la mezcla de reacción saturada por la sal precursora, y que al no tener grupos cromóforos, PRSH no muestra absorbanza. El espectro SA se compara con el producto de reacción generado, es muy evidente un cambio de las señales que se ubican entre 506 nm y 661nm, que se señalan con un recuadro en negro. Estas señales pueden corresponder a los carotenoides y clorofila a que se degradaron o reaccionaron en la síntesis, ya que la señal del óxido de zinc, se sobrelapa con la señal de la PRSA. Es difícil decir por esta técnica si se obtuvo el compuesto. Se observa que se desplaza hacia la derecha la absorción UV-Vis para el PRB respecto a SB. Este desplazamiento es importante para predecir que el ensanchamiento se debe al sobrelapamiento de la señal del ZnO. Para el espectro PRSAR el comportamiento de la señal de la reacción es muy evidente con respecto a SAR, ya que la señal que se encuentra a los 443 nm se degrada en la reacción. En esta región de absorción se encuentran los carotenoides, estas estructuras comprenden una familia amplia de estructuras, que no han sido definidas como precursoras en la síntesis de NPs, pero contienen la estructura afín para la reducción de sales de nitrato de zinc. Los reportes de síntesis de nanopartículas con extractos han sido realizados con el extracto crudo, si bien se han utilizado diferentes tipos de extracción (Gómez-Garzón., 2018), no se ha propuesto la síntesis con diferentes fracciones del mismo extracto. Por medio de este análisis es mayormente visible que existen algunos metabolitos o grupos de ellos que actúan en la síntesis de NPs.

7.15 Espectros de absorción Uv-Vis de las síntesis de nanopartículas con *Moringa oleífera*

Los espectros de absorción para la síntesis que se llevó a cabo con el extracto y sus fracciones se presentan en la **Figura 39**.

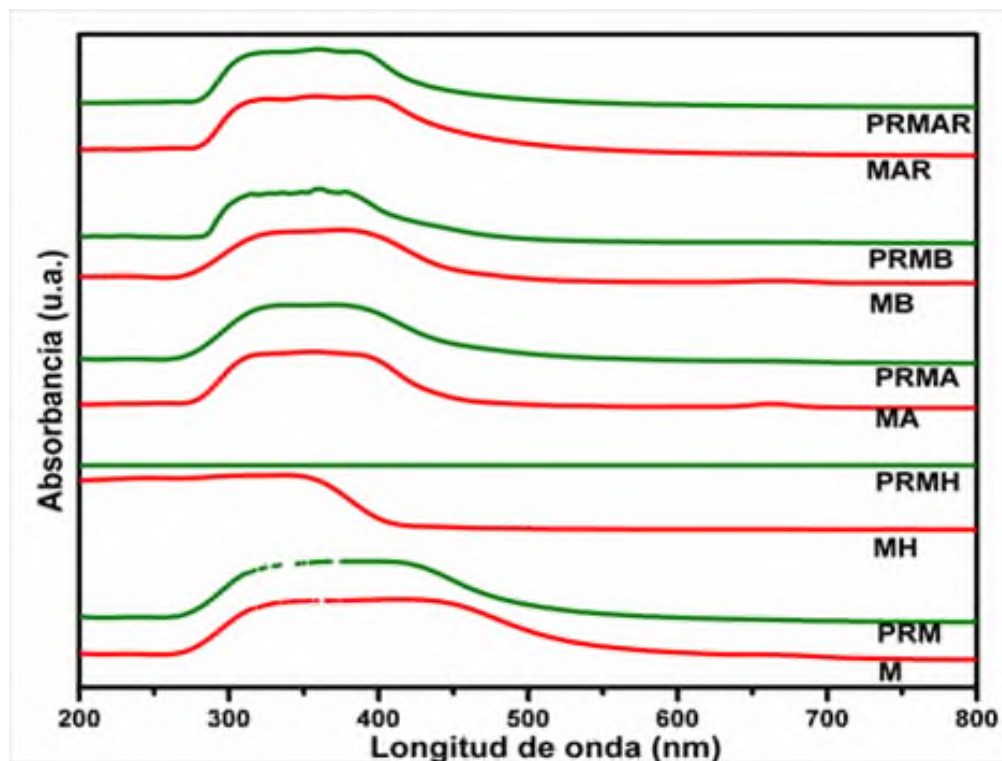


Figura 39. Espectro de absorción del extracto de *Moringa* y las fracciones, con sus respectivas reacciones de síntesis.

Los espectros de absorción corresponden al extracto o la fracción en color rojo y en verde el producto de reacción. El comportamiento de los espectros es muy similar, que se basa en un ensanchamiento de la señal para el PR, en cada una de la fracción a diferencia de la PRMH que no presenta absorción, este espectro es análogo a PRSH que se debe a la falta de grupos cromóforos que absorban, posiblemente por una degradación o bien por una saturación de la sal precursora. En el reporte de Matinise *et al.*, (2017) indica la absorción del óxido de zinc a los 350 nm, pero no se encuentra comparado con el extracto. No obstante, es claro que las señales se solapan, por lo que son importantes los análisis hechos con FT-IR para esclarecer las posibles estructuras.

7.16 Análisis térmico de los productos de reacción con el extracto *Stevia rebaudiana* y sus fracciones SH, SA, SB, y SAR

Los análisis térmicos que se realizaron para los productos de reacción con extracto de *Stevia* y sus fracciones se presentan en la **Figura 40**, para determinar que compuestos pueden estar involucrados con la síntesis sin que afecte su termosensibilidad.

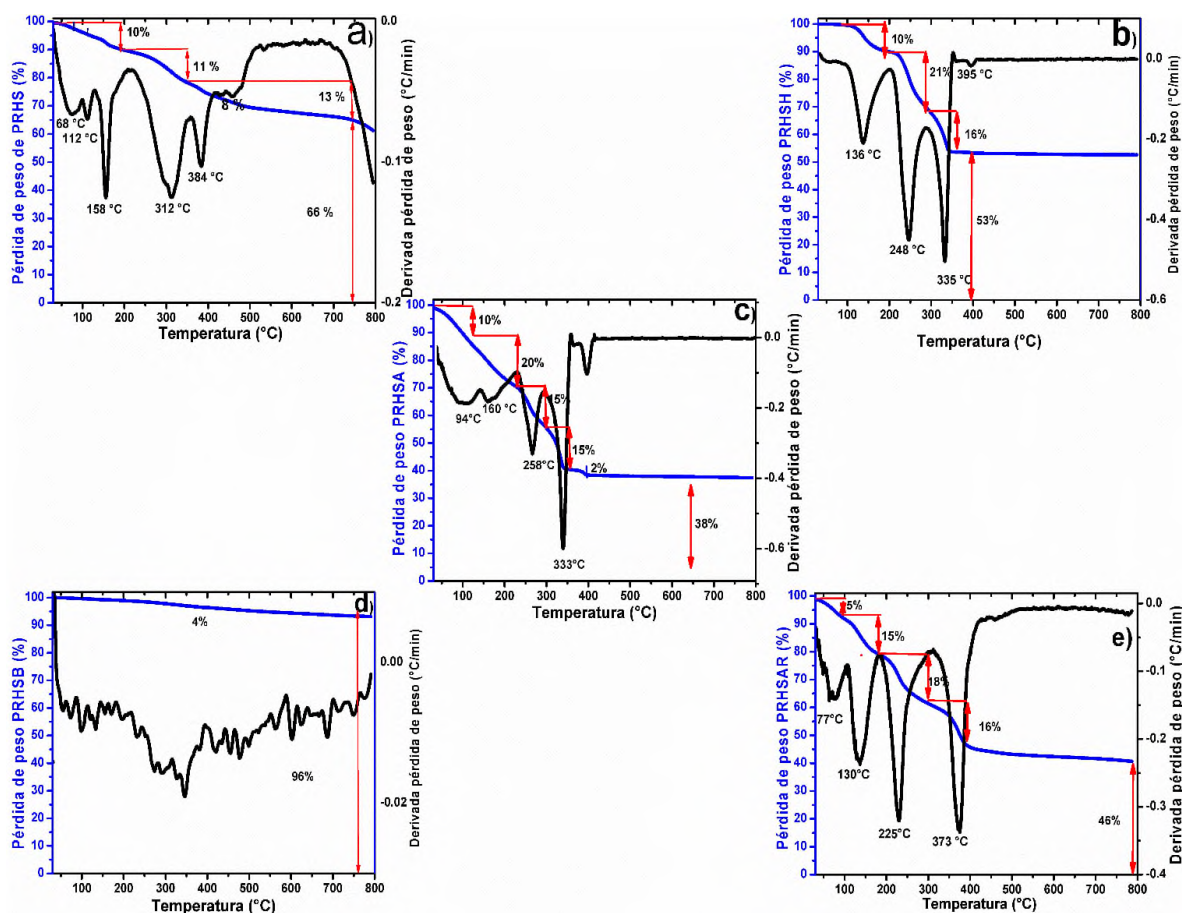


Figura 40. Análisis termogravimétrico de las síntesis de NPs ZnO con extracto a) S y sus fracciones b) PRHSH c) PRHSA d) PRHSB e) PRHSAR

En los termogramas de la **Figura 40**, se analizaron las muestras de los productos de reacción secos, esto permitió distinguir las temperaturas en las cuales sigue habiendo una descomposición del producto. En el inciso (a) se presenta el termograma PRHS, mostrando pérdida pequeña a los 68 °C, seguida a 112 °C,

158 °C y una pérdida cercana a los 400 °C. En el reporte mencionado por Aquino *et al.*, (2016), la conversión de la sal precursora a ZnO se encuentra cercana a esta temperatura. Esto concuerda con los resultados, ya que a partir de los 384 °C se genera una línea recta consistente hasta los 800 °C, generando un residuo del 66%, que puede estar relacionado con el compuesto ZnO y parte de las cenizas de los compuestos orgánicos. En el termograma (b) se presenta PRHSH con diferentes pérdidas de peso en temperaturas promedio de 136°C, 248 °C y 335°C con un porcentaje de residuo del 53 %. De acuerdo al análisis FT-IR y UV-Vis en esta fracción no se ha presentado una conversión total en la síntesis, por lo que se descartan las familias de esta fracción como facilitadores para la síntesis de ZnO. El termograma (c) tiene una pérdida de peso inicial importante a los 94 °C del 10% debido a la humedad de la muestra, seguida de una pérdida del 20 % a los 160 °C, pérdidas seguidas del 15 % a 258 °C y 333 °C presenta a su vez un 38 % de residuo. Indicando que, en esta fracción, el producto de reacción contiene más compuestos orgánicos que el compuesto sintetizado. El análisis realizado para el producto de reacción PRHSB (d) muestra un patrón muy interesante, ya que las pérdidas de peso son mínimas en comparación con las fracciones anteriores, incluso con el extracto crudo. En total existe una pérdida del 6 %, con un residuo del 94 %. Esto es congruente con caracterizaciones previas del producto de reacción, ya que el espectro IR presenta solo algunos picos de compuestos orgánicos lo que indica la presencia del compuesto ZnO en su mayoría, y por DRX los resultados dieron positivo para el compuesto ZnO con picos bien definidos, al comparar estas evidencias se indica que la mayor cantidad del residuo obtenido corresponde al ZnO sintetizado para el PRHSB. El análisis para PRHSAR (e) señala la pérdida de peso a los 77°C, en 130 °C, con una caída máxima a los 225 °C quedando un residuo del 46 %. Es evidente en las gráficas los porcentajes diferentes de pérdida de peso, para cada fracción y los diferentes porcentajes de residuos. Por lo tanto, este análisis permite definir que las familias de los metabolitos influyen en la formación y estabilización de NPs, y al someter las muestras a una temperatura mayor parece garantizar la formación de

nanopartículas estables de ZnO. Khatami *et al.*, (2018) aseguran que los compuestos glicosilados rodean a la nanopartícula.

7.17. Análisis térmico de los productos de reacción con el extracto *Moringa oleífera* y sus fracciones MH, MA, MB, y MAR

El estudio por TGA mostrado en la **Figura 41** pertenece a las reacciones con *Moringa*. Se muestran los productos de reacción con extracto crudo de *Moringa* y las fracciones que resultaron del mismo. En la **Figura 40 (a)** se indica el termograma de PRHM, con una pérdida total de peso del 35 %. De acuerdo a las caracterizaciones previas de FTIR y DRX que evidenciaron la obtención del compuesto con extracto crudo, se demuestra el contenido de ZnO en un 45 % por cada 100% de producto de reacción sintetizado. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Matinise *et al.*, (2017) y Salaheldeen *et al.*, (2014). En la **Figura 40 (b)** que corresponde al termograma de MH. Presenta una pérdida inicial a los 136 °C por la pérdida de humedad y los compuestos termosensibles en la reacción. La pérdida mayor ocurre a los 324 °C y contiene un residuo del 65 %. El espectro en (c) corresponde a PRMA, tiene una pequeña pérdida a los 129 °C. En esta fracción sería posible aumentar la temperatura de secado hasta los 300 °C, lo cual llevaría según este análisis a una conversión mayor del compuesto ZnO, ya que el residuo corresponde a un 62 %. De acuerdo al termograma (d), esta fracción demostró ser eficaz para la obtención de ZnO, con una conversión casi total usando *Stevia rebaudiana*. No obstante, con *Moringa* presenta caídas importantes que representan un 48 % hasta los 453 °C, con un residuo del 52 %. De acuerdo a estas evidencias, los extractos contienen compuestos distintos que favorecen en distinta medida la reacción. Por ultimo (e) representa a la fracción acuosa residual, muestra pérdidas a los 78°C, 151 °C, 225°C y 357°C, presentando un residuo del 60 %. Esta fracción evidenció de acuerdo a las caracterizaciones previas de FTIR y DRX la presencia del compuesto ZnO.

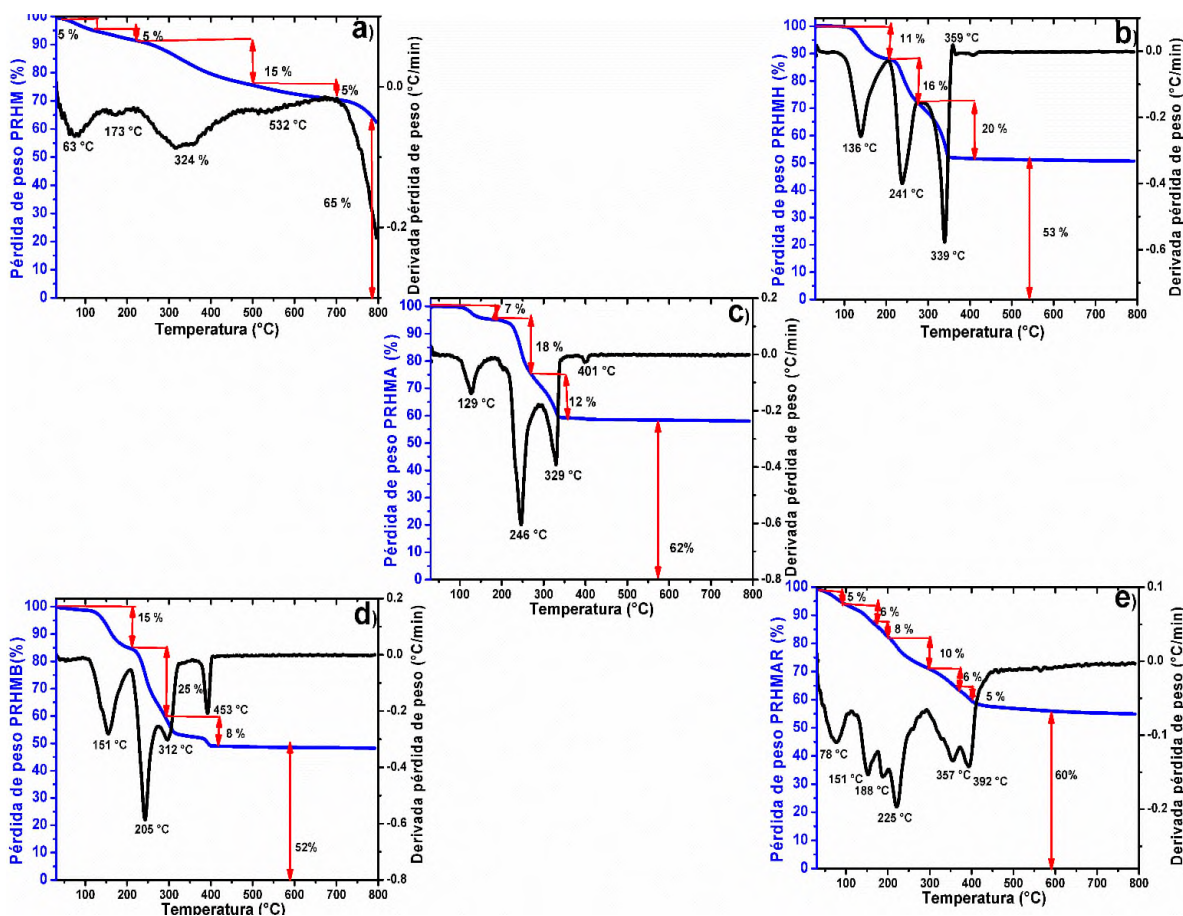


Figura 41. Análisis termogravimétrico de las síntesis de NPs ZnO con extracto a) M y sus fracciones b) MH c) MA d) MB e) MAR

7.18 Patrones de DRX de los productos de reacción con el extracto *Stevia rebaudiana* y sus fracciones SH, SA, SB, y SAR

Los patrones de difracción que se muestran en la **Figura 42** pertenecen a los productos de reacción que se llevaron a cabo con el extracto crudo de *Stevia* y con las fracciones. Se puede ver claramente la interacción que tuvo cada una de las fracciones al mostrar señales pertenecientes para ZnO en los PRHS y PRHSB. El PRHSB mostró picos definidos y con mayor intensidad en $2\theta = 31.6, 24.4, 36.3, 47.5, 56.7, 63.0, 68.1$. Esta fracción contiene mayoritariamente glucósidos de esteviol y compuestos fenólicos revelados anteriormente en las placas TLC. Tomando en cuenta la concentración permitió llevar a cabo una mejor síntesis. La diferencia en la síntesis entre PRHS y PRHB es que el primer producto de

reacción contiene un mayor número de compuestos, que pueden tener un impedimento para que se lleve a cabo una conversión total. Sin embargo, se obtuvo el compuesto con picos menos intensos, pero bien definidos. Algunos reportes de síntesis con extractos de plantas para la obtención de ZnO se han obtenido resultados similares (Matinise *et al.*, 2017; Elumalai *et al.*, 2017). Este resultado es congruente con los análisis previos de FT-IR y TGA. Las fracciones PRHSA, PRHS, y PRHSAR poseen una estructura cristalina distinta a ZnO. La cristalinidad observada puede deberse a la cantidad de compuestos o residuos del extracto que aún contiene el producto. En PRHSA también se observa el pico máximo en $2\theta = 12$, el cual pertenece a la sal precursora, lo que indica un remanente de la misma.

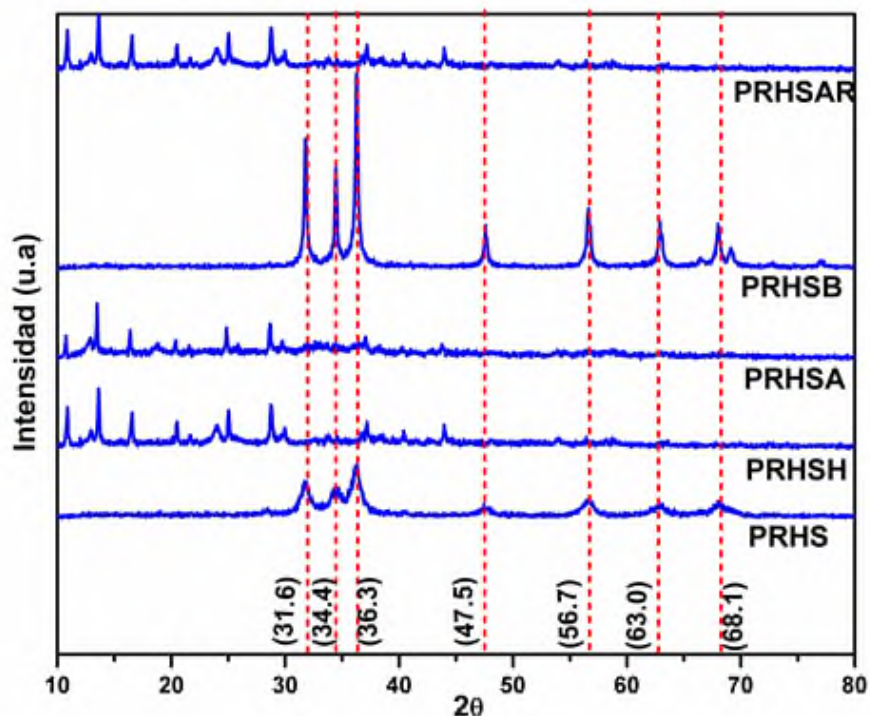


Figura 42. Patrones de DRX de los productos de reacción con el extracto de *Stevia rebaudiana* (S) y sus fracciones SH, SA, SB, SAR.

7.19 Espectro de difracción de rayos X de las reacciones con el extracto de *Moringa* y las fracciones MH, MA, MB, MAR.

Los patrones de difracción para los productos de reacción con *Moringa* se muestran en la **Figura 43**.

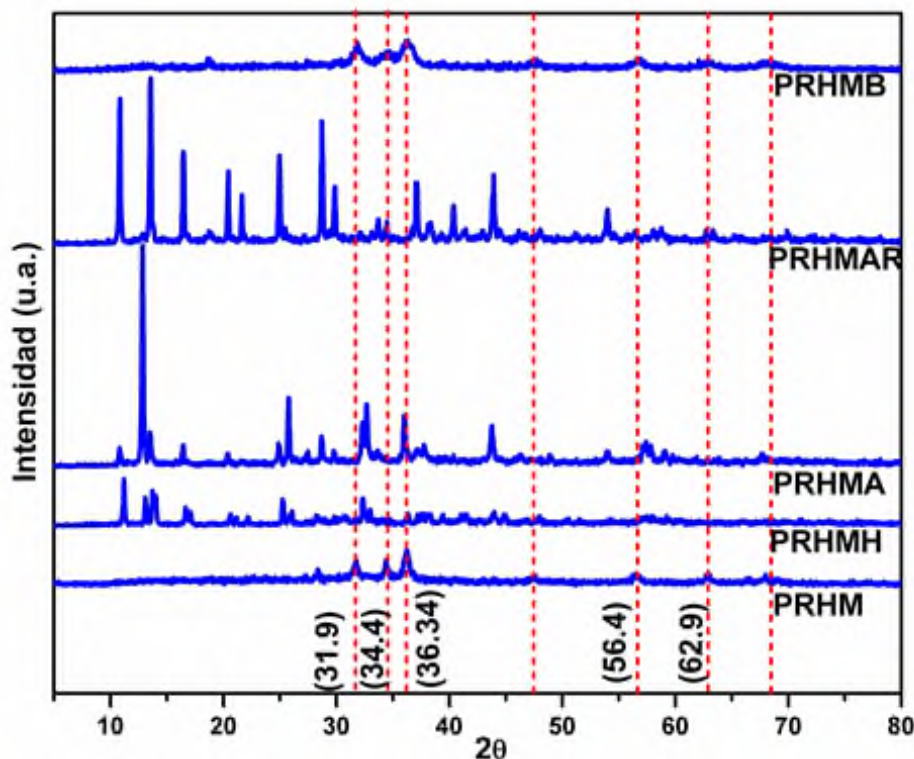


Figura 43. Patrones de DRX de los productos de reacción con el extracto de *Moringa oleífera* (M) y sus fracciones MH, MA, MB, MAR.

En el difractograma de la **Figura 43** se muestran los productos de reacción del extracto de *Moringa* y sus fracciones. Los productos de reacción muestran picos muy variados, algunos picos característicos del ZnO, PRHMB muestra picos característicos del ZnO en $2\theta = 34$ y 56 y los demás picos no corresponden a la estructura del semiconductor. PRHM también muestra picos característicos de óxido de zinc. Contrariamente, PRHMAR, PRHMA y PRHMH no muestran picos característicos del óxido de zinc.

Existe una similitud entre las fracciones que son óptimas para la síntesis entre los dos extractos, siendo tanto para *Stevia* como para *Moringa* la fase butanol y los

extractos crudos. En cuanto a la intensidad de los picos, *Stevia* muestra picos más definidos e intensos.

7.20 Morfología de nanopartículas formadas a partir de extractos de *Stevia* y su fracción n-butanol, extracto de *Moringa* y fracción acuosa residual.

El análisis para determinar la morfología de las partículas y el tamaño se llevó a cabo por SEM a diferentes magnificaciones. Se analizaron los productos de reacción con extracto crudo de *Stevia* y la fracción n-butanol del mismo, así como de *Moringa* y la fracción acuosa residual.

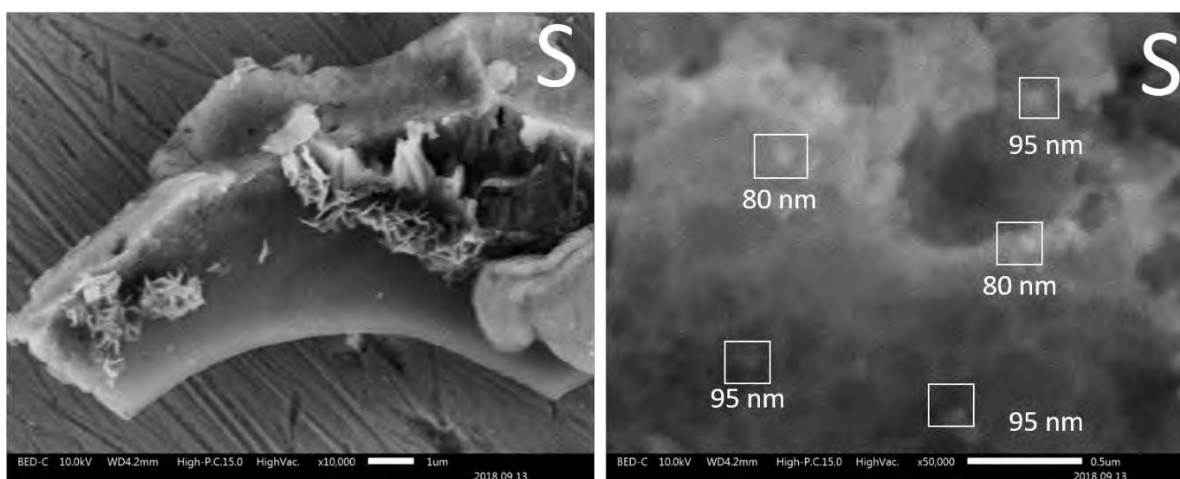


Figura 44. Microscopia electrónica de barrido de NPs-ZnO a 10,000x y x50,000x utilizando el extracto crudo de *Stevia* en la síntesis.

De acuerdo a la **Figura 44**, se observó una superficie irregular, formada por grupos de partículas esféricas con tamaños entre 80 a 100 nm. Este tipo de morfología también se muestra en el trabajo de Bala *et al.*, (2015), bajo una síntesis con extracto de *Hibiscus subdariffa*. Se analizó la muestra mediante la técnica EDS mostrada en la **Figura 45**, esta técnica ayuda a la confirmación de la presencia del ZnO, donde se definen las bandas de emisiones correspondientes para el Zn, O, y Cu en el espectro. La señal Cu proviene de la rejilla de cobre. Los porcentajes atómicos estimados de Zn y O en la muestra fueron de 40 y 20

respectivamente. Esto confirma la presencia de ZnO, tal como se indicó con los patrones de difracción de rayos X.



Figura 45. Espectro típico de EDS para la muestra PRHS.

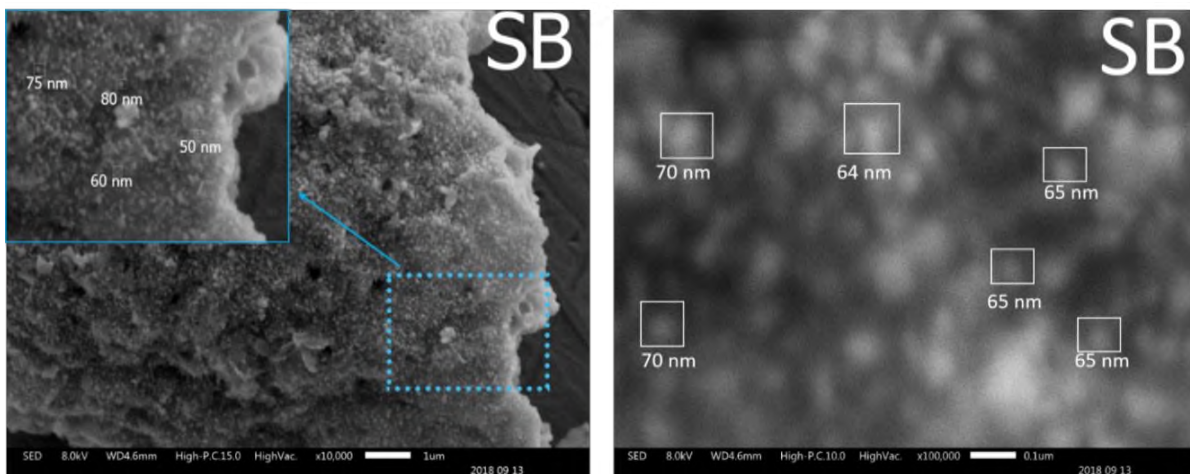


Figura 46. Microscopia electrónica de barrido de NPs-ZnO a 10000x y 100,000x, utilizando la fracción butanólica del extracto de *Stevia* en la síntesis.

En la **Figura 46**, se observa la muestra del producto de reacción de la fracción de n-butanol del extracto de *Stevia*. Las partículas son uniformes y están formando un sistema aparentemente poroso. Al aumentar la magnificación se logra ver que las nanopartículas esféricas presentan tamaños entre 60 y 80 nm. Similar a los resultados ya reportadas por Karnan *et al.*, (2016) y Jiangfeng *et al.*, (2011), pese a que las nanopartículas fueron obtenidas con distinta metodología de síntesis.

Las nanopartículas con la fracción de butanol son más apreciables en forma y tamaño que las nanopartículas del extracto crudo. Los análisis previos de FT-IR mostraron que existen diferentes compuestos orgánicos para cada fracción, por lo que se considera que estos metabolitos influyen en la morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas. Adicionalmente, por medio de análisis por espectroscopía de energía, acoplada al microscopio de barrido (SEM-EDS) se calculó la composición porcentual promedio de cada una de las muestras (**Figura 47**). Para la muestra PRHSB la intensidad del pico de Zn corresponde a un 60 % y el oxígeno en un 20 %, el carbono también está presente y se puede observar en una menor proporción distribuida en el sistema. Sin embargo, por medio del análisis de TGA, los resultados para esta muestra fueron del 94 % de residuos, considerando que corresponden al contenido de nanopartículas.

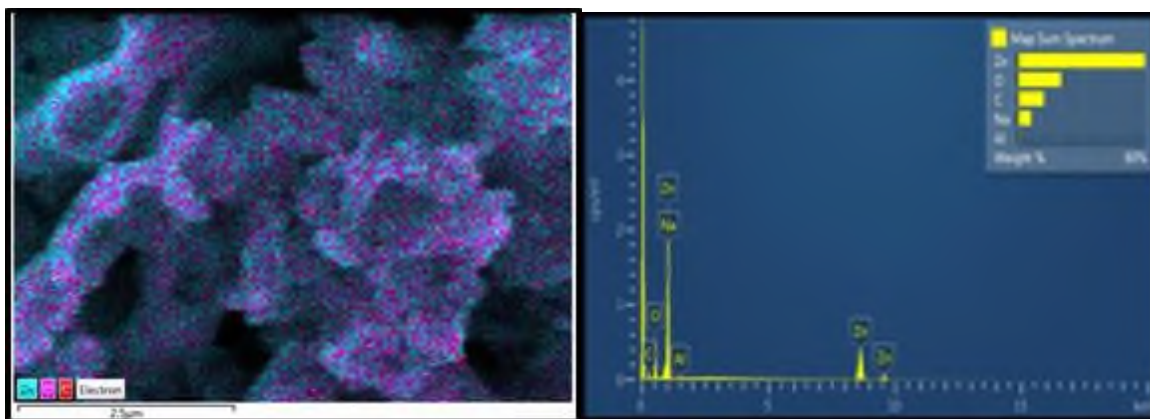


Figura 47. Análisis EDS de la muestra PRHSB, del lado izquierdo se muestra en diferentes colores la presencia del Zn, O y C y del lado derecho en forma gráfica.

Las muestras con NPs-ZnO utilizando extracto de *Moringa* se presentan en la **Figura 48**. Aparentemente, existen esferas de óxido de zinc de un tamaño aproximado de 100 nm adheridas a una superficie irregular. Los resultados son similares al trabajo de Ramesh et al (2014) quienes sintetizaron ZnO con extracto de *Solanum nigrum*. A pesar de que los análisis por DRX muestran patrones similares de nanopartículas de óxido de zinc con ambos extractos. Los resultados por SEM de la síntesis de Nps-ZnO con extracto de *Moringa* muestran una

morfología distinta de los resultados con el extracto de *Stevia*. Esto se debe al diferente comportamiento de los metabolitos para el desarrollo de las nanopartículas.

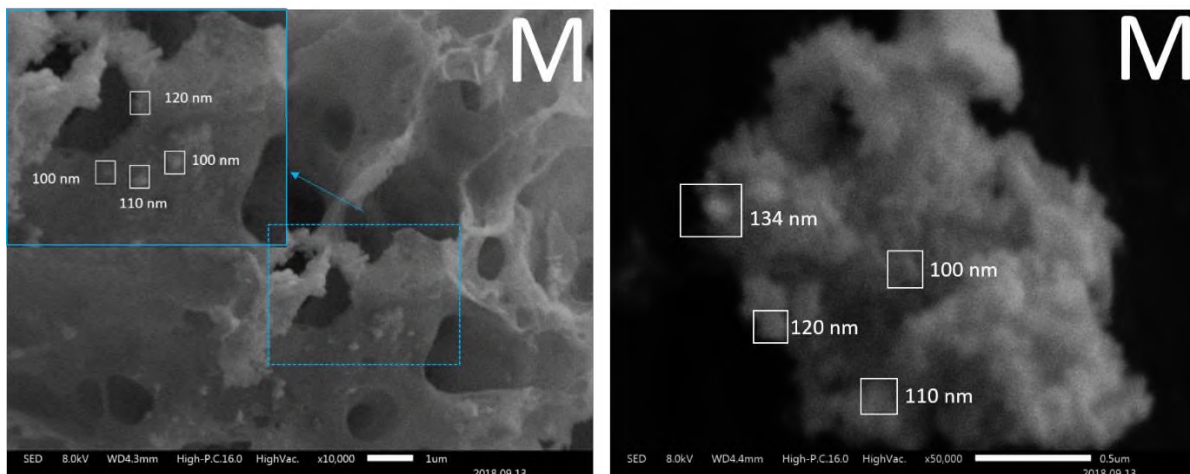


Figura 48. Microscopia electrónica de barrido de NPs ZnO a 10,000x y 50,000x, utilizando extracto de *Moringa* en la síntesis.

Para la validación del resultado de DRX, la muestra de la síntesis con la fracción acuosa residual del extracto de *Moringa* se analizó por SEM. En la **Figura 49** se presenta las micrografías con magnificaciones de 10000x y 50000x.

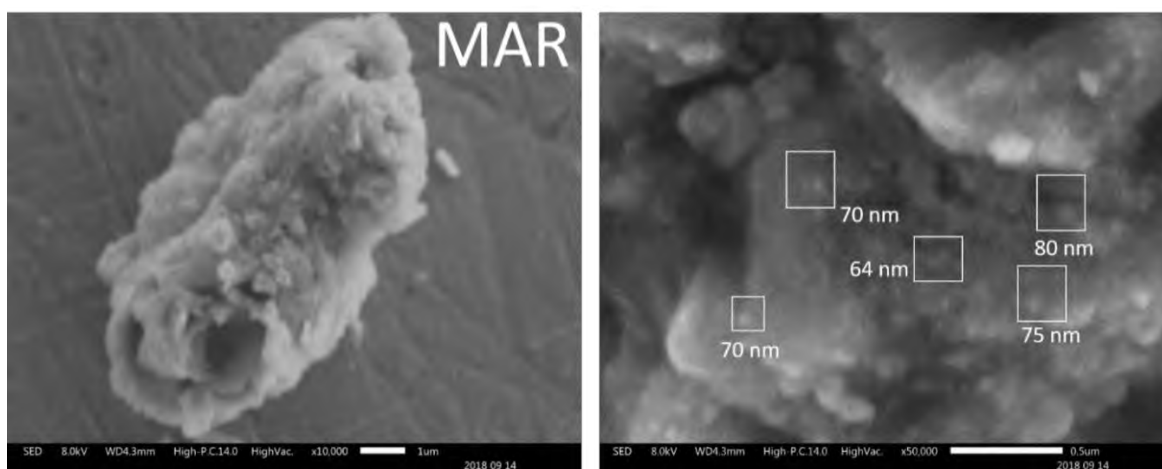


Figura 49. Microscopia electrónica de barrido de NPs-ZnO 10,000x y 50,000x, utilizando la fracción acuosa residual de n-butanol del extracto de *Moringa* en la síntesis.

Se pueden observar aglomeraciones, tipo placas que están compuestas por partículas esféricas con tamaños de partículas entre 64 y 80 nm. La morfología resultó similar con la obtenida en la fracción n-butanol del extracto de *Stevia*. Esto es relevante ya que los metabolitos presentes en la fracción de n-butanol de *Stevia* y en acuosa residual de *Moringa* pueden estar interviniendo durante la reacción para la síntesis de nanopartículas. De acuerdo a los estudios por FT-IR, los metabolitos que predominan son compuestos fenólicos y alcoholes primarios y secundarios.

El análisis de EDS confirmó la composición química de las NPs de ZnO, tal como se muestra en la **Figura 50**. Los picos fuertes se observan desde Al, Zn en un 35% y el átomo de O en un 25%.

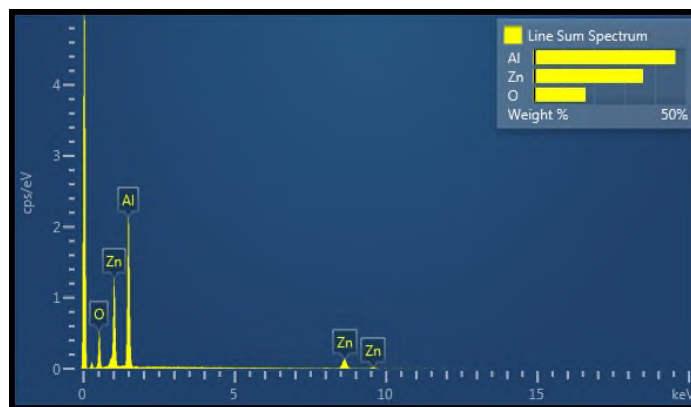


Figura 50. Análisis EDS de la muestra M con los porcentajes de Al, Zn y O.

7.21 Ensayo MTT con nanopartículas de ZnO y extracto de *Stevia* y *Moringa*

El análisis estadístico de los resultados del ensayo MTT, se presenta en la **Figura 51**. El estudio fue realizado con el programa GraphPad Prism 6.0. Los valores en las gráficas representan el valor de la media y el error de la media (EMS). Para las pruebas de citotoxicidad, los valores de IC50 y sus intervalos del 95% de confianza fueron obtenidos por regresión no lineal. Los datos de la función de acumulación se analizaron por regresión lineal y se analizaron las diferencias entre las pendientes mediante la prueba F. Las diferencias con el control negativo se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

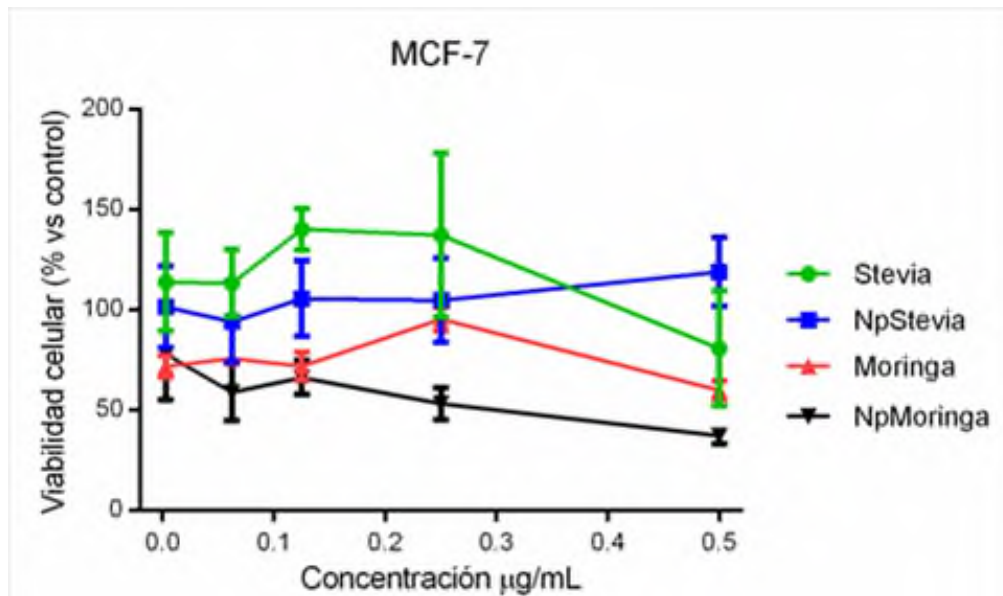
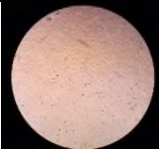
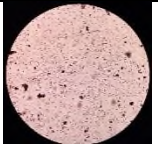
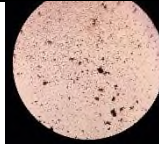
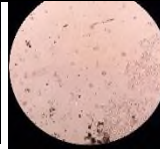
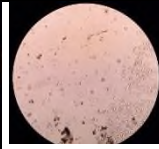
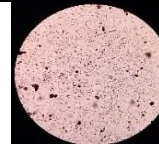

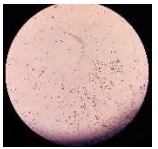
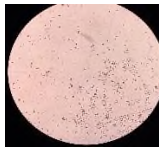
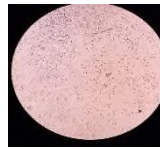
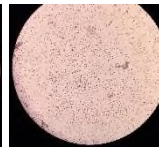
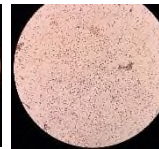

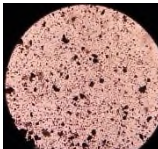
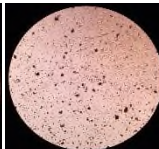
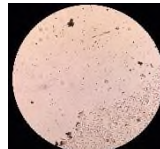
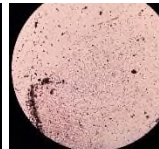
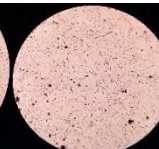


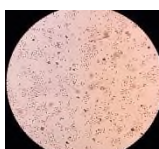
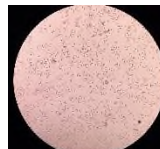

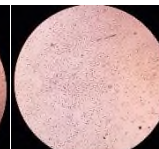


Figura 51. Gráfica del Ensayo MTT con nanopartículas de ZnO y extracto de *Stevia* y *Moringa*

El extracto de *Moringa* con NPsM, presentó un 37% de viabilidad celular de la línea MCF-7 con respecto al control. Esto concuerda visiblemente con las imágenes presentadas en la Tabla 4. La viabilidad de las células al agregar las NPs de *Stevia* no depende de la concentración de las nanopartículas, incluso sólo la concentración de 0.5 % µg/ml disminuyó la viabilidad. Usando NPs de *Moringa*, la viabilidad celular disminuye cuando la concentración de las NPs aumenta, por lo que todas las concentraciones muestran un efecto de citotoxicidad, estos resultados muestran altos valores de citotoxicidad según lo informado por Brunner *et al.*, (2006) quienes utilizaron concentraciones más altas y un tamaño mayor de partícula, los efectos de citotoxicidad están dados por las dosis administradas ya que al ser el zinc un oligoelemento esencial para la regulación de numerosos procesos críticos en los organismos vivos, este es metabolizable por lo que las células disponen de mecanismos de regulación de entrada del zinc muy sofisticados que les permiten capturar sólo las cantidades necesarias evitando así la toxicidad. Para fines terapéuticos o cosméticos es necesario establecer cantidades adecuadas para la obtención de resultados positivos para lo que se establecen técnicas que determinan la concentración mínima inhibitoria.

Tabla 4. Fotografías del ensayo MTT con la concentración de nanopartículas

Ensayo MTT con NPs ZnO y extractos de <i>Stevia</i> y <i>Moringa</i>						
	Control	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	0.625 µg/ml	0.3 µg/ml
Extracto de <i>Stevia</i>						
NPs-ZnO usando <i>Stevia</i>						
Extracto de <i>Moringa</i>						
NPs-ZnO usando <i>Moringa</i>						

7.22 Dispersión de Nanopartículas en películas de almidón

Con el fin de observar la dispersión de nanopartículas en un sustrato, se prepararon películas de almidón con cada producto de reacción.

En la **Figura 52** se muestran los resultados de la película de almidón con el extracto de *Stevia*. se observa un espesor de película de alrededor de 100 µm. Las nanopartículas están aglomeradas, pobremente dispersadas sobre almidón. Esto se debe preferentemente al método de preparación de las películas y a la compatibilidad entre los componentes (almidón y ZnO). No obstante, la dispersión, del producto de reacción (NPs-ZnO) que se obtuvo en este trabajo no muestra modificaciones dentro de la película de almidón. Castaño *et al.*, (2013) reportó una buena dispersión de almidón con nanopartículas de ZnO utilizando sonicación para la mezcla. Posiblemente, con cambios en la metodología de mezclado la dispersión sea mejorada.

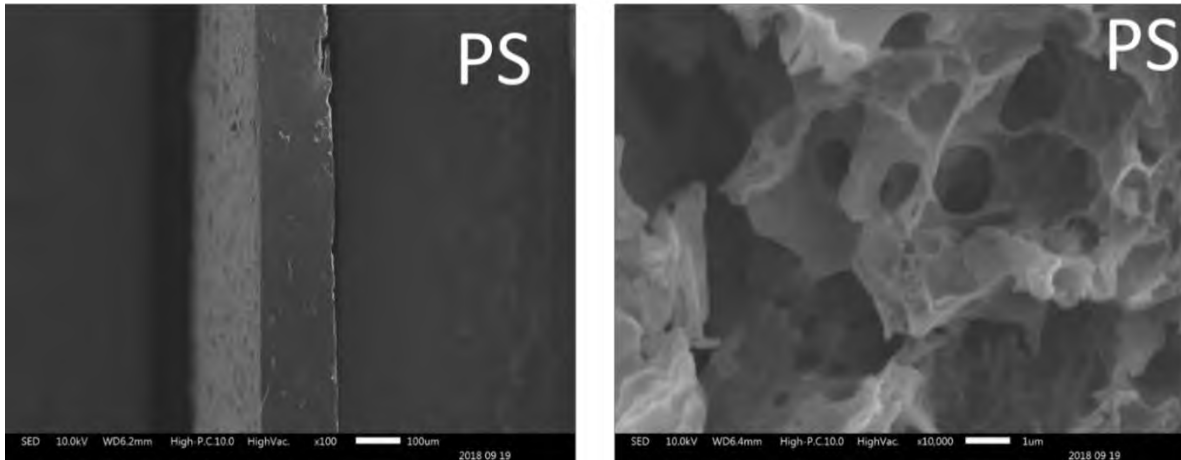


Figura 52. Microscopia electrónica de barrido de la película de almidón con NPs ZnO a 100x y 10,000x, utilizando extracto de *Stevia* en la síntesis.

En la **Figura 53**, se muestran las micrografías con el producto de reacción a partir de la fracción n-butanol.

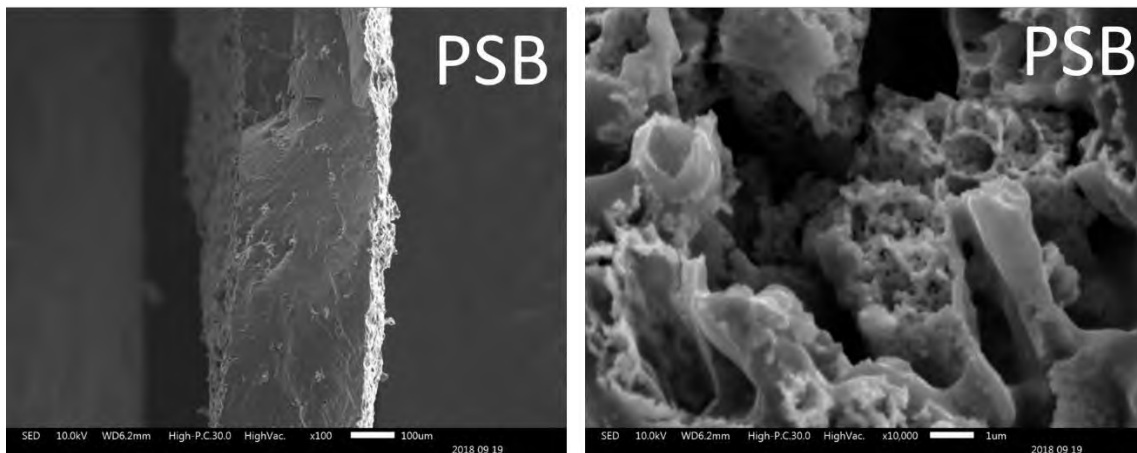


Figura 45. Microscopia electrónica de barrido de la película de almidón con NPs ZnO a 100x y 10,000x, utilizando la fracción n- butanol de extracto de *Stevia*.

Se observa que las partículas no están uniformemente distribuidas en las películas y que el tamaño de los aglomerados es relativamente grande, mayores a 10 micras. No obstante, las nanopartículas están presentes y mantienen su morfología esférica.

En la **Figura 54** se muestran las micrografías de las películas con el producto de reacción a partir del extracto de *Moringa*. Se observa una distribución homogénea,

pero con aglomerados no compactados en la superficie, es por ello que se generan huecos.

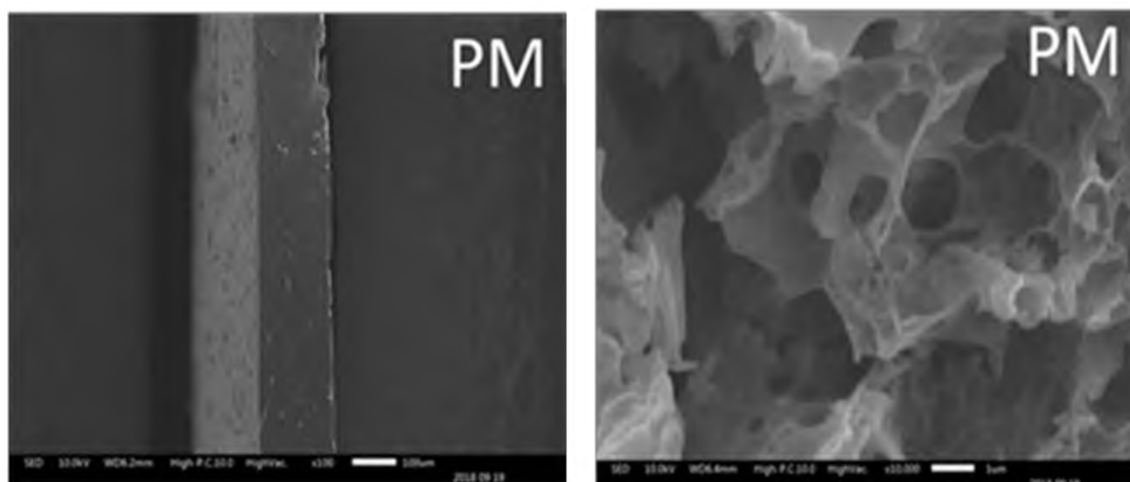


Figura 46. Microscopia electrónica de barrido de la película de almidón con NPs ZnO a 100x y 10,000x, utilizando extracto de *Moringa* en la síntesis.

El producto de reacción con la fracción acuosa residual de *Moringa* que se incorporó a la película de almidón se muestra en la **Figura 55**, donde se observa una distribución homogénea con aglomeraciones adheridas a la película. No se muestra un cambio en la composición de la misma.

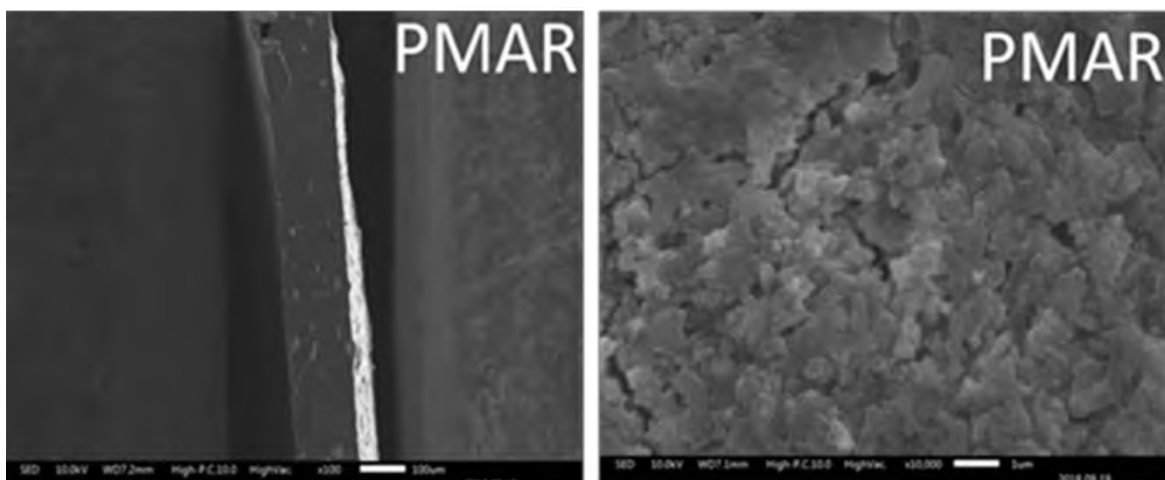


Figura 47. Microscopia electrónica de barrido de la película de almidón con NPs ZnO a 100x y 10,000x, utilizando la fracción acuosa residual del extracto de *Moringa* en la síntesis.

7.22.1 Análisis FT-IR para las películas de almidón con nanopartículas

En la **Figura 56**, se muestran los espectros de las películas de almidón con los productos de reacción de la síntesis de NPs-ZnO con las diferentes fracciones. Los resultados no muestran evidencia de un cambio significativo entre las películas.

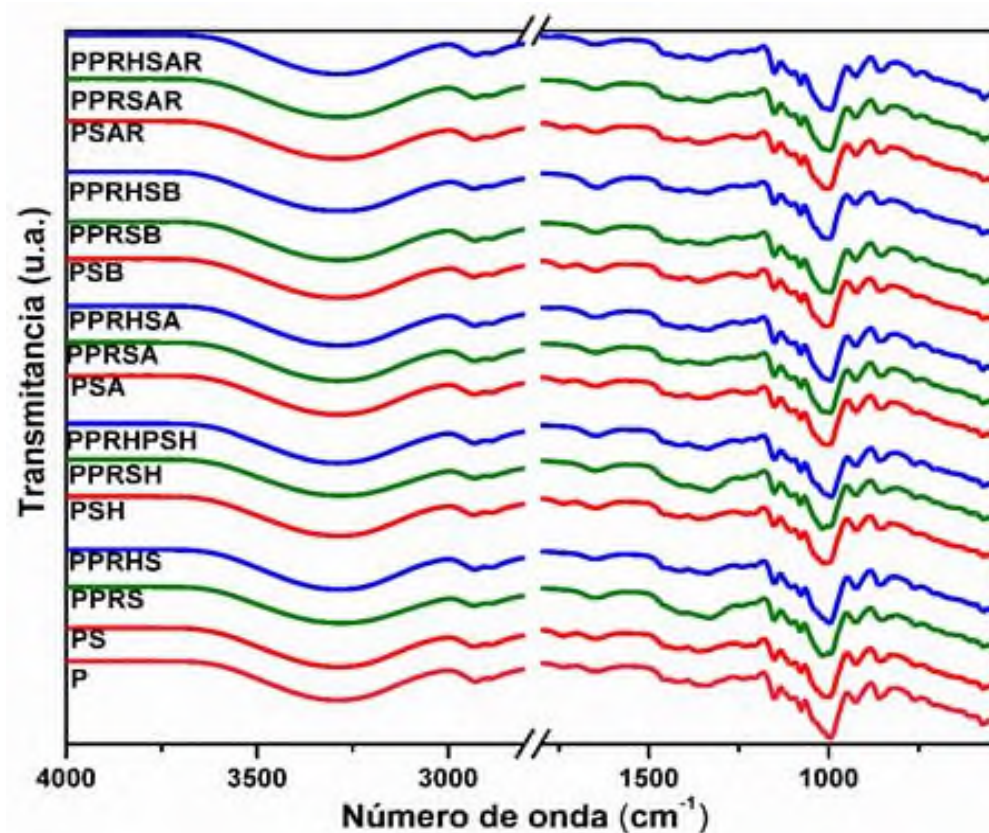


Figura 56. Espectros de FT- IR de las películas de almidón (P), con el extracto de *Stevia* (PS), las fracciones (PSH, PSA, PSB y PSAR) el producto de reacción (PPR) y el producto de reacción seco (PPRH).

La **Figura 57** muestra los espectros de las películas con las fracciones de *Moringa*. Similar al comportamiento en las fracciones de *Stevia*, no se observaron cambios evidentes de las bandas de absorción, indicando ausencia de interacciones químicas de enlace covalente.

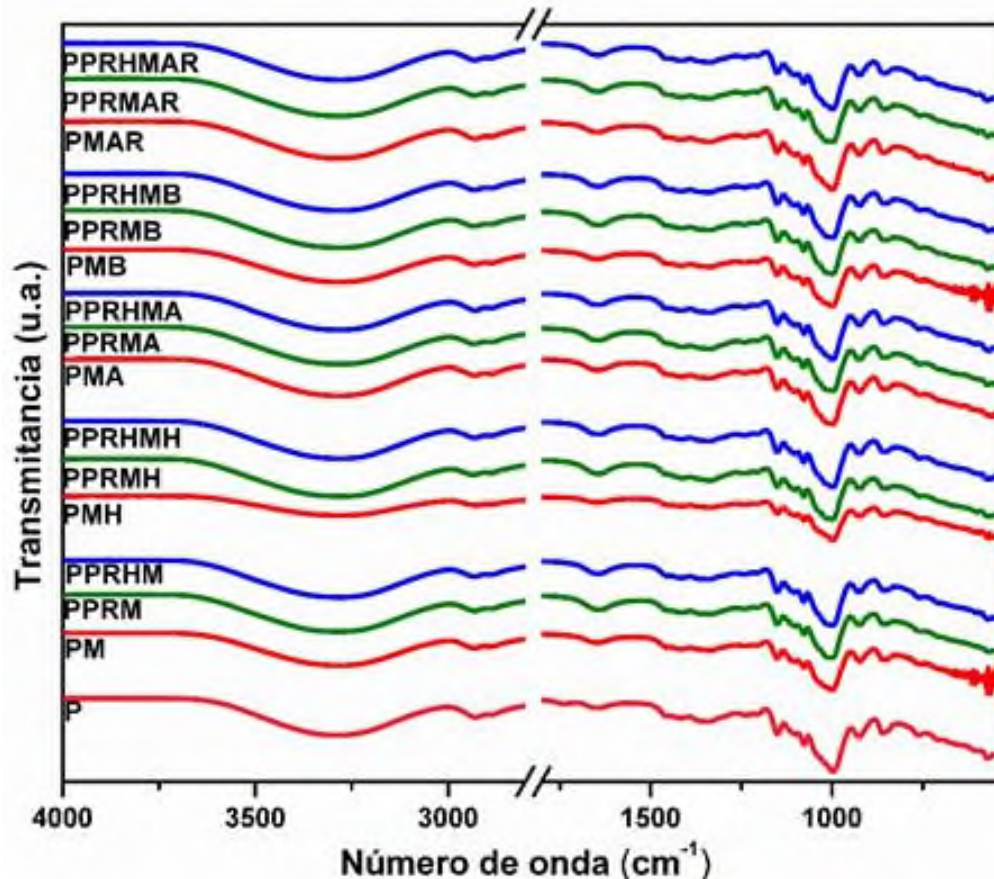


Figura 57. Espectros de FT-IR de las películas de almidón (P), con el extracto de *Moringa oleifera* (PM), las fracciones (MH, MA, MB, MAR), el producto de reacción (PPR) y el producto de reacción secado (PPRH).

7.22.3 Patrones de difracción de DRX para las películas de almidón con extracto de *Stevia* y con las fracciones y sus productos de reacción.

Los patrones de DRX de las películas de almidón con extracto y con los productos de reacción y los productos de reacción secos se muestran en la **Figura 58**. Comparados con la película de almidón (P), las películas hechas con S, SH, SA, SB, SAR solo muestran cambios muy pequeños en la intensidad de los picos, la película de almidón corresponde a los picos en $2\theta = 18^\circ$, $2\theta = 21^\circ$ y $2\theta = 24^\circ$. Por otra parte, Rivas-González et al. (2008) mencionan que las modificaciones químicas no afectan el patrón de difracción, pero si el porcentaje de cristalinidad del almidón, esto sin embargo también puede deberse a la concentración de las nanopartículas en la película de almidón.

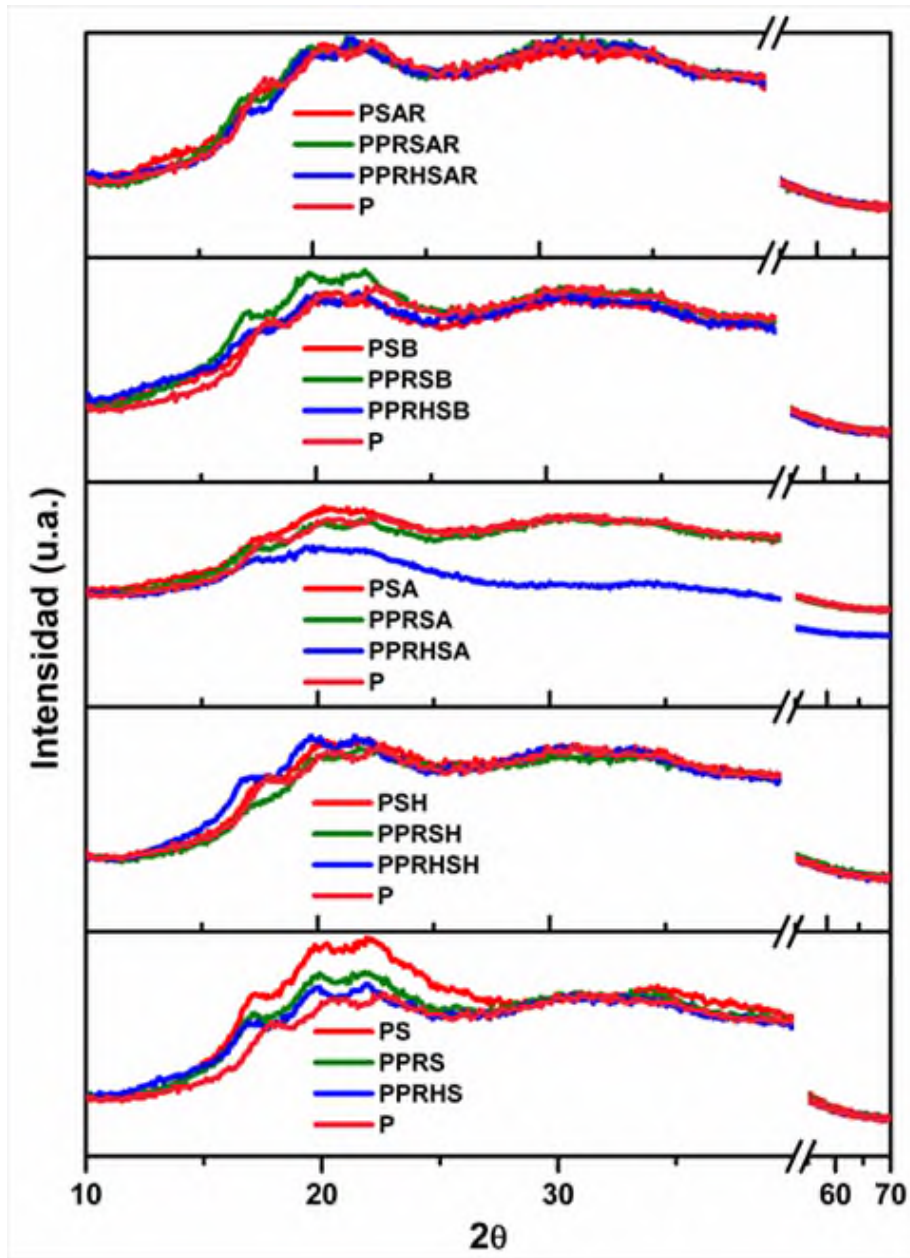


Figura 58. Patrones de DRX de las películas de almidón (P), con extracto de *Stevia* (PS), sus fracciones (PSH, PSA, PSB y PSAR) el producto de reacción (PPR) y el producto de reacción llevado al horno (PPRH)

7.22.4 Patrones de difracción de DRX de las películas del extracto de *Moringa*, fracciones y los productos de reacción

Patrones de difracción de DRX de las películas con extracto y sus fracciones de *Moringa*, reacciones, y productos de secado se presentan de abajo hacia arriba en

el difractograma de acuerdo al extracto (M) y las fracciones (MH, MA, MB, y MAR) con la que fueron elaboradas las respectivas reacciones, y productos de secado en la **Figura 59**.

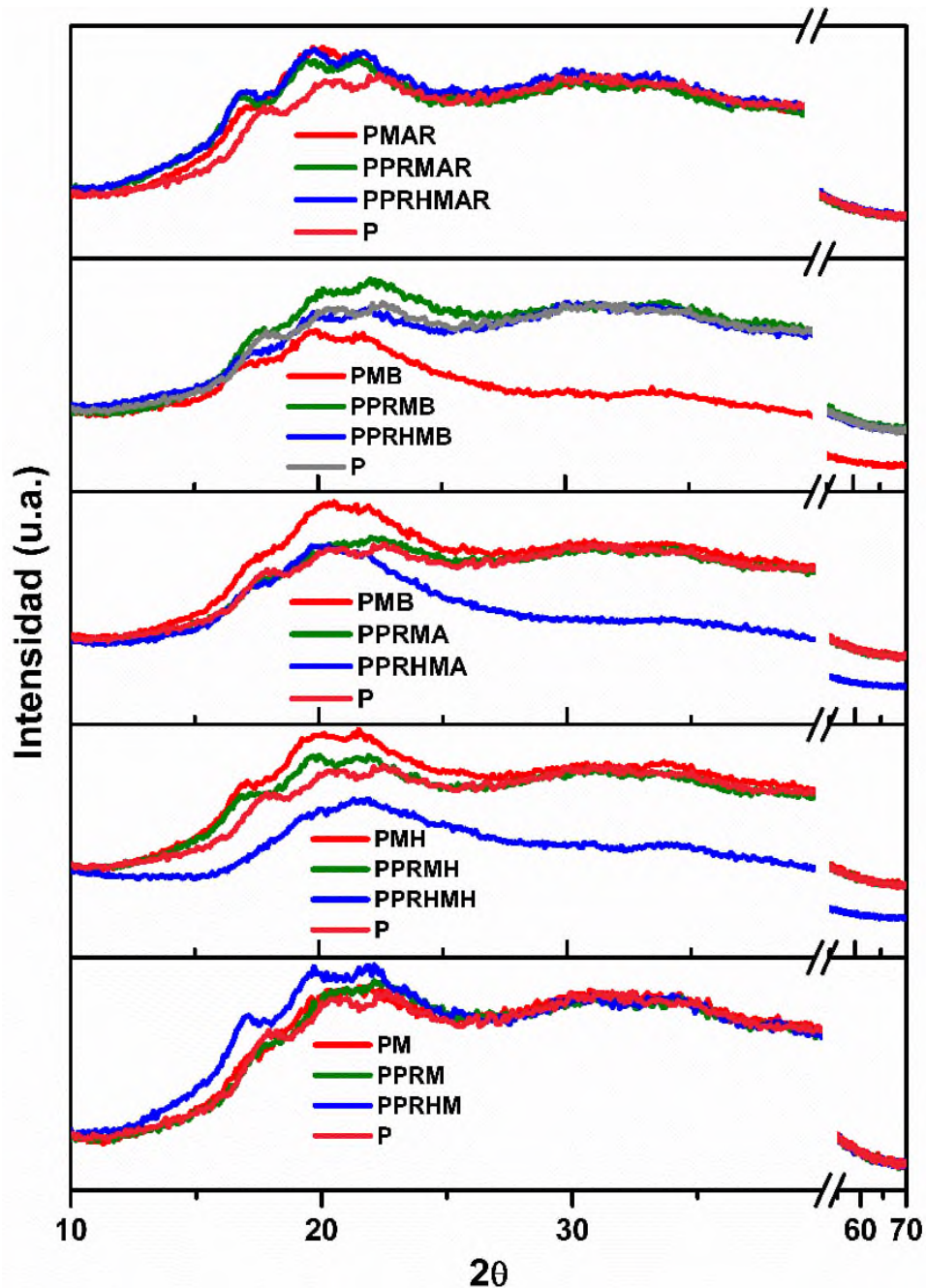


Figura 59. Patrones de DRX de las películas de almidón (P), con el extracto de *Moringa oleifera* (PM), las fracciones (MH, MA, MB, MAR), el producto de reacción (PPR) y el producto de reacción secado (PPRH)

De acuerdo a los difractogramas se observan cambios más evidentes que en las películas elaboradas con extracto de *Stevia* y sus fracciones. En las películas realizadas solo con M se observa un cambio en la intensidad de sus picos. En MH se observa un desplazamiento del pico más significativo. En MA ocurre un fenómeno similar al de los espectros de MH, esto permite suponer que los compuestos de MH y MA son similares. Esto es congruente con el espectro IR. En MB, las películas presentan un cambio evidente en cada uno de los espectros, esto lleva a suponer una interacción tanto del extracto como de las fracciones con las cadenas de almidón para llegar a transformarlas, se requiere de un análisis más detallado para proponer un mecanismo de interacción de los compuestos en la película. Los patrones en MAR muestran sólo un cambio en PPRMAR.

Aunque ocurren ligeros cambios en los patrones de difracción, en las películas no es posible establecer la presencia del ZnO. Esto puede deberse a la baja concentración de los productos de reacción en las películas.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados en este trabajo, es posible obtener NPsZnO con los dos extractos (*Stevia rebaudiana* y *Moringa oleífera*). El extracto de *Stevia rebaudiana* favoreció la obtención de óxido de zinc, desde una hora de reacción a temperatura de 60 °C y secado a 110 °C. Curiosamente, con el extracto de *Moringa oleífera* no se obtuvo óxido de zinc bajo estas condiciones de reacción. La temperatura ideal para la síntesis de NPs con extracto de *Moringa*, fue de 80 °C.

Se sintetizaron exitosamente con extracto de *Stevia* y *Moringa*, nanopartículas de óxido de zinc con un tamaño de partícula que varía de 65 nm a 120 nm. El tamaño de las nanopartículas resultantes, es un reflejo de la complejidad de su cinética de formación y depende de factores como la temperatura de reacción, temperatura de secado, las relaciones de concentraciones del precursor metálico, del agente reductor y/o estabilizador. Consecuentemente, el tamaño también viene determinado por la proporción relativa entre la velocidad de la nucleación y la velocidad de crecimiento de la partícula.

La fracción butanol del extracto de *Stevia* y la fracción acuosa residual del extracto de *Moringa* contienen metabolitos capaces de llevar a cabo la síntesis de ZnO. De acuerdo a los resultados se considera que metabolitos, preferentemente compuestos fenólicos favorecen la formación de las nanopartículas.

Los estudios por DRX evidenciaron la formación de los picos característicos del ZnO fase wurtzita para el extracto de *Stevia*, la fracción n-butanol del mismo, *Moringa* y la fracción acuosa residual del extracto de *Moringa*.

Las películas de almidón/NPs-ZnO no mostraron cambios evidentes en ninguna caracterización. Este comportamiento puede adjudicarse a la baja concentración de los productos de reacción agregados al almidón.

IX. ANEXO

En las tablas se describe la nomenclatura utilizada en el presente trabajo.

Códigos del extracto y fracciones.

Extracción fraccionada de *Stevia rebaudiana*

Etiqueta	Descripción
S	Extracto hidroalcohólico de <i>Stevia</i>
SH	Fase orgánica de la fracción de hexano
SA	Fase orgánica de la fracción de acetato de etilo
SB	Fase orgánica de la fracción de n-butanol
SAR	Fase acuosa residual

Códigos de los estándares utilizados.

Estándares

Etiqueta	Descripción
AG	Ácido gálico
REB	Rebaudiósido
ST	Esteviósido

Códigos de los productos de reacción bajo condiciones preliminares.

Reacciones preliminares de óxido de zinc con el extracto de *Stevia*

Condiciones de reacción: temperatura = 60 °C, velocidad de agitación = 400 rpm

Etiqueta	Variable: tiempo (min)
PRS1	60
PRS2	120
PRS3	180

Secado de las reacciones PRS. Condiciones de secado: temperatura = 110 °C, tiempo = 180 min

Etiqueta	Descripción
PRHS1	Secado de PRS1
PRHS2	Secado de PRS2
PRHS3	Secado de PRS3

Códigos de los productos de reacción con fracciones.

Reacciones de óxido de zinc con las fracciones del extracto de *Stevia*

Condiciones de reacción: temperatura = 60 °C, velocidad de agitación = 400 rpm, tiempo = 180 min

Etiqueta	Descripción
----------	-------------

PRS	Reacción con el extracto crudo de <i>Stevia</i>
PRSH	Reacción con la fracción orgánica de hexano
PRSA	Reacción con la fracción orgánica de acetato de etilo
PRSB	Reacción con la fracción orgánica de n-butanol
PR SAR	Reacción con la fracción acuosa residual

Secado de las reacciones PRS. Condiciones de secado: temperatura = 110 °C, tiempo = 180 min

Etiqueta	Descripción
PRHS1	Secado de PRS
PRHSH	Secado de PRSH
PRHSA	Secado de PRSA
PRHSB	Secado de PRSB
PRHSAR	Secado de PR SAR

Códigos de las películas de almidón con el extracto y fracciones.

Películas de almidón con las fracciones del extracto de *Stevia*

Etiqueta	Descripción
P	Película de almidón
PS	Película con extracto crudo de <i>Stevia</i>
PSH	Película con la fracción orgánica de hexano
PSA	Película con la fracción orgánica de acetato de etilo
PSB	Película con la fracción orgánica de n-butanol
PSAR	Película con la fracción acuosa residual

Códigos de las películas de almidón con los productos de reacción.

Películas de almidón con los productos de reacción de las fracciones del extracto de *Stevia*

Etiqueta	Descripción
PPRS	Película con producto de reacción de extracto crudo de <i>Stevia</i>
PPRSH	Película con producto de reacción de hexano
PPRSA	Película con producto de reacción de acetato de etilo
PPRSB	Película con producto de reacción de n-butanol
PPRSAR	Película con producto de reacción de acuosa residual

Códigos de las películas con los productos de reacción secados.

Películas de almidón con los productos de reacción secado de las fracciones del extracto de *Stevia*

Etiqueta	Descripción
PPRHS	Película con producto de reacción secado de extracto crudo de <i>Stevia</i>
PPR HSH	Película con producto de reacción secado de hexano

PPRHSA	Película con producto de reacción secado de acetato de etilo
PPRHSB	Película con producto de reacción secado de n-butanol
PPRHSAR	Película con producto de reacción secado de acuosa residual

Códigos de las películas con los estándares.

Películas de almidón con los productos de reacción de las fracciones del extracto de *Stevia*

Etiqueta	Descripción
PAG	Película con ácido gálico
PREB	Película con rebaudiósido
PST	Película con esteviósido

Códigos de las fracciones con extracto de *Moringa oleífera*.

Extracción fraccionada de *Moringa*

Etiqueta	Descripción
M	Extracto hidroalcohólico de <i>Moringa</i>
MH	Fase orgánica de la fracción de hexano
MA	Fase orgánica de la fracción de acetato de etilo
MB	Fase orgánica de la fracción de n-butanol
MAR	Fase acuosa residual

Códigos de los productos de reacción bajo condiciones preliminares.

Reacciones preliminares de óxido de zinc con el extracto de *Moringa*

Condiciones de reacción: temperatura = 60 °C, velocidad de agitación = 400 rpm

Etiqueta	Variable: tiempo (min)
PRM1	60
PRM2	120
PRM3	180

Secado de las reacciones PRM. Condiciones de secado: temperatura = 110 °C, tiempo = 180 min

Etiqueta	Descripción
PRHM1	Secado de PRM1
PRHM2	Secado de PRM2
PRHM3	Secado de PRM3

Códigos de los productos de reacción con las fracciones.

Reacciones de óxido de zinc con las fracciones del extracto de *Moringa*

Condiciones de reacción: T = 60 °C, velocidad de agitación = 400 rpm, tiempo = 180 min

Etiqueta	Descripción
PRM	Reacción con el extracto crudo de <i>Moringa</i>
PRMH	Reacción con la fracción orgánica de hexano
PRMA	Reacción con la fracción orgánica de acetato de etilo
PRMB	Reacción con la fracción orgánica de n-butanol
PRMAR	Reacción con la fracción acuosa residual

Secado de las reacciones. Condiciones de secado: T = 110 °C, tiempo = 180 min

Etiqueta	Descripción
PRHM1	Secado de PRM
PRHMH	Secado de PRMH
PRHMA	Secado de PRMA
PRHMB	Secado de PRMB
PRHSMAR	Secado de PRMAR

Códigos de las películas con el extracto y las fracciones.

Películas de almidón con las fracciones del extracto de *Moringa*

Etiqueta	Descripción
P	Película de almidón
PM	Película con extracto crudo de <i>Moringa</i>
PMH	Película con la fracción orgánica de hexano
PMA	Película con la fracción orgánica de acetato de etilo
PMB	Película con la fracción orgánica de n-butanol
PMAR	Película con la fracción acuosa residual

Códigos de las películas con los productos de reacción.

Películas de almidón con los productos de reacción de las fracciones del extracto de *Moringa*

Etiqueta	Descripción
PPRS	Película con producto de reacción de extracto crudo de <i>Moringa</i>
PPRSH	Película con producto de reacción de hexano
PPRSA	Película con producto de reacción de acetato de etilo
PPRSB	Película con producto de reacción de n-butanol
PPRSAR	Película con producto de reacción de acuosa residual

Códigos de las películas con los productos de reacción secos.

Películas de almidón con los productos de reacción secos de las fracciones del extracto de *Moringa*

Etiqueta	Descripción
PPRHM	Película con producto de reacción secado de extracto crudo de

Moringa

PPRHMH	Película con producto de reacción secado de hexano
PPRHMA	Película con producto de reacción secado de acetato de etilo
PPRHMB	Película con producto de reacción secado de n-butanol
PPRHMAR	Película con producto de reacción secado de acuosa residual

Nomenclatura utilizada en el trabajo

Nomenclatura utilizada en el trabajo

Etiqueta	Descripción
NPs	Nanopartículas
ZnO	Óxido de zinc
NPsZnO	Nanopartículas de óxido de zinc
DRX	Difracción de rayos X
FT-IR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
SEM	Microscopía electrónica de barrido
UV-Vis	Espectrometría ultravioleta-visible

X. REFERENCIAS

- Abdul, H., Sivaraj, R., Venckatesh, R. (2014). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth. Lamiaceae leafextract. *Materials Letters*, 131: 16-18.
- Ahmed, S., Chaudhry, S. A., Ikram, S. (2017). A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: A prospect towards green Chemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166: 272-284.
- Alvarado, R., Solera, F., Vega-Baudrit, J. (2014). Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15: 134-148.
- Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 36: 50-57.
- Anand, K., Gengan, R. M., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A. (2015). Agroforestry waste *Moringa oleifera* petals mediated green synthesis of gold nanoparticles and their anti-cancer and catalytic activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21: 1105-1111.
- Asensi, G. D., Villadiego, A. M. D., Berruezo, G. R. (2017). *Moringa oleifera*: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. *Archivos latinoamericanos de nutrición, Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 67: 86-96.
- Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R., Nandy, P. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, 5: 4993-5003.
- Bennet, R., Mellon, F., Foild, N., Pratt, J., Dupont, M., Perkins, L., Kroon, P. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose tree *Moringa oleifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3456-3453.
- Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, K. S., Santosh, P., Kavitha, H. U., Rao, Y., Satish, S. (2013). Plants: emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. *BioImpacts: BI*, 3: 111.
- Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to

- asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science and technology*, 40: 4374-4381.
- Bravo, M., Ale, N., Rivera, D., Huamán, J., Delmás, D., Rodríguez, M., Bautista, M. (2009). Caracterización química de la *Stevia rebaudiana*. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 12: 5-8.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N., Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian journal of plant science*, 78: 527-536.
- Caceres, A., S Lopez, S. (1991). Pharmacological properties of *Moringa oleifera*: Effect of seed extracts in the treatment of experimental pyoderma. *Fitoterapia*, 62: 449-450.
- Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness, *Pharmacology and therapeutics*, 121: 41-54.
- Chopra, C., Major, D., Pandya, M. (1983). Transparent conductors a status review. *Thin Solid Films*, 10: 1-46.
- Çolak, H., Karaköse, E. (2017). Green synthesis and characterization of nanostructured ZnO thin films using Citrus aurantifolia (lemon) peel extract by spin-coating method. *Journal of Alloys and Compounds*, 690: 658-662.
- Das, B. R., Kurup, P. A., Narasimha, P. R. (1957). Antibiotic principle from *Moringa pterygosperma*. VII. Antibacterial activity and chemical structure of compounds related to pterygospermin. *The Indian Journal of Medical Research*, 45: 191-196.
- Di Mauro, A., Cantarella M., Nicotra, G., Privitera, V. (2016). Low temperature atomic layer deposition of ZnO: applications in photocatalysis. *Appl. Catal*, 196: 68-76.
- Díaz-Ramírez, M., Boman, C., Sebastian, F., Royo, J., Xiong, S.J., Boström, D., (2012). Ashcharacterization and transformation behavior of the fixed-bed combustion of novel crops: poplar, brassica, and cassava fuels. *Energy Fuel*, 26: 3218L -3229.
- Dobrucka, R., Dugaszewska, J. (2016). Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 517-523.
- Elumalai, K., Velmurugan, S., Ravi, S., Kathiravan, V., Ashokkumar, S. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf

- extract and evaluation of its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 12: 289-292.
- Ezeamuzie, I. C., Ambakederemo, A. W., Shode, F. O., Ekwebelem, S. C. (1996). Antiinflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract. *International Journal of Pharmacognosy*, 34: 207-212.
- Ezhilarasi, A. A., Vijaya, J. J., Kaviyarasu, K., Maaza, M., Ayeshamariam, A., Kennedy, L. J. (2016). Green synthesis of NiO nanoparticles using *Moringa oleifera* extract and their biomedical applications: Cytotoxicity effect of nanoparticles against HT-29 cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164: 352-360.
- Faizi, S., Siddiqui, B. S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K., Gilani, A. U. H. (1994). Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *Journal of Natural Products*, 57: 1256-1261.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for life Journal*, 1: 1-15.
- Fujita, Y., Yanase, S., Nishikori, H., Hiragino, Y., Furubayashi, Y., Lin, J., Yoshida, T. (2014). Electroluminescence from nitrogen doped ZnO nanoparticles. *Phys. Status Solid*, 11: 1260-1262.
- Fortunato, E., Gonçalves, A., Pimentel, A., Barquinha, P., Gonçalves, G., Pereira, L., Martins, R. (2009). Zinc oxide, a multifunctional material: from material to device applications. *Applied Physics A*, 96,197-205.
- Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. G., Gómez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago, P., Yacaman, M. J. (2002). Formation and growth of Au nanoparticles inside live *alfalfa* plants. *Nano letters*, 2: 397-401.
- Gawel-Beben, K., Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska, K. (2015). *Stevia rebaudiana* Bert. Leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. *Molecules*, 20: 5468-5486.
- Guevara, J. R., Rovira, M. G. (2012). Caracterización de tres extractos de *Moringa oleifera* y evaluación de sus condiciones de infusión en sus características fisicoquímicas. Tesis de Maestría. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
- Goja, A., Osman, M. (2013). Preliminary study on efficacy of leaves, seeds and bark extracts of *Moringa oleifera* in reducing bacterial load in water. *International Journal of Advanced Research*, 1: 124-130.

- Gong, H., Hu, J., Wang, J., Ong, C., Zhu, F. (2006). Nano-crystalline Cu-doped ZnO thin film gas sensor for CO. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 115: 247-251
- Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27: 75-80.
- González, C., Tapia, M. S., Pérez, E., Dornier, M., Morel, G. (2014). Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. *Bioagro*, 26: 79-88.
- Goyal, S. K., Samsher, G. R., Goyal, R. K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr*, 61: 1-10.
- Grashoff, J. (1972). A systematic a study of the North Central and Souter American. *Specias of Stevia PhD dibbertartion. University of Texas. Austin.*
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30: 499-511.
- Haverkamp, R, Marshall A. (2008).The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *J. Nanoparticle Res*, 11: 1453-1463.
- Huang, J., Lin, L., Sun, D., Chen, H., Yang, D., Li, Q. (2015). Bio-inspired synthesis of metal nanomaterials and applications. *Chemical Society Reviews*, 44: 6330-6374.
- Huh, A. J., Kwon, Y. J. (2011). Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of controlled release*, 156: 128-145.
- Jiangfeng L., Benhai Y. (2011). Investigation of Photocatalytic Degradation of Methyl Orange by Using Nano-Sized ZnO Catalysts, *Adv. Chem. Eng. Sci*, 1: 9-14.
- Karnan, T., Selvakumar, S. A. S. (2016). Biosynthesis of ZnO nanoparticles using rambutan (*Nephelium lappaceum*L.) peel extract and their photocatalytic activity on methyl orange dye. *Journal of Molecular Structure*, 1125: 358-365.
- Khatami, M., Alijani, H. Q., Heli, H., Sharifi, I. (2018). Rectangular shaped zincoxide nanoparticles: Green synthesis by *Stevia* and its biomedical efficiency. *Ceramics International*, 44: 15596-15602.
- Katiyar, S. K., Mukhtar, H. (1997). Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67: 59-67.

- Kołodziejczak-Radzimska, A., Jesionowski, T. (2014). Zinc oxide from synthesis to application: a review, *Materials*, 7: 2833-2881.
- Kumar, K. M., Mandal, B. K., Tammina, S. K. (2013). Green synthesis of nano platinum using naturally occurring polyphenols. *RSC Advances*, 3: 4033-4039.
- Lakshmeesha, T. R., Sateesh, M. K., Prasad, B. D., Sharma, S. C., Kavyashree, D., Chandrasekhar, M., Nagabhushana, H. (2014). Reactivity of crystalline ZnO superstructures against fungi and bacterial pathogens: Synthesized using *Nerium oleander* leaf extract. *Crystal Growth and Design*, 14: 4068-4079.
- Li, J., Guo, D., Wang, X., Wang, H., Jiang, H., Chen, B. (2010). The photodynamic effect of different size ZnO nanoparticles on cancer cell proliferation in vitro. *Nanoscale research letters*, 5: 1063.
- Lipovsky, A., Tzitrinovich, Z., Friedmann, H., Applerot, G., Gedanken, A., Lubart, R. (2009). EPR study of visible light-induced ROS generation by nanoparticles of ZnO. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113: 15997-16001.
- Luengo, C. A.; Felfli, F.; Bezzon, G. Barbosa, C. Silva, L.E., Olivares, E. (2008). Biomassas para energía. *Campinas: Editora da UNICAMP*, 1: 333-351.
- Lutsenko, N. V., Mironyak, M. O., Labyak, O. V., Volnyanska, O. V., Tkach, V. I. Pelagia. (2016). Determination of the total content of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana*, 7: 9-19.
- Marín, W. (2004). Sondeo de Mercado de la Estevia. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá-Colombia*, 1: 66
- Martono, Y., Riyanto, S., Martono, S., Rohman, A. (2016). Determination of stevioside and rebaudioside A from Simulated *Stevia* Beverages Using FTIR Spectroscopy in combination with multivariate calibration. *Res. J. Med. Plants*, 10: 349-355.
- Matinise, N., Fuku, X. G., Kaviyarasu, K., Mayedwa, N., Maaza, M. (2017). ZnO nanoparticles via *Moringa oleifera* green synthesis: physical properties and mechanism of formation. *Applied Surface Science*, 406: 339-347.
- Menéndez, A. (2010). Una revolución en miniatura: Nanotecnología al servicio de la humanidad. *Servicio de Publicaciones de la Universitat de València*, 1:21-27

- Mishra, A. N., Bhadauria, S., Gaur, M. S., Pasricha, R., Kushwah, B. S. (2010). Synthesis of gold nanoparticles by leaves of zero-calorie sweetener herb (*Stevia rebaudiana*) and their nanoscopic characterization by spectroscopy and microscopy. *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*, 1: 118-124.
- Monge, M. (2014). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. In *Anales de Química*, 105: 33-41.
- Mora, I. B. (2013). *Síntesis y caracterización de nanomateriales 0D, 1D Y 2D*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Morales-Díaz, A. B., Juárez-Maldonado, A., Morelos-Moreno, Á., González-Morales, S., y Benavides-Mendoza, A. (2016). Biofabricación de nanopartículas de metales usando células vegetales o extractos de plantas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7: 1211-1224.
- Morton, J. F. (1991). The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) a boon to arid lands. *Economic botany*, 45: 318-333.
- Nava, O. J., Luque, P. A., Gómez-Gutiérrez, C. M., Vilchis-Nestor, A. R., Castro-Beltrán, A., Mota-González, M. L., Olivas, A. (2017). Influence of *Camellia sinensis* extract on Zinc Oxide nanoparticle green synthesis. *Journal of Molecular Structure*, 1134: 121-125.
- Nicolaev, A., Mitran, T., Iftimie, S., Nemnes, G., (2016). Optimization of halide perovskite solar cells based on nanocolumnar ZnO, *Sol. Energy Mat. Sol. Cells*, 158: 202-208.
- Norton, D. P., Pearton, S. J., Hebard, A. F., Theodoropoulou, N., Boatner, L. A., Wilson, R. G. (2003). Ferromagnetism in Mn-implanted ZnO: Sn single crystals. *Applied Physics Letters*, 82: 239-241.
- Nwosu MO, JI Okafor. (1995). Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. *Mycoses*, 38: 191-195.
- Ohashi, H., Hagiwara, M., Fujihara, S. (2017). Solvent-assisted microstructural evolution and enhanced performance of porous ZnO films for plastic dye-sensitized solar cells. *Journal of Power Sources*, 342: 148-156.
- Olsen, A. (1987). Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seed flocculation as performed in Sudanese villages: effects on *Schistosoma mansoni* cercariae. *Water research*, 21: 517-522.

- Padmavathy, N., Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials*, 9: 1-7.
- Park, C., Lee, J., So, H. M., Chang, W. S. (2015). An ultrafast response grating structural ZnO photodetector with back-to-back Schottky barriers produced by hydrothermal growth. *Journal of Materials Chemistry C*, 3: 2737-2743.
- Prior, R.L., Wu, X. Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- Prasad, T. N. V. K. V., Elumalai, E. K. (2011). Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1: 439-442.
- Rai, M., Yadav, A. (2013). Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. *IET nanobiotechnology*, 7: 117-124.
- Rajasekaran, T., Ramakrishna, A., Udaya Sankar, K., Giridhar, P., Ravishankar, G. A. (2008). Analysis of predominant steviosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Biotechnology*, 22: 179-188.
- Ramesh, M., Anbuvaran M., Viruthagiri G., (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136: 864-870.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. R., Knothe, G. (2008). *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Bioresource technology*, 99: 8175-8179.
- Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., Gonçalves, R. A. C. (2011). Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106: 329-335.
- Rodríguez, M., Sifontes, A. B., Méndez, F. J., Díaz, Y., Canizales, E., Brito, J. L. (2013). Template synthesis and characterization of mesoporous γ -Al₂O₃ hollow nanorods using *Stevia rebaudiana* leaf aqueous extract. *Ceramics International*, 39: 4499-4506.
- Salaheldeen, M., Aroua, M. K., Mariod, A. A., Cheng, S. F., & Abdelrahman, M. A. (2014). An evaluation of *Moringa peregrina* seeds as a source for bio-fuel. *Industrial Crops and Products*, 61: 49-61.

- Sadeghi, B., Mohammadzadeh, M., Babakhani, B. (2015). Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: characterization and their stability. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148:101-106.
- Salam, H., Sivaraj, R., Venckatesh, R. (2014). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth-Lamiaceae leaf extract, *Materials Letters*, 131: 16-18
- Salinas, J. P., Sánchez, E. M. (2012). La química verde en la síntesis de nanoestructuras. *Ingenierías*, 15: 7-16.
- Santhoshkumar, J., Venkat, S., Rajeshkumar, S., (2017). Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen, *Resource-Efficient Technologies*, 3: 459-465.
- Senthilkumar, S., Sivakumar, T. (2014). Green tea (*camellia sinensis*) mediated synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities. *Int J Pharm Sci*, 6: 461-465
- Sharma, D., Sabela, M. I., Kanchi, S., Mdluli, P. S., Singh, G., Stenström, T. A., Bisetty, K. (2016). Biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Jacaranda mimosifolia* flowers extract: Synergistic antibacterial activity and molecular simulated facet specific adsorption studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162: 199-207.
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., Bajpai, V. K. (2012). Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64: 807-811.
- Shohael, A. M., Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J., Islam, R., Paek, K. Y. (2006). Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochemistry*, 41: 1179-1185.
- Sifontes, A. B., González, G., Ochoa, J. L., Tovar, L. M., Zoltan, T., Canizales, E. (2011). Chitosan as template for the synthesis of ceria nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 46: 1794-1799.
- Soejarto, D.D., Kinghorn A.D., y Farnsworth.N.R. (1982). Potential sweetening agents of plant origin III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *J.Nat. Prod*, 45: 590-599.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275: 177-182.

- Sujitha, V., Murugan, K., Paulpandi, M., Panneerselvam, C., Suresh, U., Roni, M., Dinesh, D. (2015). Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. *Parasitology research*, 114: 3315-3325.
- Tang, X., Choo, S. G., Li, L., Ding, J., Xue, J. (2010). Synthesis of ZnO nanoparticles with tunable emission colors and their cell labeling applications. *Chemistry of Materials*, 22: 3383-3388.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., y Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57: 724–803.
- Varshney, R., Bhadauria, S., Gaur, M. S. (2010). Biogenic synthesis of silver nanocubes and nanorods using sundried *Stevia rebaudiana* leaves. *Adv. Mat. Lett*, 1: 232-237.
- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231: 581-588.
- Yilmaz, M., Turkdemir, H., Kilic, M. A., Bayram, E., Cicek, A., Mete, A., Ulug, B. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*. *Materials Chemistry and Physics*, 130: 1195-1202.
- Yuvakkumar, R., Hong, S. I. (2014). Green synthesis of spinel magnetite iron oxide nanoparticles. In *Advanced Materials Research. Trans Tech Publications*, 1051: 39-42.
- Zak, A. K., Razali, R., Majid, W. A., Darroudi, M. (2011). Synthesis and characterization of a narrow size distribution of zinc oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6: 1399.
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo Nano. *Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5: 70-81.
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., York, D. (2007). Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9: 479-489.