

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

División de Estudios de Posgrado

**Preparación de compuestos poliméricos a partir
de síntesis de nanopartículas de TiO_2 con
extracto de *Stevia rebaudiana***

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas**

PRESENTA

Edgar Beltrán Mendoza

Director: Dr. Mario Valera Zaragoza
Co-directora: Dra. Ariana A. Huerta Heredia.

San Juan Bautista Tuxtepec, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2019/MCQ/010
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 1 de febrero de 2019

C. EDGAR BELTRÁN MENDOZA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

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

Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	Presidente
Dr. Mario Valera Zaragoza	UNPA	Vocal
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dr. Aurelio Hernández Ramírez	UNPA	1er Suplente
Dr. Paúl Sánchez Ocampo	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

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



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

C.c.p. Dr. Mario Valera Zaragoza – Director de tesis
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

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

Vo. Bo.



**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/117
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 28 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 Ciencias Químicas del **C. Edgar Beltrán Mendoza**, matrícula **16130002**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Preparación de compuestos poliméricos a partir de síntesis de nanopartículas de TiO₂ con extracto de Stevia rebaudiana"** 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 ju



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

C c p C Edgar Beltrán Mendoza
C c p Archivo

*A mí compañera de vida e hijos,
padres y hermanos...*

RECONOCIMIENTO

A la Universidad del Papaloapan, por las facilidades brindadas en el uso de las instalaciones y equipos de los diferentes laboratorios de Ciencias Químicas.

Se agradece al CONACYT por la beca **615682** otorgada.

Al M. en C. Frank Manuel León Martínez, investigador miembro del Grupo de Materiales Basados en Cemento del CIIDIR-IPN-OAXACA, por compartir su experiencia y el apoyo incondicional en la caracterización de las muestras por SEM. Y al Dr. Prisciliano Felipe Jesús Cano Barrita por permitir el uso del microscopio electrónico de barrido del Laboratorio de Técnicas no Destructivas y de Análisis de Materiales perteneciente al CIIDIR-IPN-OAXACA.

Al Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Oaxaca (CECYTEO) por la beca otorgada y el permiso para ausentarme de mis labores para estudiar el posgrado.

Al comité del STSCECYTEO 2014-2017 y 2017-2020 por las gestiones ante las autoridades correspondientes para que la beca y el permiso me fueran autorizados, así como mi pronta reincorporación al sistema.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente a Linett, mi compañera de vida y a mis hijos Cristian y Edwin, por su apoyo incondicional desde el primer momento en esta aventura y porque han sido mi inspiración para seguir con mi crecimiento personal y profesional.

A mis padres, un agradecimiento especial, porque siempre cimentaron en mí, principios, valores y el deseo de superación, a mis hermanos, por estar siempre presentes y brindarme todo su apoyo en cualquier proyecto que emprendá.

A los doctores: Conde, por la confianza que depositó en mí desde los primeros días de mi estancia en la UNPA, Omar, por ser un excelente ser humano, por sus consejos, mismos que hicieron mi estancia más amena y por las facilidades que dio para utilizar el laboratorio y los equipos de química orgánica.

A los revisores de tesis, los doctores: Erick, Aurelio, Paul, Alejandro y Miguel, por sus excelentes observaciones durante el proceso del proyecto.

A la Dra. Ariana, por su asesoría, y por compartir su experiencia en el trabajo de laboratorio.

A Keyla, Michell, Teresa, Yunuen, Yureli, Karen, Brenda y Félix, compañeros y amigos de generación, por su apoyo y amistad incondicional.

A mis compañeros de trabajo: Panda, Hilcori, Villapant Amílcar, Nadia, Pícazo, Alíx, Delmi, Cesar, Porfirio, Alejandro, Daniel y a los que me faltaron por mencionar, por siempre darme palabras de aliento cuando la presión se apoderaba de mí.

Y, por último, también un agradecimiento muy especial al Dr. Mario, por su confianza, paciencia y, sobre todo, por compartir sus conocimientos y experiencias y fomentar en mí el deseo por la investigación, por esto y mucho más, Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Nanopartículas.....	2
2.1.1 Síntesis de nanopartículas	3
2.1.2 Síntesis verde de nanopartículas	4
2.2 Planta de <i>Stevia rebaudiana</i>	5
2.3 Dióxido de titanio	7
2.3.1 Fotocatálisis del TiO ₂	8
2.3.2 Efecto anticancerígeno del TiO ₂	10
2.4 Materiales compuestos	10
2.5 Etileno acetato de vinilo	11
2.6 Nanocompuestos poliméricos EVA/TiO ₂	12
III. ANTECEDENTES	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	16
V. HIPÓTESIS.....	17
VI. OBJETIVOS.....	18
6.1. Objetivo general.....	18
6.2. Objetivos específicos	18
VII. PARTE EXPERIMENTAL	19
7.1 Materiales	19

7.2 Metodología	19
7.3 Extracción de <i>Stevia rebaudiana</i>	20
7.3.1 Extracción líquido-líquido	20
7.3.2 Caracterización por cromatografía en capa fina.....	20
7.3.3 Cuantificación de fenoles totales.....	21
7.4 Síntesis de nanopartículas de TiO ₂ vía <i>Stevia rebaudiana</i>	22
7.5 Formación de películas de EVA con el producto de reacción (compuestos EVA/TiO ₂)	22
7.6 Espectroscopia ultravioleta visible	23
7.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.....	23
7.8 Difracción de rayos X.....	23
7.9 Análisis termogravimétrico.....	24
7.10 Microscopía electrónica de barrido	24
7.11 Ensayos de citotoxicidad	24
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
8.1 Extracción hidroalcohólica de las hojas de <i>S. rebaudiana</i>	25
8.1.1 Caracterización por espectroscopia UV-Vis del extracto crudo.....	25
8.1.2 Caracterización por FTIR del extracto crudo de <i>S. rebaudiana</i>	26
8.1.3 Caracterización por TGA del extracto crudo de <i>S. rebaudiana</i>	28
8.2 Extracción líquido-líquido.....	28
8.2.1 Rendimiento de la extracción	29
8.2.2 Identificación por TLC de los glucósidos de esteviol	30
8.2.3 Determinación de fenoles totales	31
8.2.4 Caracterización por UV-Vis de las fracciones	32
8.2.5 Caracterización por FTIR de las fracciones	33
8.2.6 Caracterización por TGA de las fracciones.....	35
8.3 Pruebas de síntesis de nanopartículas de TiO ₂ con el extracto crudo de <i>S. rebaudiana</i> y estudio de algunos parámetros.....	38

8.3.1 Efecto de la relación EtOH/H ₂ O	38
8.3.2 Efecto de la temperatura	40
8.3.3 Efecto del tiempo de reacción	41
8.4 Síntesis de nanopartículas con las fracciones	42
8.4.1 Caracterización por espectroscopia UV-Vis para los extractos de las fracciones y los productos de reacción.	44
8.4.2 Caracterización por FTIR de los productos de reacción.....	49
8.4.3 Caracterización por DRX de los productos de reacción	56
8.4.4 Caracterización por TGA de los productos de reacción	61
8.4.5. Microscopía electrónica de barrido de los productos de reacción	66
8.4.6. Ensayo de toxicidad con las fracciones y productos de reacción.....	68
8.5 Películas de EVA/TiO ₂	73
8.5.1 Caracterización por FTIR de las películas de EVA/TiO ₂	74
8.5.2 Caracterización por DRX de las películas de EVA/TiO ₂	75
8.5.3 Microscopía electrónica de barrido de las películas de EVA/TiO ₂	76
8.5.4 Ensayo de citotoxicidad con las películas de EVA/TiO ₂	78
X. CONCLUSIONES	79
XI. PERSPECTIVAS	80
XII.- REFERENCIAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala de longitud en el cual se observa el lugar que ocupan las nanopartículas ...	2
Figura 2. Incremento de área superficial relativa.....	3
Figura 3. Métodos físicos y químicos para la síntesis de nanopartículas.....	4
Figura 4. Partes de la planta de <i>Stevia rebaudiana</i> , donde A: plántula, B: plántula con sistema radicular, C: flores abiertas, D: etapas reproductivas, E: semillas y F: planta madura.....	6
Figura 5. Estructuras de los principales compuestos identificados en <i>S. rebaudiana</i>	6
Figura 6. Fases cristalinas del TiO ₂ : a) fase rutilo, b) fase anatasa y c) brookita.....	8
Figura 7. Mecanismo de la reacción fotoquímica del TiO ₂	9
Figura 8. Esquema de la fotocatalisis del TiO ₂	9
Figura 9. Esquema estructural del copolímero EVA.	12
Figura 10. Diagrama general de seguimiento para el desarrollo del proyecto.	19
Figura 11. Espectro UV-Vis del extracto crudo.....	25
Figura 12. Espectro de FTIR del extracto crudo.	26
Figura 13. Termograma del extracto crudo.	28
Figura 14. Secuencia para la extracción líquido-líquido.	29
Figura 15. Cromatografía en capa fina de las fracciones de <i>S. rebaudiana</i> revelado con orcinol al 0.5%.....	30
Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales.....	31
Figura 17. Espectros UV-Vis de las diferentes fracciones obtenidas de las extracciones líquido-líquido.	32
Figura 18. Espectros FTIR de las fracciones obtenidas con la extracción líquido-líquido	33
Figura 19. Termograma obtenido en el TGA de la fracción de CHCl ₃ (A0).	36
Figura 20. Termograma obtenido en el TGA de la fracción de AcOEt (B0).....	36
Figura 21. Termograma obtenido en el TGA de la fracción de <i>n</i> -BuOH (B0).	37
Figura 22. Termograma obtenido en el TGA de la fracción acuosa residual (C0).....	37
Figura 23. Productos de reacción a diferentes proporciones de EtOH/H ₂ O.....	39
Figura 24. Reacciones a diferentes temperaturas.	40
Figura 25. Productos de reacción a los tiempos de reacción indicados.....	41
Figura 26. Patrones de difracción de los productos a 3 y 6 h de reacción.	42
Figura 27. Síntesis de nanopartículas de TiO ₂ con las diferentes fracciones.....	43
Figura 28. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción de CHCl ₃	45
Figura 29. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción de AcOEt. ...	46
Figura 30. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción de <i>n</i> -BuOH. ...	47

Figura 31. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción acuosa residual.	48
Figura 32. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción del extracto crudo.....	49
Figura 33. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción CHCl ₃ (A0), producto de reacción con CHCl ₃ secado a 60 °C (A1-60), producto de reacción con CHCl ₃ secado a 110 °C (A1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO ₂ com).....	50
Figura 34. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción AcOEt (B0), producto de reacción con AcOEt secado a 60 °C (B1-60), producto de reacción con AcOEt secado a 110 °C (B1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO ₂ com).....	52
Figura 35. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción <i>n</i> -BuOH (C0), producto de reacción con <i>n</i> -BuOH secado a 60 °C (C1-60), producto de reacción con <i>n</i> -BuOH secado a 110 °C (C1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO ₂ com).	53
Figura 36. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción acuosa residual (D0), producto de reacción con acuosa residual secado a 60 °C (D1-60), producto de reacción con acuosa residual secado a 110 °C (D1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO ₂ com).	55
Figura 37. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), extracto crudo (E0), producto de reacción con extracto crudo secado a 60 °C (E1-60), producto de reacción de con extracto crudo secado a 110 °C (D1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO ₂ com).	56
Figura 38. DRX de los productos de reacción con CHCl ₃ , secados a 60 °C (A1-60) y secados a 110 °C (A1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas de TiO ₂ rutilo y anatasa.	57
Figura 39. DRX de los productos de reacción con la fracción de AcOEt, secados a 60 °C (B1-60) y secados a 110 °C (B1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas del TiO ₂ rutilo y anatasa.	58
Figura 40. DRX de los productos de reacción con <i>n</i> -BuOH, secados a 60 °C (B1-60) y secados a 110 °C (B1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas del TiO ₂ rutilo y anatasa.	59
Figura 41. DRX de los productos de reacción con acuosa residual, secados a 60 °C (B1-60) y secados a 110 °C (B1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas rutilo y anatasa del TiO ₂	60
Figura 42. DRX de los productos de reacción con CHCl ₃ , secados a 60 °C (A1-60) y secados a 110 °C (A1-110).....	61
Figura 43. Termograma del producto de reacción de la fracción de CHCl ₃	62
Figura 44. Termograma del producto de reacción de la fracción de AcOEt.	63

Figura 45. Termograma del producto de reacción de la fracción de <i>n</i> -BuOH	64
Figura 46. Termograma del producto de reacción de la fracción de acuosa residual.	65
Figura 47. Termograma del producto de reacción del extracto crudo.....	65
Figura 48. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con la fracción de CHCl ₃ (A1-110)	66
Figura 49. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con la fracción de AcOEt (B1-110)	67
Figura 50. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con la fracción acuosa residual (D1-110).....	67
Figura 51. Ensayo de MTT de las fracciones de CHCl ₃ (A0), AcOEt (B0), <i>n</i> -BuOH (C0) y acuosa residual (D0), sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7	68
Figura 52. Ensayo de MTT de los productos de reacción secados a 110 °C de las fracciones CHCl ₃ (A1-110), AcOEt (B1-110), <i>n</i> -BuOH (B1-110) y acuosa residual (D1-110).....	69
Figura 53. Ensayo de MTT con la fracción CHCl ₃ (A0) y con el producto de reacción de CHCl ₃ secado a 110 °C (A1-110).....	70
Figura 54. Ensayo de MTT con la fracción de AcOEt (B0) y del producto de reacción con AcOEt secado a 110 °C (B1-110).	71
Figura 55. Ensayo de MTT con la fracción de <i>n</i> -BuOH (B0) y con el producto de reacción de <i>n</i> -BuOH secado a 110 °C (C1-110).....	72
Figura 56. Ensayo de MTT con la fracción acuosa residual (D0) y con el producto de reacción secado a 110 °C (D1-110).	72
Figura 57. Películas de EVA (BCO/EVA) y de EVA con las fracciones de CHCl ₃ (A1-110EVA), AcOEt (B1-110EVA), <i>n</i> -BuOH (C1-110EVA), acuosa residual (D1-110EVA), con el extracto crudo (E1-110EVA) y con TiO ₂ comercial (EVA/TiO ₂ com).....	73
Figura 58. Espectro de FTIR de las películas EVA/productos de reacción.	74
Figura 59. Difractogramas de las películas EVA/productos de reacción.....	75
Figura 60. Imagen por SEM de la película con la fracción de CHCl ₃ , A1-110EVA.....	76
Figura 61. Imagen por SEM de la película con la fracción de AcOEt, B1-110EVA.	77
Figura 62. Imagen por SEM de la película con la fracción acuosa residual, C1-110EVA.	77
Figura 63. Ensayo de MTT en las películas de EVA/TiO ₂ ,.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas de las fases cristalinas del TiO_2	8
Tabla 2. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en los extractos.....	27
Tabla 3. Rendimiento de las fracciones	29
Tabla 4. Resultados de la cuantificación de fenoles totales	32
Tabla 5. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en las fracciones y extractos.....	34
Tabla 6. Relación EtOH/ H_2O de las diferentes reacciones	38
Tabla 7. Reacciones a diferentes temperaturas.....	40
Tabla 8. Nomenclatura de la síntesis de nanopartículas con las fracciones.	43
Tabla 9. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en la fracción de CHCl_3	51
Tabla 10. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en la fracción de AcOEt.....	52
Tabla 11. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en la fracción de <i>n</i> -BuOH.	54
Tabla 12. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales del copolímero EVA.....	75

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
Ban.gab	Banda prohibida
COV's	Compuestos orgánicos volátiles
DRX	X-ray diffraction
EAG	Equivalente de ácido gálico
eV	Electrovolts
EVA	Ethylene-vinyl acetate
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GE	Glucósido de esteviol
LDPE	Low density polyethylene
MeOH	Metanol
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
PBS	Phosphates buffered saline
R _f	Factor de retención
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Scanning electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
TLC	Thin layer chromatography
UV-vis	Ultravioleta visible
VA	Vinyl acetate

RESUMEN

El dióxido de titanio (TiO_2) es un semiconductor con excelentes propiedades fotocatalíticas. A escala nanométrica incrementa su área superficial mejorando así sus propiedades. En el presente trabajo, se realizó un estudio sobre la síntesis de nanopartículas de TiO_2 con el extracto hidroalcohólico de *Stevia rebaudiana* y con cada una de las fracciones obtenidas con disolventes de polaridad ascendente, utilizando como precursor el tetrabutóxido de titanio $[\text{Ti}(\text{OBu})_4]$.

Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas por, FTIR, DRX y SEM. En los resultados preliminares se observó un cambio de color entre el extracto líquido y los productos de reacción. Los patrones de difracción mostraron las fases cristalinas anatasa y rutilo para el TiO_2 en función de las fracciones obtenidas. Las micrografías mostraron nanopartículas de formas irregulares con tamaños menores a 100 nm, dichas nanopartículas se dispersaron en el copolímero EVA.

ABSTRACT

Titanium dioxide (TiO₂) is a semiconductor with excellent photocatalytic properties. In a nanometer scale increases its superficial area, improving its properties. In this work we did studies about synthesis of TiO₂ nanoparticles with the hydroalcoholic of *Stevia rebaudiana* extract and the fractions obtained with solvents of ascendant polarity using the tetrabutoxide titanium [Ti(OBu)₄] as a precursor.

The nanoparticles obtained were characterized for FTIR, DRX and SEM. In the preliminary results we could observe coloration change between the liquid extract and the reaction product. The diffraction patterns obtained presented the anatase and rutile crystalline phases for the TiO₂ in the reaction product that we obtained. The micrographics showed nanoparticles with irregular forms with an average size less to 100 nm, said nanoparticles were dispersed in the EVA copolymer.

I. INTRODUCCIÓN

Desde siempre, se han estudiado y desarrollado nuevos materiales que cubran las necesidades que la humanidad demanda. Dentro de los nuevos materiales que se han estudiado continuamente, se encuentran los materiales compuestos, los cuales son contruidos a partir de la unión de dos o más componentes, y dan lugar a uno nuevo con propiedades y características superiores a las que tienen los materiales constituyentes por separado. Los materiales compuestos están formados por dos fases, una continua, constituida por una matriz, y otra fase discontinua, denominada fase dispersa o refuerzo. Cuando una de las dimensiones de la fase dispersa se encuentra en escala nanométrica, específicamente entre 1 y 100 nm, el material compuesto se denomina nanocompuesto. En muchos casos, la matriz es un polímero y la fase dispersa pueden ser partículas o nanopartículas de diferente composición. El copolímero etileno-acetato de vinilo (EVA) ha sido probado como matriz en la formación de nanocompuestos. En trabajos previos, se han descrito al dióxido de titanio (TiO_2) dispersado en EVA para formar el nanocompuesto EVA/ TiO_2 , buscando que el producto adquiriera aplicaciones novedosas, considerando la actividad del TiO_2 como fotocatalizador (fotodegradante de compuestos orgánicos volátiles, no volátiles y bacterias) y las propiedades mecánicas y térmicas del EVA.

Considerando que el TiO_2 comercial utilizado para la formación de nanocompuestos es sintetizado por medios químicos, donde se utilizan disolventes y/o reactivos que pueden ser contaminantes para el medio ambiente, en el presente trabajo se utilizó una novedosa técnica para obtener nanopartículas de TiO_2 , la cual consiste en el uso de un extracto de la planta *Stevia rebaudiana*, donde algunos de sus metabolitos son capaces de reducir a un precursor de titanio para obtener nanopartículas de TiO_2 . Este método de síntesis se considera amigable con el medio ambiente.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Nanopartículas

Uno de los principales desarrollos en nanotecnología y nanociencia es la producción y aplicación de nanopartículas [1], para que un material esté dentro del rango de nanopartícula es necesario que sus dimensiones estén entre 1 y 100 nm (Figura 1) y se comporte como una unidad en términos de transporte [2,3]. Existen nanopartículas de diferente naturaleza, cada una con propiedades específicas, dentro de las cuales podemos destacar a las nanopartículas de Ag, Au, ZnO, Cu₂O, ZrO₂, TiO₂, entre otras [3]. Las nanopartículas de TiO₂ tienen propiedades fotocatalizadoras, que hacen posible su uso en varios campos de la ciencia y tecnología, incluyendo la microbiología, nanobiotecnología y medicina [4].

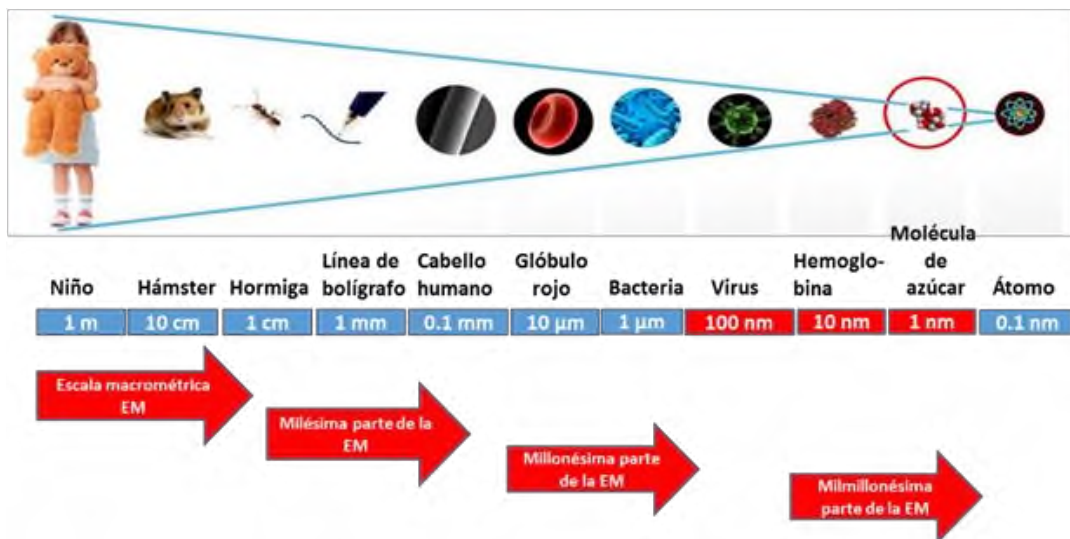


Figura 1. Escala de longitud en el cual se observa el lugar que ocupan las nanopartículas

El interés por sintetizar nanopartículas se debe a los beneficios que podrían proporcionar a diferentes áreas como la electrónica, la medicina, la biología, medio ambiente, en la industria cosmética, entre otras, la razón es que a escala nano, mejoran sus propiedades comparadas con las de tamaño macro, debido a su incremento en el área superficial relativa, provocando que la relación

superficie/volumen sea mayor (Figura 2), y mejorando así propiedades como la dureza, elasticidad, conductividad térmica, magnética, eléctrica y en algunos casos mejoran su capacidad como agentes antimicrobianos [2,5].

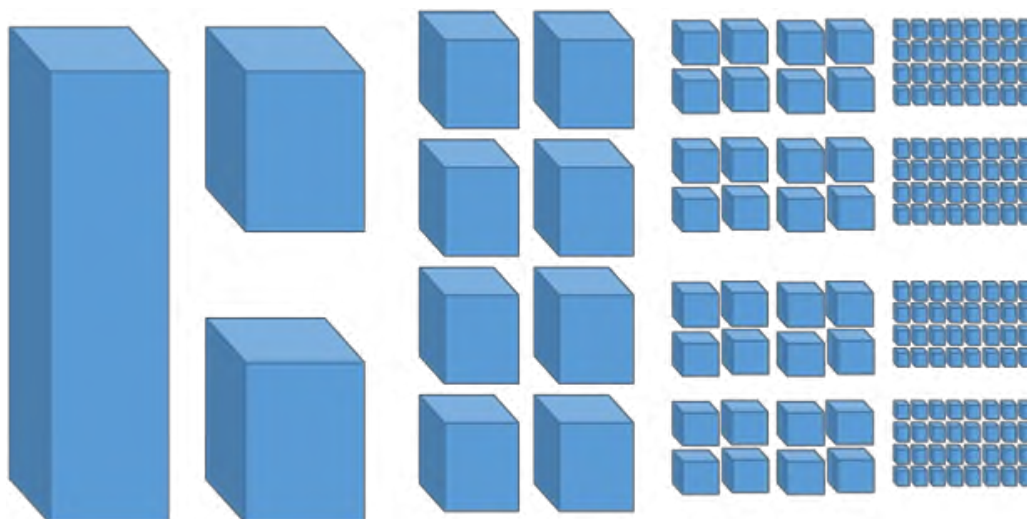


Figura 2. Incremento de área superficial relativa.

2.1.1 Síntesis de nanopartículas

Existen diferentes métodos que tienen como objetivo final producir nanopartículas, estos métodos de síntesis suelen agruparse en dos categorías [6]: la primera, llamada top-down, consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas, por ejemplo, la evaporación térmica, el depósito químico en fase vapor, la preparación de clúster gaseosos, la implantación de iones y la molienda. La segunda categoría, llamada botton-up, que consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en fase gaseosa o en solución (Figura 3) [7,8], los métodos más representativos son: el método coloidal [9], la reducción fotoquímica y radioquímica [10], la irradiación con microondas [11,12], la utilización de dendrímeros [12], la síntesis solvotermal [13] y el método sol-gel [10]. Todos los métodos de la primera categoría, a excepción de la molienda, requieren instrumentación compleja y complicada, por lo que el uso de estas herramientas en dichas síntesis genera altos costos, por lo tanto, muchas veces se prefieren los

métodos que utilizan la segunda categoría, los más empleados en este grupo son aquellos que utilizan procedimientos químicos.

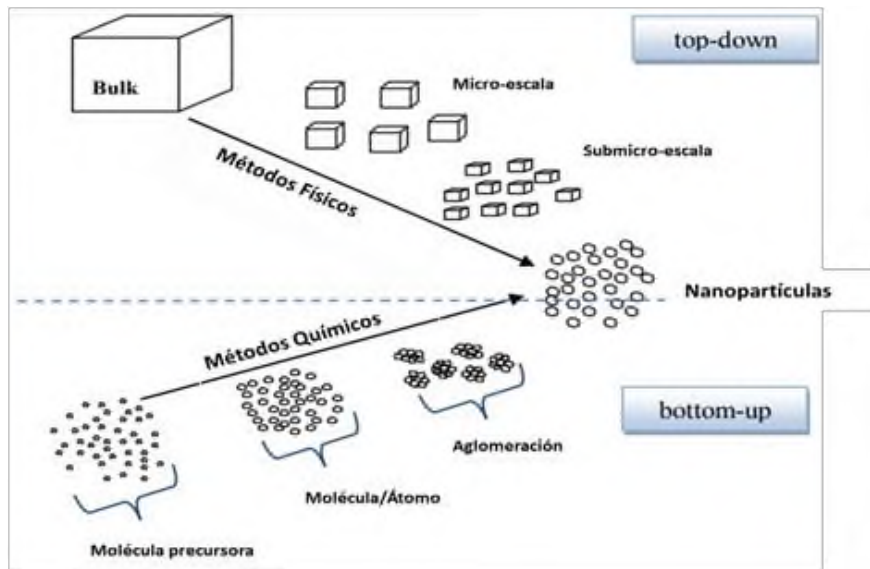


Figura 3. Métodos físicos y químicos para la síntesis de nanopartículas [8].

Tal como se mencionó en el párrafo anterior, algunos de los métodos utilizan equipos especializados que elevan el costo de producción de la síntesis, otros utilizan compuestos químicos que hacen al proceso no amigable con el medio ambiente, es por ello que se han examinado rutas ecológicas utilizando derivados de productos naturales.

2.1.2 Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis verde es una técnica no convencional usada actualmente para obtener nanopartículas en el que según Perrine *et al.* [14,15], se debe de cumplir con tres principios básicos, los cuales son: elección de un disolvente no contaminante, agentes reductores no tóxicos y estabilizadores amigables con el medio ambiente. El agua, es el disolvente más usado, y se utilizan reactivos naturales como vitaminas, azúcares, extractos de plantas, polímeros biodegradables y microorganismos como reductores de sales metálicas [16]. En general, los componentes biológicos proporcionan un

método ecológico para producir materiales de valor incalculable, debido a que las rutas basadas en el biomaterial eliminan la necesidad de usar productos químicos tóxicos [17,18].

Se ha reportado varios estudios sobre el uso de extractos de diferentes plantas para realizar la síntesis de nanopartículas. Por ejemplo, para obtener nanopartículas de cobre y óxido de zinc se han utilizado extractos de la fruta de limón (*Citrus sp.*) [19,20], para la obtención de nanopartículas de TiO₂ se han utilizado extractos de *Annona squamosa* [21], *Psidium guajava* [22] y *Morinda citrifolia* [23], para obtener nanopartículas de oro se han utilizado extractos de *Aloe vera* [24] y *Stevia rebaudiana* [25] y para obtener nanopartículas de plata se han probado con *Moringa oleífera* [26] y *Stevia rebaudiana* [27] por mencionar algunos.

2.2 Planta de *Stevia rebaudiana*

La planta *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Asteraceae, crece como arbusto salvaje y alcanza hasta los 65 cm de altura, sus hojas son lanceoladas y oval-lanceoladas, sus flores son pequeños (7-15 mm) y de color blanco, la semilla es un aquenio con vilano de aproximadamente 3 mm (Figura 4). Es muy abundante en el suroeste de Brasil y Paraguay, donde es conocida con el nombre de ka'a he'ê (en guaraní, hierba dulce) [28]. Es valorada en el mundo debido a su composición rica en un glucósido bajo en calorías llamado esteviósido, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino es 300 veces mayor que el azúcar de caña. La *S. rebaudiana* reduce los niveles de glucosa en la sangre hasta en un 35% [29].

Los compuestos responsables del dulzor de la *S. rebaudiana* son los glucósidos de esteviol aislados e identificados como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido y dulcósido (Figura 5). Éstos se encuentran en las hojas de la planta en porcentajes variables en función de la especie, las condiciones de crecimiento y las técnicas agronómicas, llegando a alcanzar hasta el 15% de su composición [30].



Figura 4. Partes de la planta de *Stevia rebaudiana*, donde **A:** plántula, **B:** plántula con sistema radicular, **C:** flores abiertas, **D:** etapas reproductivas, **E:** semillas y **F:** planta madura.

Según estudios, un 70% de la producción mundial de *S. rebaudiana* es destinada para procesar cristales de esteviósidos, el otro 30% se destina a herbarios. Esta planta puede prepararse como una infusión y beberla, o puede ser procesada y obtener su extracto con el fin de endulzar otras bebidas o alimentos [31].

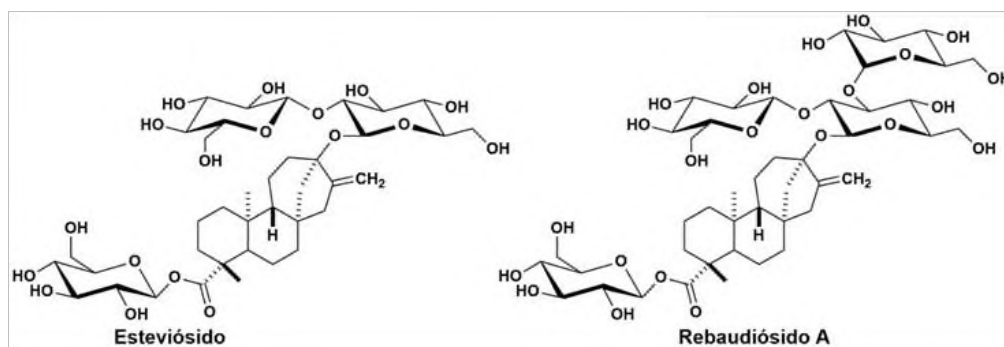


Figura 5. Estructuras de los principales compuestos identificados en *S. rebaudiana*.

Por su contenido en compuestos fenólicos, la *S. rebaudiana* actúa también como un excelente antioxidante y anticancerígeno, así mismo se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas [29]. Considerando las propiedades mencionadas sobre esta planta, se presume que sus metabolitos

funcionan también como una alternativa de agente reductor y estabilizador en la síntesis de nanopartículas.

2.3 Dióxido de titanio

El dióxido de titanio (TiO_2) es uno de los semiconductores más investigados dentro de los procesos de oxidación avanzada, posee propiedades fotoconductoras y fotocatalíticas que lo presentan como uno de los óxidos de mayor impacto en la degradación de azo-colorantes, oxidación de compuestos orgánicos volátiles (COV's) y degradación de compuestos orgánicos clorados, entre otros [32-34]. Su band-gap (banda prohibida) es relativamente grande, ya que para excitar un electrón se requiere 3.2 eV (380 nm) y para ello, se utiliza luz ultravioleta [35].

El TiO_2 presenta tres tipos de estructuras cristalinas, rutilo (tetragonal), anatasa (tetragonal) y brookita (ortorrómbica) (Figura 6). La estructura cristalina rutilo es estable, mientras que la anatasa y la brookita son metaestables, ya que se transforman a rutilo con tratamiento térmico [36]. Dependiendo de la estructura cristalina, el TiO_2 adopta características físicas diferentes (Tabla 1) [35]. De las tres fases, la brookita no es foto-activa, siendo el rutilo y la anatasa los dos únicos con aplicaciones tecnológicas, sin embargo, la anatasa es más foto-activa, esto se debe a que tiene 0.2 eV más en su band-gap (Tabla 1), y porque genera mayor especies hidroxilos en superficie [37,38].

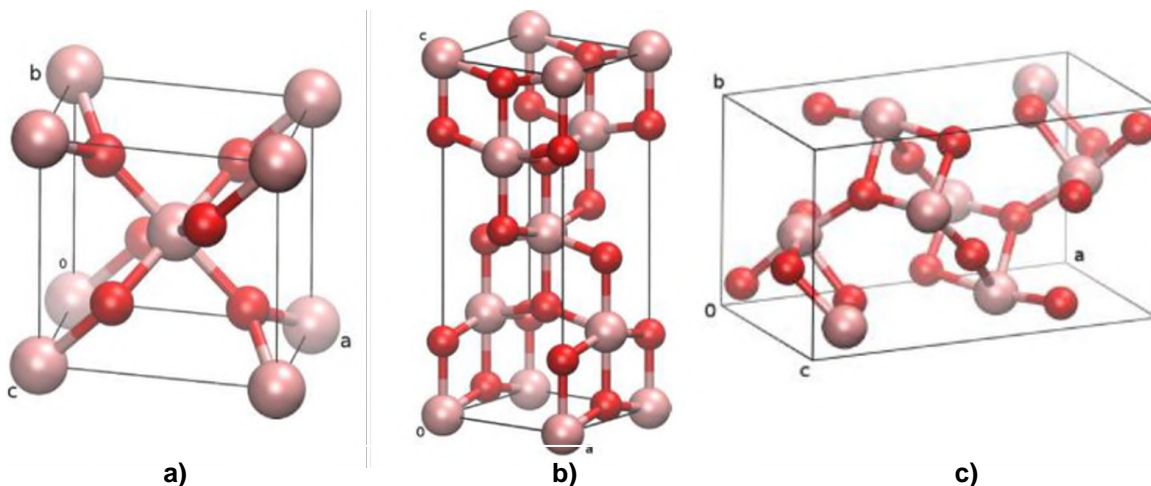


Figura 6. Fases cristalinas del TiO_2 : **a)** fase rutilo, **b)** fase anatasa y **c)** brookita [39].

Tabla 1. Propiedades físicas de las fases cristalinas del TiO_2 [35]

Propiedades físicas	Anatasa	Rutilo	Brookita
Estructura cristalina	Tetragonal	Tetragonal	Ortorrónica
Parámetro de red (Å)	a = 3.79 c = 9.51	a = 4.59 c = 2.96	a = 0 9.17 b = 5.46 c = 5.14
Densidad (gcm^{-3})	3.79	4.13	3.99
Dureza Mohr	5.5 – 6.0	6.0 – 6.5	5.5 – 6.0
Bang-gap (eV)	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Absorción de luz	<380	<415	-

2.3.1 Fotocatálisis del TiO_2

La fotocatálisis es la propiedad de ciertos materiales de promover reacciones químicas en presencia de luz ultravioleta, que de otro modo serían imposibles o muy lentas [40]. El efecto fotocatalítico del TiO_2 se puso en evidencia desde 1972 cuando Honda y Fujishima descubrieron que, expuesto al sol, el dióxido de titanio podía producir la disociación fotocatalítica del agua [41].

En la Figura 7 se describe el mecanismo de la reacción fotoquímica del TiO_2 cuando es activado por luz ultravioleta (UV), con una longitud de onda igual o menor a 380 nm. En una primera etapa, se genera el par electrón/hueco (paso 1). El electrón

reacciona con la especie aceptora, en este caso con el oxígeno, generando el radical superóxido (paso 2). Algunos radicales pueden ceder el electrón al hueco del TiO_2 y por lo tanto el oxígeno se regenera (paso 3), otros radicales reaccionan con agua y TiO_2 en estado excitado produciendo especies hidroxilo y radicales peróxidos (paso 4). El encuentro de dos radicales hidroxilos genera la formación del peróxido y oxígeno en un proceso reversible (pasos 5 y 6). El agua genera mayor cantidad de hidroxilos que se mantienen en la superficie del catalizador y/o se desprenden en fase gaseosa atacando a las moléculas orgánicas susceptibles (pasos 7 y 8) [42,43]. En la Figura 8 se muestra un esquema de la fotocatalisis previamente explicada.

1. $\text{TiO}_2 + h\nu \rightarrow \text{TiO}_2^* (e^- + h^+)$
2. $\text{TiO}_2^*(e^-) + \text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{O}_2^-$
3. $\text{TiO}_2^*(h^+) + \bullet\text{O}_2^- \rightarrow {}^1\text{O}_2$
4. $\bullet\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_{(g)} + \text{TiO}_2^*(h^+) \rightarrow \text{HO}\bullet_{(g)} + \text{HO}_2\bullet$
5. $2 \text{HO}_2\bullet_{(g)} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
6. $\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \text{HO}\bullet$
7. $\text{TiO}_2^*(h^+) + \text{H}_2\text{O}_{(\text{adsorbido})} \rightarrow \text{HO}\bullet_{(\text{adsorbido})} + \text{H}^+$
8. $\text{HO}\bullet_{(\text{adsorbido})} \rightarrow \text{HO}\bullet_{(g)}$

Figura 7. Mecanismo de la reacción fotoquímica del TiO_2 [38,42]

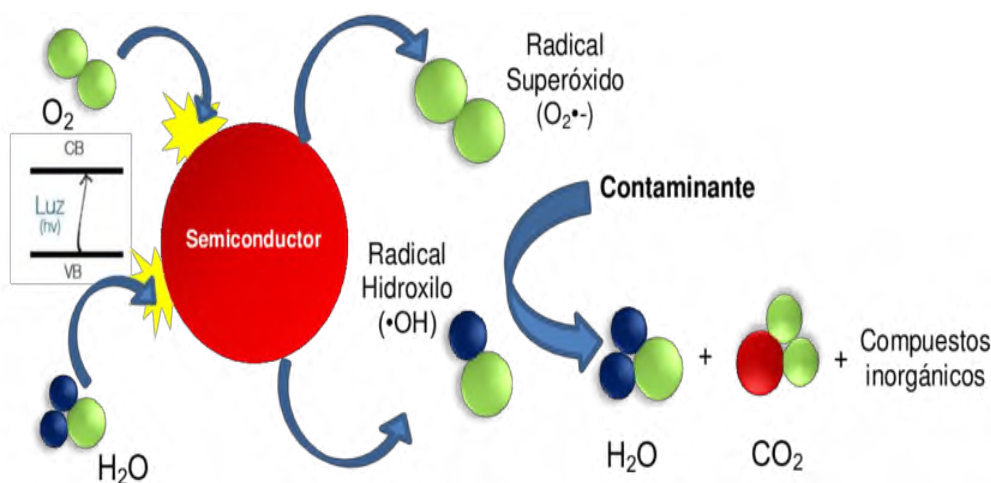


Figura 8. Esquema de la fotocatalisis del TiO_2 [44,45].

Actualmente, el dióxido de titanio, por ser económico, no tóxico, biocompatible y excelente fotocatalizador [46,47], se utiliza activamente en el campo de la fotodegradación de compuestos orgánicos, específicamente en la descontaminación ambiental del aire y del agua. Cuando el TiO_2 es irradiado con luz UV, éste presenta una fuerte acción bactericida. Generalmente, las desinfecciones con TiO_2 son tres veces más fuerte que el cloro y 1.5 veces más fuerte que el ozono [38]. Además, el TiO_2 tiene muchas otras aplicaciones, incluyendo su uso en la fotovoltaica, en la generación de hidrógeno y como pigmento común en pinturas [42,43]. Por otra parte, otros estudios fundamentan el uso del TiO_2 en la degradación de células cancerígenas [48].

2.3.2 Efecto anticancerígeno del TiO_2

En la fotocatalisis del TiO_2 se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno, superóxido e hidroxilo, estas especies son altamente reactivas con las membranas celulares y el interior de la célula, afectando la rigidez celular y las estructuras de la superficie, lo que lleva a la toxicidad celular. A pesar de los resultados prometedores, estos tratamientos son complicados de realizarse por las siguientes razones; primero, la luz UV no puede penetrar profundamente en los tejidos humanos, limitando así esta técnica a los tumores superficiales. En segundo lugar, la producción de ROS mediada por UV tiene una vida útil muy corta, por lo tanto, no podría proporcionar un efecto continuo y prolongado sobre las células cancerígenas [48-50].

2.4 Materiales compuestos

Se define como material compuesto todo sistema o combinación de materiales construido a partir de la unión de dos o más componentes, que da lugar a uno nuevo con propiedades características superiores a las que tienen los materiales constituyentes por separado. Los materiales compuestos están formados por dos fases; una continua, constituida por la matriz y otra fase discontinua, denominada

refuerzo. La fase dispersa puede reforzar a la matriz proporcionando incrementos en las propiedades finales del material compuesto. Los componentes de un material compuesto no deben disolverse ni fusionarse completamente unos con otros. La identificación de los materiales y de su interfase puede ser distinguible por métodos físicos [51].

Los materiales compuestos o compositos se clasifican de acuerdo a la matriz en donde se encuentren, por ejemplo, materiales compuestos con matriz metálica (aleaciones de aluminio, titanio y magnesio), de matriz cerámica (alúmina, carburo de silicio) y de matriz polimérica. Los compuestos también se clasifican de acuerdo al tamaño del refuerzo, y son compositos convencionales o microcompositos y en nanocompositos. Los compositos convencionales o microcompositos tienen refuerzos del orden de micras, son altamente producidos debido a los favorables incrementos en propiedades mecánicas del compuesto, sin embargo, el contenido del reforzante en la matriz está por encima del 25% en peso. En los nanocompositos, el tamaño del refuerzo es del orden de nanómetros, en este caso, las interacciones matriz-refuerzo se dan a nivel molecular [51,52].

2.5 Etileno acetato de vinilo

El etileno acetato de vinilo (EVA, por sus siglas en inglés) es un copolímero que se acerca a los elastómeros en cuanto a su suavidad y flexibilidad, sin embargo, puede ser procesado al igual que los termoplásticos, por lo que este tipo de polímero se encuentra en el grupo de los elastómeros termoplásticos. Este polímero tiene buena transparencia y brillo, propiedades de barrera, resistencia a bajas temperaturas, resistencia a fracturas, impermeabilidad y resistencia a la radiación UV. El EVA tiene poco o ningún olor y compite con la goma y productos vinílicos en muchas aplicaciones eléctricas. Es tres veces más flexible que el polietileno de baja densidad (LDPE, por sus siglas en inglés), mostrando un alargamiento por tracción del 750%. Las propiedades del EVA son dependientes del contenido cristalino otorgado por el etileno

y el contenido amorfo dado por el acetato de vinilo (VA, por sus siglas en inglés) (Figura 9), por lo tanto, si se incrementa el contenido de acetato de vinilo se disminuye la cristalinidad del EVA. Una disminución de la cristalinidad del EVA provoca un incremento de la resistencia a la rotura en frío, menor resistencia a la tensión y a la deformación por calor (punto de reblandecimiento) y un incremento de la flexibilidad (mayores alargamientos bajo tracción) [53].

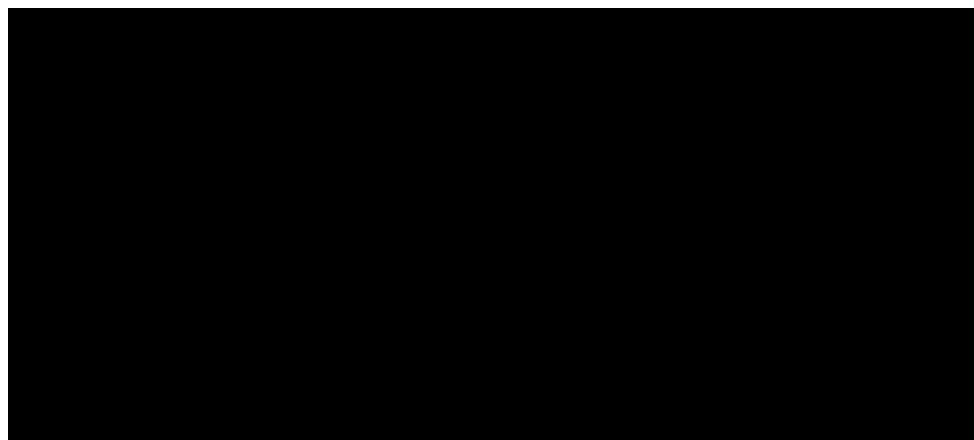


Figura 9. Esquema estructural del copolímero EVA.

El EVA es utilizado en muchas aplicaciones, tales como; para el aislamiento eléctrico, recubrimiento de cables, en impermeabilizantes, en el embalaje de componentes y en la industria del calzado [54]. Se han realizado varios estudios, buscando el reforzamiento del material con otros componentes, tales como nanotubos de carbono, sepiolita, arcillas y dióxido de titanio [46]. Evidentemente, las propiedades se incrementan cuando el componente reforzante se dispersa en escala nanométrica.

2.6 Nanocompuestos poliméricos EVA/TiO₂

Los nanocompuestos poliméricos tienen mejores propiedades generales que el polímero por separado (matriz), esto se relaciona con varios factores dentro de los cuales se destaca la buena distribución de la fase dispersa en la matriz polimérica.

Para que esto suceda la matriz polimérica juega un papel importante, por ejemplo, el polipropileno es un polímero con diversas aplicaciones, sin embargo, la apolaridad en su estructura no permite interacciones con la fase dispersa, de la misma manera, estudios han comprobado que la polaridad parcial del VA en el EVA aumenta las interacciones entre el polímero y la fase dispersa provocando mejoras en sus propiedades [55].

III. ANTECEDENTES

Es sabido que el TiO₂ comercial tiene dimensiones nanométricas y que almacenarlo en polvo favorece la aglomeración, disminuyendo así la capacidad fotocatalítica. Es por ello que, es necesario dispersarlo e inmovilizarlo en una matriz polimérica para evitar la aglomeración y aprovechar mejor su capacidad fotocatalítica. Son varios los métodos convencionales de síntesis del TiO₂, sin embargo, aún se buscan alternativas para hacer el proceso de síntesis más amigable con el medio ambiente. Una de estas alternativas es el uso de extractos de plantas, considerando que algunos de los metabolitos presentes en la planta puedan reducir y estabilizar a las nanopartículas de TiO₂. Por ejemplo, Sivaranjani *et al.* [56] realizaron la síntesis de nanopartículas de TiO₂ utilizando un extracto de hojas de *Moringa oleifera*, obteniendo nanopartículas esféricas con un tamaño promedio aproximado de 100 nm. El TiO₂ sintetizado mostró actividad cicatrizante significativa en heridas de ratas albino.

Por su parte, la planta *S. rebaudiana* ha sido utilizada para la obtención de nanopartículas de diferente naturaleza. Es el caso de Sadeghi *et al.* [25], que sintetizaron nanopartículas de oro, utilizando un extracto de las hojas de *S. rebaudiana*, observando mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), nanopartículas de oro con un tamaño de 5 a 20 nm, con morfología esférica. Paralelamente, Yilmaz *et al.* [27] realizaron la biosíntesis de nanopartículas de plata, utilizando extractos de hojas de *S. rebaudiana* secadas en sombra. En las pruebas con microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y difracción de rayos X (DRX), comprobaron la formación de nanopartículas con morfologías esféricas y diámetros de partículas entre 2 y 50 nm. Por otra parte, Mirla Rodríguez *et al.* [57] describen el uso del extracto de las hojas de *S. rebaudiana* como plantilla para la síntesis de TiO₂, calcinando el producto a 500, 600 y 750 °C, obteniendo nanotubos de TiO₂ con diámetro promedio de 26 a 60 nm y una longitud de 100 a 150 nm.

Las nanopartículas de TiO_2 mediante fotocatalisis generan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles). Es por ello que su espectro de aplicación es muy amplio. Uno de ellos, es su posible uso en la medicina como agente anticancerígeno, por lo cual, algunos investigadores han seguido esta línea de investigación, tal es el caso de Kubota *et al.* [50] quienes investigaron el efecto del TiO_2 contra células cancerígenas de vejiga humana T24. Los investigadores observaron que el TiO_2 al ser irradiado con luz UV (300-400 nm) disminuye drásticamente el crecimiento de las células T24. Thevenot *et al.* [48] examinaron el efecto anticancerígeno no fotocatalítico del TiO_2 funcionalizado en la superficie, las células analizadas incluyeron melanoma B16F10, carcinoma de pulmón de Lewis, células de cáncer de próstata JHU y fibroblastos 3T3. Los investigadores reportaron que la viabilidad celular dependía de las concentraciones de partículas, los tipos de células y la química de la superficie. Específicamente, los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ mostraron una toxicidad significativamente mayor que la de $-\text{COOH}$.

Aun cuando las nanopartículas de TiO_2 por sí mismas son altamente efectivas, la dispersión e inmovilización de estas nanopartículas en una matriz polimérica, tal como el EVA, podría potencializar su actividad biológica. No obstante, la eficaz nanodispersión en el polímero es un reto científico y tecnológico. Por ejemplo; Valentim *et al.* [58] describieron el efecto de la adición de nanopartículas de TiO_2 al EVA con 28% de acetato de vinilo, mediante solución por ultrasonido, los autores obtuvieron un ligero incremento en la estabilidad térmica por la dispersión a escala nanométrica del TiO_2 . González *et al.* [46] realizaron estudios sobre el efecto de nanopartículas de TiO_2 en el coeficiente de expansión térmica de EVA, procesado en estado sólido mediante un molino de bolas. Los autores, consiguieron de manera significativa reducir el coeficiente de expansión térmica del EVA añadiéndole cantidades muy pequeñas de TiO_2 . De acuerdo a sus resultados, concluyen que al tener un material que se dilate menos, se consigue detener la luz UV durante más tiempo, consecuentemente, aumenta su actividad fotocatalítica.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la síntesis de nanopartículas vía química se utilizan diversos reactivos, algunos de ellos tóxicos y/o contaminantes para el medio ambiente. Es por ello que, en el presente trabajo se pretendió sintetizar nanopartículas de TiO_2 utilizando extractos de la planta *Stevia rebaudiana*, para generar un proceso amigable con el medio ambiente y más económico que los convencionales. Por otro lado, el EVA, un copolímero estable y no tóxico, ha sido aprobado por la U. S. Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado en productos que estén en contacto directo con los alimentos. Por lo tanto, este copolímero es factible para ser utilizado como soporte de las nanopartículas de TiO_2 obtenidas con el extracto de *S. rebaudiana* y con ello obtener nanocompuestos EVA/ TiO_2 con posible aplicación ante células cancerígenas.

V. HIPÓTESIS

Algunos metabolitos de *Stevia rebaudiana* podrán reaccionar con el precursor $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ para formar nanopartículas de TiO_2 , las nanopartículas obtenidas se dispersarán e inmovilizarán en el copolímero EVA para formar un nanocompuesto con posible aplicación para el daño celular de células cancerígenas.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Desarrollar nanocompuestos de EVA/TiO₂ utilizando nanopartículas obtenidas mediante síntesis verde con *Stevia rebaudiana*.

6.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de TiO₂ con el extracto crudo de *Stevia rebaudiana*.
- Realizar extracciones líquido-líquido al extracto crudo.
- Sintetizar nanopartículas de TiO₂ con las fracciones obtenidas de la extracción líquido-líquido.
- Caracterizar las nanopartículas de TiO₂ sintetizadas.
- Determinar la capacidad anticancerígena de las nanopartículas.
- Preparar nanocompuestos de EVA/TiO₂.
- Caracterizar estructural y morfológicamente a los nanocompuestos.
- Determinar la capacidad anticancerígena de los nanocompuestos.

VII. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Materiales

Se utilizaron hojas de *Stevia rebaudiana* de cultivos de la región. Como precursor se utilizó tetrabutóxido de titanio ($\text{Ti}(\text{BuO})_4$) con 97% de pureza, el cual fue adquirido de Sigma Aldrich Co. Los disolventes: hexano, cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo (AcOEt), *n*-butanol (*n*-BuOH) y metanol (MeOH) de grado técnico también fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. Estos disolventes fueron previamente destilados en laboratorio para su uso. El copolímero etileno-acetato de vinilo con 40% en peso de acetato de vinilo, etiquetado comercialmente como ELVAX 40w fue adquirido de Dupont Co.

7.2 Metodología

En la Figura 10 se muestra la metodología que se siguió para cumplir con los objetivos del proyecto.

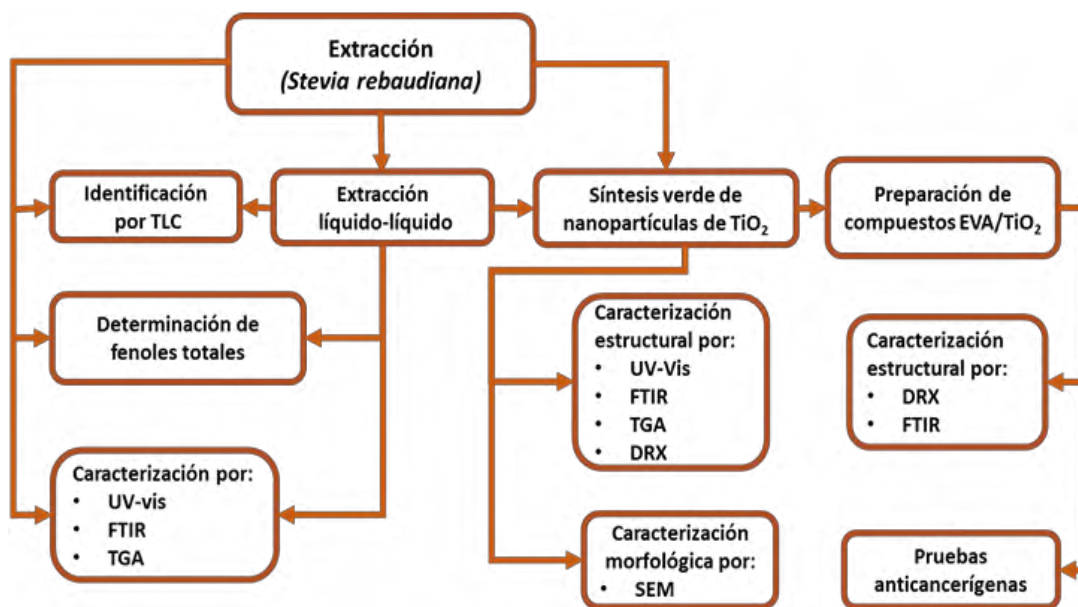


Figura 10. Diagrama general de seguimiento para el desarrollo del proyecto.

7.3 Extracción de *Stevia rebaudiana*

Las hojas de *S. rebaudiana* se secaron a la sombra y posteriormente se llevaron a peso constante a temperatura controlada. La extracción se realizó por maceración hidroalcohólica, tomando 500 g de hojas secas en una mezcla agua-metanol (20:80) durante 24 h. Posteriormente, se filtró con algodón y se concentró en un rotavapor con vacío de 42 mbar para el agua y 218 mbar para metanol considerando una temperatura de 50 °C. El extracto crudo (E0) se guardó en refrigeración a 4 °C para su posterior uso.

7.3.1 Extracción líquido-líquido

Para obtener las fracciones, se resuspendieron 10 g del extracto seco en 50 mL de agua, se colocó en un embudo de separación y se agregaron 50 mL de hexano, una vez mezcladas las fases, se dejó reposar para que los metabolitos afines a la polaridad de las fases se separaran. Por decantación se obtuvieron la fase orgánica correspondiente al hexano (Hex0) y la fase acuosa, la fase acuosa se utilizó para repetir el proceso, obteniendo las fracciones de CHCl₃ (A0), de AcOEt (B0), de *n*-BuOH (C0), y se recuperó la fase acuosa residual (D0), todas se llevaron a peso constante en una estufa a 50 °C y posteriormente se guardó a 4 °C para utilizarlo en la síntesis de nanopartículas.

7.3.2 Caracterización por cromatografía en capa fina

Para la separación de glucósidos de esteviol (GE), los extractos y las fracciones obtenidas se resuspendieron en agua. Posteriormente se aplicaron 5 µL 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 una fase móvil descrita por Londhe Nanaware (2013) [59], que consistió en AcOEt:EtOH:acetona:H₂O (15:3:6:6 v/v/v/v). Las placas se revelaron con una solución

de orcinol al 0.5%, el cual se preparó en MeOH:H₂SO₄ (95:5 v/v), posteriormente la placa se calentó ligeramente.

La identificación de GE se realizó por comparación con los estándares empleados y su factor de retención (R_f , por sus siglas en inglés). 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 disolvente.

7.3.3 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales del extracto crudo y de las fracciones obtenidas se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu [60]. El blanco de reacción se preparó con 100 µL de muestra diluida, 1170 µL de agua destilada y 234 µL de carbonato sódico al 20% (p/v). La mezcla de reacción se preparó con 100 µL de muestra diluida, 1120 µL de agua destilada, 50 µL del reactivo de Folin, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 6 minutos, inmediatamente después se agregaron 234 µL de carbonato sódico al 20% (p/v). Después de 30 minutos se leyeron las muestras en un espectrofotómetro de UV-Vis a 760 nm. El contenido de compuestos fenólicos se determinó utilizando una curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones (5-35 µg), el resultado es expresado en µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto. (µg EAG/mg_{Ext}).

7.4 Síntesis de nanopartículas de TiO_2 vía *Stevia rebaudiana*

La síntesis de nanopartículas se realizó con el extracto crudo y con las fracciones obtenidas de la extracción líquido-líquido, excepto con la fracción de hexano; para ello se resuspendieron 250 mg de cada una de las muestras en 50 mL de agua. Se mantuvo con agitación vigorosa constante y se calentó hasta 50 °C, posteriormente se agregaron 355 μL del precursor $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ y se mantuvo con la misma agitación y temperatura por 3 h, una vez terminadas las reacciones se caracterizaron por espectroscopia de UV-Vis y posteriormente se secaron en una estufa utilizando dos condiciones diferentes, una réplica a 60 °C por 12 h y la otra a 110 °C por 5 h, los productos de reacción en polvo que se obtuvieron se guardaron para su posterior caracterización.

7.5 Formación de películas de EVA con el producto de reacción (compuestos EVA/ TiO_2)

Se llevó a cabo la formación de películas de EVA con los productos de reacción secados a 110 °C. Como primer paso, se resuspendió cada uno de los productos de reacción en disolventes cuya polaridad permitiera obtener una mezcla homogénea; para ello se tomó 5 mg de los productos de reacción en 5 mL de los siguientes disolventes: para la fracción de CHCl_3 (A0) y AcOEt (B0) se utilizó el mismo disolvente, CHCl_3 y AcOEt respectivamente. Para las fracciones *n*-BuOH (C0), acuosa residual (D0) y el extracto crudo (E0) se resuspendieron en EtOH. Con la finalidad de facilitar la solución y desaglomerar las partículas de los productos de reacción se llevó a un baño ultrasónico por 30 s. Para formar las películas, se depositaron 5 mL de CHCl_3 en vasos de precipitado de 50 mL, inmediatamente después, se agregaron 1 mL de los productos de reacción previamente diluidos (un producto de reacción por cada vaso), se agregaron 0.5 g de pellets de EVA y se mantuvo con una agitación constante de 400 rpm durante 30 minutos, al finalizar el tiempo, las mezclas se depositaron en moldes y se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 h, el blanco se preparó con CHCl_3 y pellets de EVA, las películas se guardaron para su caracterización.

Los componentes utilizados, las fracciones extraídas con diferentes disolventes, los productos de reacción y los compuestos obtenidos fueron caracterizados por diferentes técnicas.

7.6 Espectroscopia ultravioleta visible

Se obtuvieron espectros de absorción de irradiación UV-vis en un espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-Vis) de doble HAZ modelo LAMBDA 2S 1600-00BB con software UVWINLAB, marca Perkin Elmer serie 501508112712.

7.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

El estudio de los grupos funcionales presentes en el extracto crudo, en las fracciones, en los productos de reacción y en las películas, se realizó por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). 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- 515 cm^{-1} .

7.8 Difracción de rayos X

Para determinar la cristalinidad de los productos de reacción y las películas, se utilizó un difractómetro de rayos X (DRX) de la marca Bruker Axs, modelo D8 Advance con un generador de radiación de Cu $K\alpha$ con filtro de Ni. Se utilizaron rejillas de 1 mm para los extractos y rejillas de 6 mm para las películas. Los análisis de los productos de reacción se llevaron 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.

7.9 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA), para identificar las temperaturas de degradación se utilizó un analizador térmico simultáneo STA-6000 marca 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.

7.10 Microscopía electrónica de barrido

Para observar tamaño, morfología y composición de los productos de reacción en polvo y dispersos en películas de EVA se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JSM-IT300LV, a 20 kV, alto vacío y con detector de electrones secundarios.

7.11 Ensayos de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó la prueba de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se sembraron 1×10^5 células contenidas en 100 μ L en cada pozo y se incubaron a 37 °C, a 5% de CO₂ por 24 h. Pasado este tiempo se retiró el medio y se añadió medio nuevo, posteriormente se adicionaron 150 μ g/mL de los productos en estudio (extracto de las fracciones y productos de reacción secados a 110 °C), partiendo de un stock de 10 mg/mL preparados en DMSO. Se realizaron diluciones seriadas de los compuestos 1:2. Se incubó por 24 h a 37 °C y 5% de CO₂, después se adicionó 10 μ L de la solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL preparado en PBS, se incubó nuevamente por 3 h a 37 °C y 5% de CO₂, se retiró el medio y se añadió 100 μ L de DMSO, y se incubó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron los cristales de formazan y se midió la absorbancia 570 nm. Los resultados fueron graficados con el programa GraphPad Prism 6.0.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Extracción hidroalcohólica de las hojas de *S. rebaudiana*

En la extracción hidroalcohólica se obtuvo un rendimiento del 32.85% (552.08 g de extracto seco). El extracto se caracterizó por UV-Vis, FTIR y TGA. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

8.1.1 Caracterización por espectroscopia UV-Vis del extracto crudo

El espectro UV-Vis para el extracto crudo (Figura 11) muestra una absorción máxima en 324 nm.

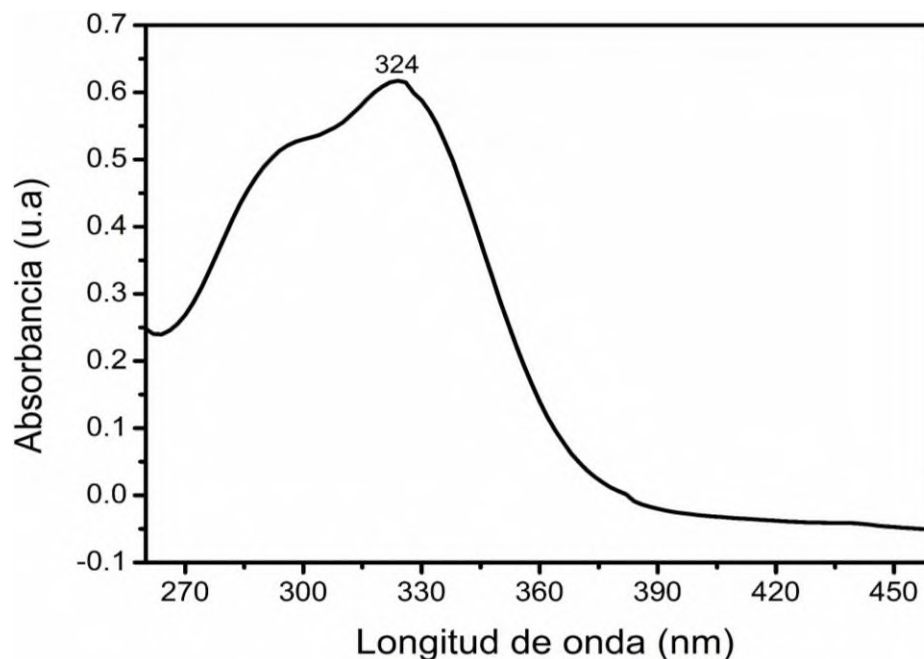


Figura 11. Espectro UV-Vis del extracto crudo.

8.1.2 Caracterización por FTIR del extracto crudo de *S. rebaudiana*

Para conocer los grupos funcionales presentes en el extracto de *S. rebaudiana*, se caracterizó por espectroscopia infrarroja. En la Figura 12 se observa el espectro de IR del extracto crudo.

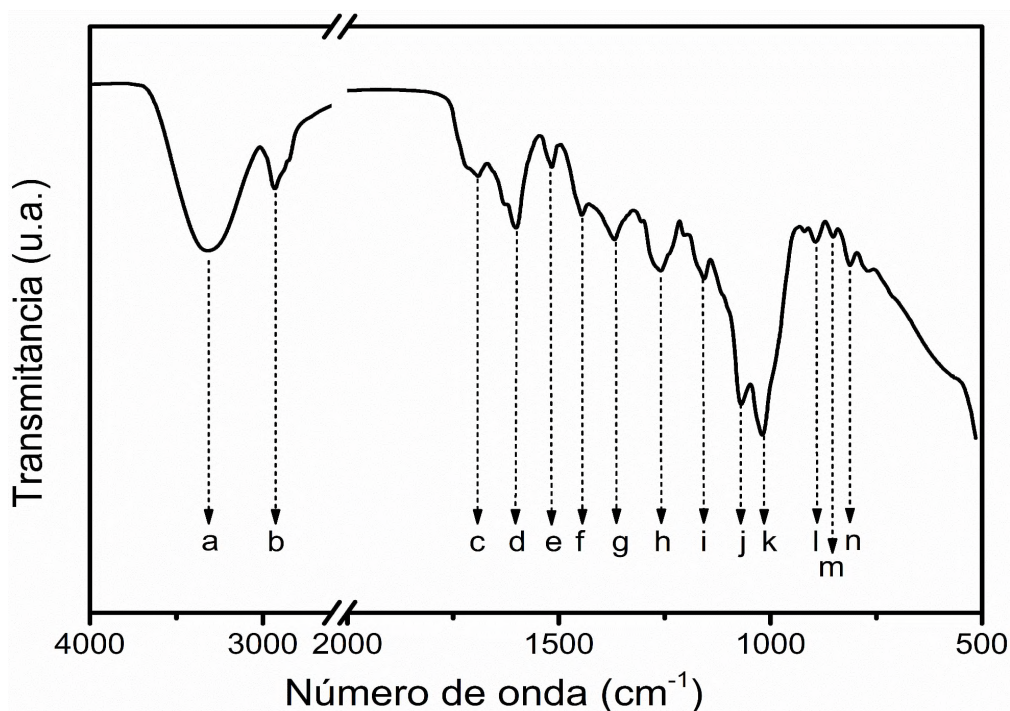


Figura 12. Espectro de FTIR del extracto crudo.

Las bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales presentes en el extracto se muestran en la Tabla 2. De acuerdo a investigaciones previas, la banda **a**, pertenece a los movimientos vibracionales de estiramiento correspondientes al grupo funcional hidroxilo O-H, el cual puede ser atribuido al agua contenida aún en el extracto, compuestos fenólicos o alcoholes, la banda **b**, corresponde a movimientos vibracionales asimétricos de estiramiento para alcanos SP^3 , la banda **c**, se le atribuye a los movimientos de estiramiento para el grupo carbonilo C=O, la **d** y **e** pertenecen también a movimientos de estiramientos para los enlaces C=C correspondientes a anillos aromáticos, el cual se le atribuye al esqueleto de los compuestos fenólicos, la **f** a los movimientos de estiramiento del enlace O-H en el ácido carboxílico, en el rango

de la **g** y **h** pueden corresponder a movimientos vibracionales de estiramiento atribuidas a los siguientes grupos funcionales: C-OH, R-N-H, =C-O-C y al estiramiento del carbonilo en el ácido carboxílico, la banda **i** corresponde al estiramiento del O-H en alcoholes terciarios y la **j** se le atribuye a los movimientos de estiramiento del grupo funcional éter C-O-C, la **k**, se relacionan con la vibración del C-H fuera del plano en alquenos, las **l**, **m**, y **n**, se relacionan con los movimientos de vibración fuera del plano en la estructura de los anillos aromáticos [25,61-63]. Estos grupos funcionales son componentes de los metabolitos, tales como polifenoles, glucósidos, diterpénicos (esteviósidos y rebaudiósidos), entre otros, presentes en el extracto de *S. rebaudiana* [61,62].

Tabla 2. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en los extractos.

Banda	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3320	O-H	Estiramiento
b	2932	R-CH ₂ -R	Estiramiento asimétrico
c	1692	C=O	Estiramiento
d	1600	C=C	Estiramiento (aromático)
e	1520	C=C	Estiramiento (aromático)
f	1447	COO-H C-OH,	Estiramiento del hidroxilo en el ácido carboxílico
g	1370	R-N-H	Estiramiento
h	1258	=C-O-C O=COH	Estiramiento del carbonilo en el ácido carboxílico
i	1150	R-OH	Estiramiento (terciario)
j	1070	C-O-C	Estiramiento
k	1015	C=C-H	Relacionadas con la vibración fuera del plano en alquenos
l	894	C=C-H	Relacionadas con la vibración fuera del plano del anillo aromático
m	853	C=C-H	
n	812	C=C-H	

8.1.3 Caracterización por TGA del extracto crudo de *S. rebaudiana*

El análisis termogravimétrico para el extracto crudo (E0) se muestra en la Figura 13. En el termograma se puede observar que existen tres pérdidas de masas significativas, la primera se presenta a 121.17 °C, a esa temperatura se pierde el 9.47% de la masa total, la cual puede ser atribuida a la humedad y a los metabolitos termosensibles, la segunda y la tercera se presentan a 304.05 °C y 451.24 °C, a esas temperaturas se pierde el 50.62% y el 13.21% respectivamente, lo cual puede ser atribuida a los glucósidos de esteviol como los esteviósidos y rebaudiósidos, quedando un residuo del 25.6%.

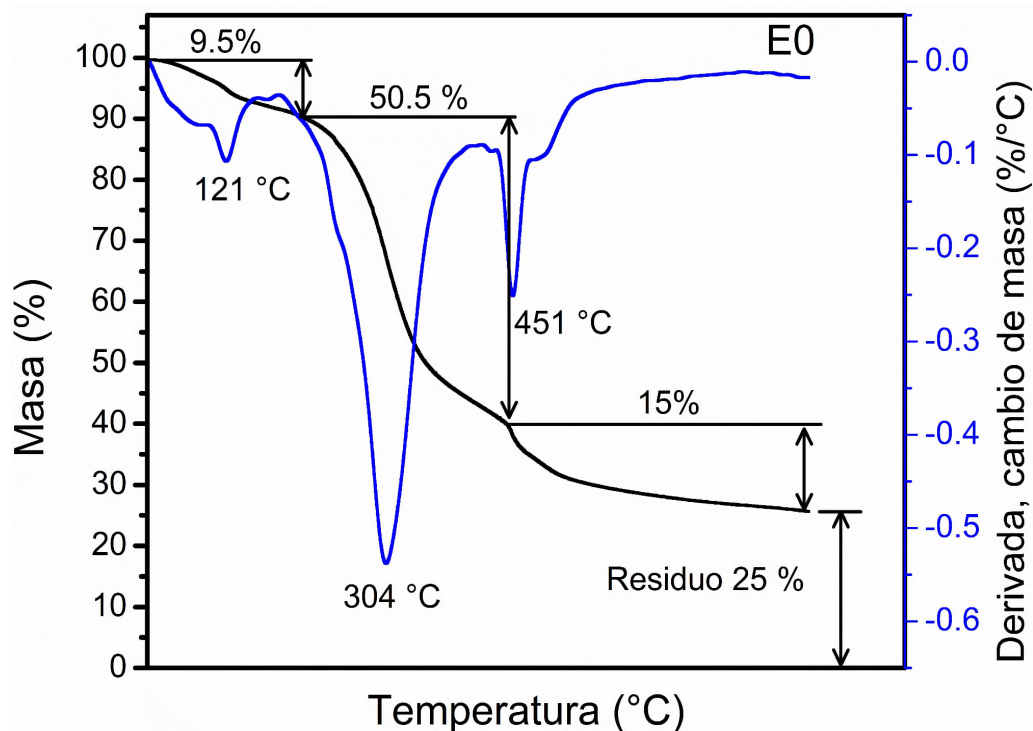


Figura 13. Termograma del extracto crudo.

8.2 Extracción líquido-líquido

En la Figura 14 se muestra la secuencia de la extracción líquido-líquido, utilizando disolventes de polaridad ascendente (hexano (Hex0) < CHCl₃ (A0) < AcOEt (B0) < *n*-BuOH (C0), y fracción acuosa residual (D0)).

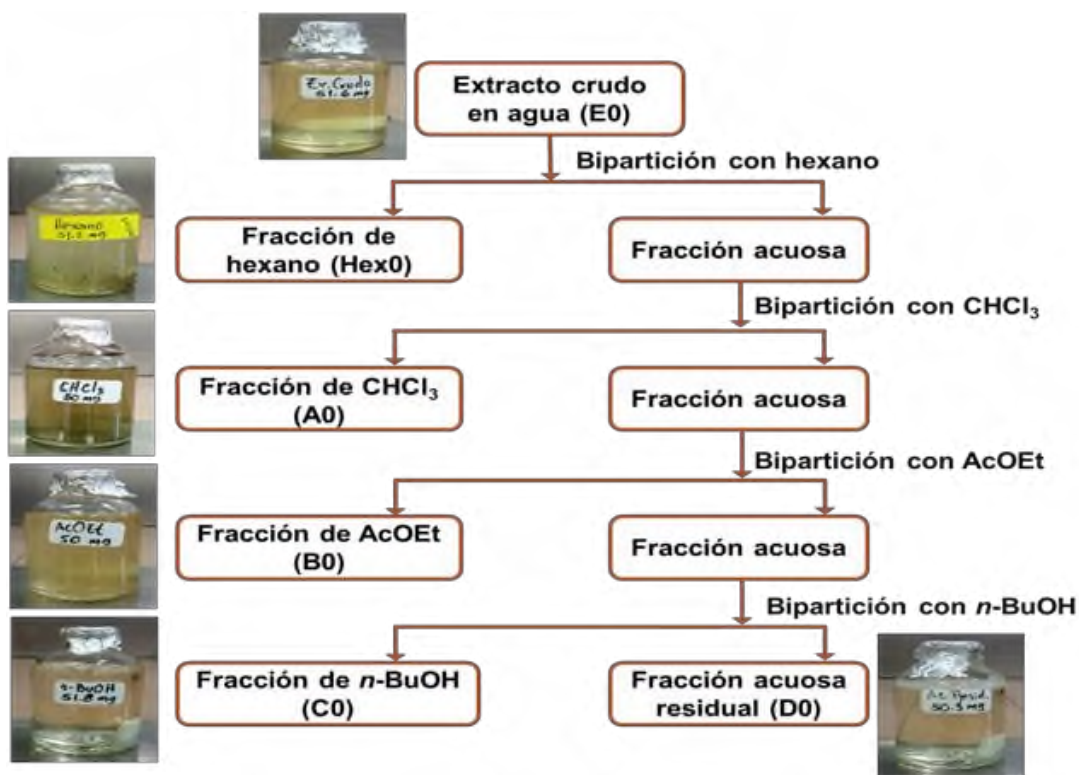


Figura 14. Secuencia para la extracción líquido-líquido.

8.2.1 Rendimiento de la extracción

El rendimiento para las fracciones fue calculado en función al extracto seco obtenido en cada paso de separación. El mayor rendimiento fue en la fracción de *n*-BuOH con 51.19% y el menor rendimiento se obtuvo en la fracción de hexano con 1.6% (Tabla 3). Esto se debe a que la extracción original fue con una mezcla hidroalcohólica, es decir, la mayor cantidad de metabolitos extraídos fueron polares, siendo el hexano un disolvente no polar, el rendimiento en esta fracción fue consecuentemente baja.

Tabla 3. Rendimiento de las fracciones

Fracciones	Rendimiento (%)
Hexano (Hex 0)	1.60
CHCl ₃ (A0)	3.72
AcOEt (B0)	3.08
<i>n</i> -BuOH (C0)	51.19
Acuosa residual (D0)	40.34

8.2.2 Identificación por TLC de los glucósidos de esteviol

Se realizó la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) para identificar glucósidos de esteviol utilizando como estándar el esteviósido y rebaudiósido A, los cuales tienen un R_f de 0.4 y 0.3 respectivamente y fueron revelados con orcinol. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15, en las fracciones de hexano (Hex0), CHCl_3 (A0) y AcOEt (B0), se observa en el frente de disolvente el color verde característico de las clorofilas y no se observaron glucósidos de esteviol. En el caso de la fracción B0 se observó una banda de color café que pone en evidencia algún posible compuesto glicosilado. Para la fracción *n*-BuOH (C0) y acuosa residual (D0) se observaron bandas del color morado característico para la reacción del orcinol con los glucósidos de esteviol. De la misma manera se observó en D0 que hubo un arrastre de compuestos glicosilados ligeramente arriba del punto de aplicación. Con las características mencionadas y los valores de R_f se puede evidenciar la presencia de los glucósidos de esteviol en las fracciones de C0 y D0.

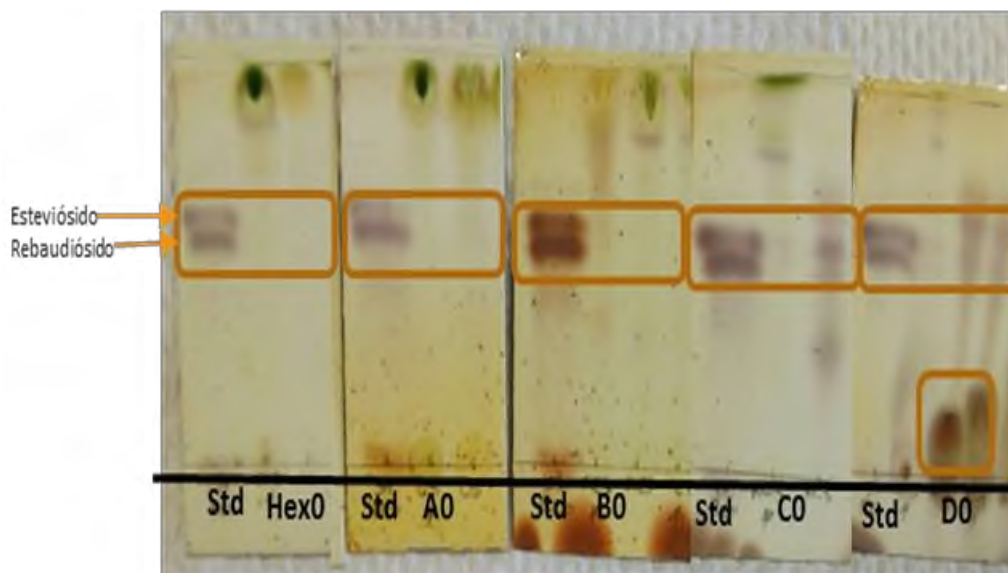


Figura 15. Cromatografía en capa fina de las fracciones de *S. rebaudiana* revelado con orcinol al 0.5%. Sistema de elución: AcOEt-EtOH-acetona- H_2O (15:3:6:6, v/v/v/v). Hexano (Hex0), CHCl_3 (A0), AcOEt (B0), *n*-BuOH (C0) y acuosa residual (D0). Los estándares son etiquetados como Std.

8.2.3 Determinación de fenoles totales

Para determinar la cantidad de fenoles totales presentes en cada fracción, se realizó una curva de calibración, utilizando ácido gálico como estándar en un rango de 0 a 35 μg (Figura 16).

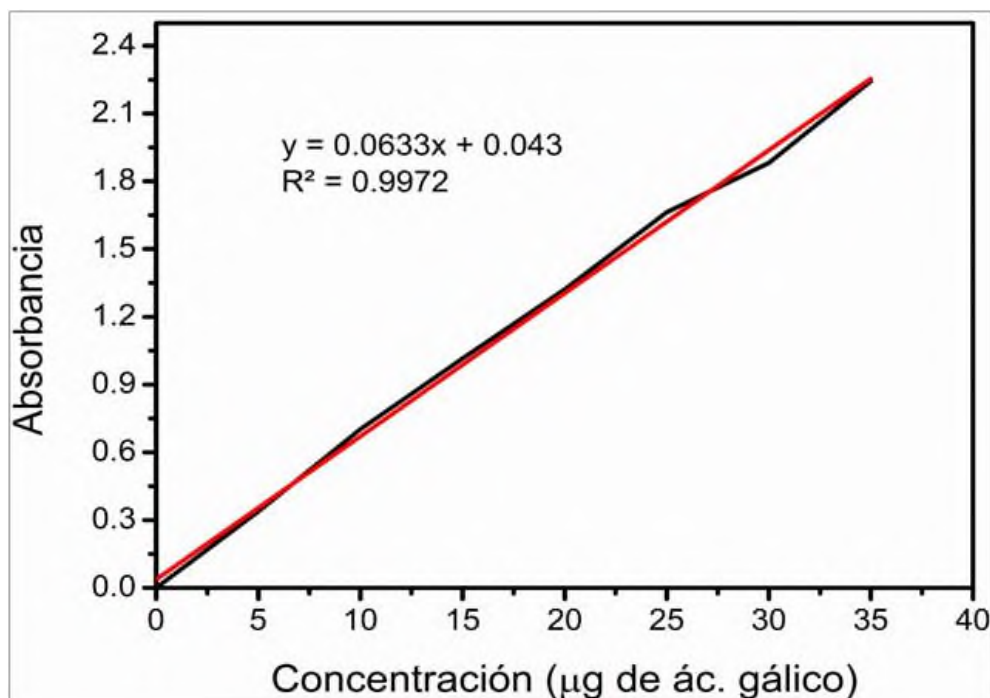


Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales.

Para la cuantificación de los fenoles totales se prepararon las muestras a analizar a una concentración de 1 mg/mL, de las cuales se tomaron diferentes volúmenes para hacer reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, cada una de las pruebas se realizaron por triplicado. Con las lecturas de absorbancia se calculó el contenido de fenoles totales y los resultados expresados en μg equivalente de ácido gálico/mg de extracto seco ($\mu\text{gEAG/mgExt}$) se muestran en la Tabla 4. Se observa que la fracción de AcOEt contiene la mayor cantidad de fenoles totales con valores de 338.63 $\mu\text{gEAG/mgExt}$, seguido de las fracciones de CHCl_3 , acuosa residual y de la fracción de *n*-BuOH, con valores de 185.09, 115.64 y 112.63 $\mu\text{gEAG/mgExt}$ respectivamente.

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de fenoles totales

Fracciones	Fenoles totales ($\mu\text{gEAG/mgExt}$)
Hexano (Hex0)	1.13
CHCl_3 (A0)	185.09
AcOEt (B0)	338.63
<i>n</i> -BuOH (C0)	112.63
Acuosa residual (D0)	155.64
Extracto crudo (E0)	136.26

8.2.4 Caracterización por UV-Vis de las fracciones

El análisis por espectroscopia de UV-Vis (Figura 17) muestra que la fracción Hex0 y A0 son semejantes con múltiples absorciones en donde destacan 388, 330, 224, 290 y 282 nm, sin embargo, las fracciones B0, C0 y D0, son similares con el espectro del extracto crudo (E0) el cual tiene múltiples absorciones en el rango de 290 a 390 nm con una máxima en 324 nm, mediante esta técnica podemos suponer que existen diferentes mezclas de metabolitos en las fracciones y que ocasionan diferentes absorciones en la región del espectro.

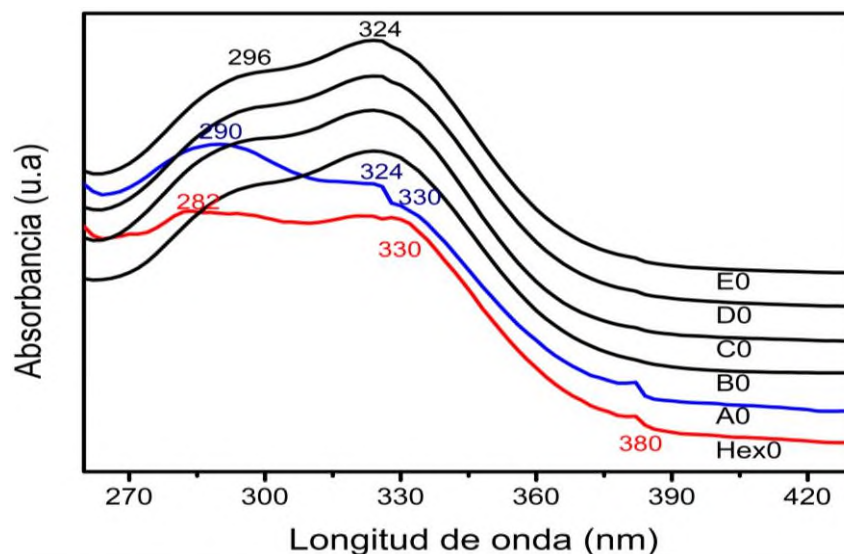


Figura 17. Espectros UV-Vis de las diferentes fracciones obtenidas de las extracciones líquido-líquido.

8.2.5 Caracterización por FTIR de las fracciones

En la Figura 18 se muestran los espectros FTIR de los extractos obtenidos en las fracciones Hex0, A0, B0, C0 y D0 y su comparación con el extracto crudo (E0).

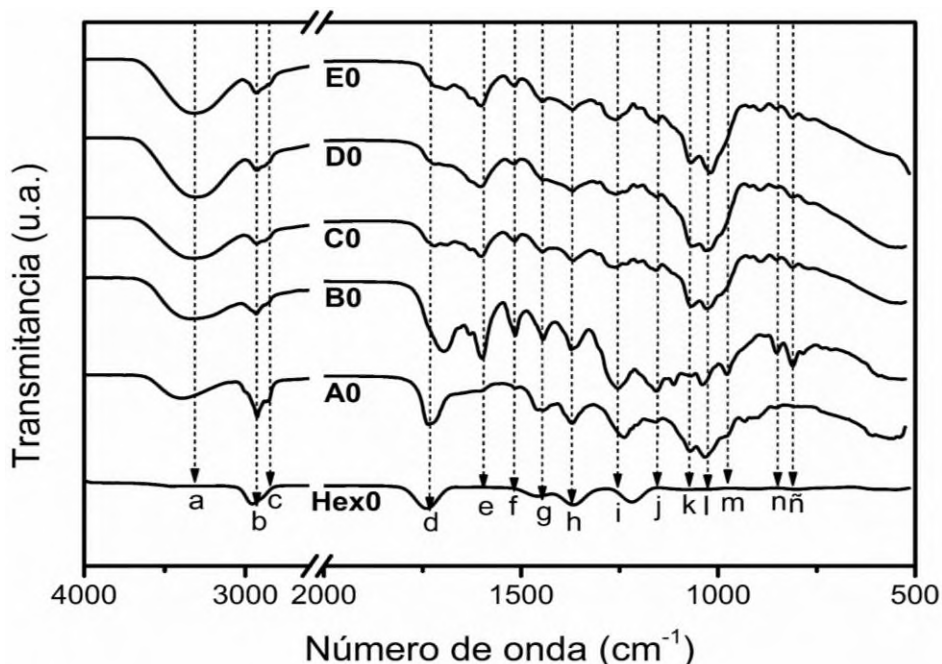


Figura 18. Espectros FTIR de las fracciones obtenidas con la extracción líquido-líquido.

Las bandas de absorción del FTIR asignadas a los modos de vibración de los grupos funcionales se describen en la Tabla 5. Al comparar las fracciones C0 y D0 con el extracto crudo (E0), se puede observar que los cambios que se presentan son mínimos y están con base a la intensidad de las bandas. Esto hace suponer que los compuestos o familias de compuestos presentes, son similares. Así, por ejemplo, la banda **e**, es más intensa en D0 que en C0, esta banda corresponde a los movimientos de estiramiento para los enlaces C=C. De acuerdo a trabajos previos [62] esta banda pueden ser asignada al esqueleto de los anillos aromáticos el cual forma parte de los compuestos fenólicos. De acuerdo a la Tabla 4, D0 contiene más compuestos fenólicos que C0 y E0 respectivamente. Cuando se compara B0 con E0 se observa un incremento muy marcado de intensidad en la banda **d**, lo cual corresponde a los movimientos de estiramiento para el grupo funcional carbonilo C=O. Las bandas **e** y **f**

también se intensifican, y estas corresponden a los movimientos de estiramiento para los aromáticos. Aparecen las bandas **m**, **n** y **ñ** relacionadas con los movimientos de vibración fuera del plano del anillo aromático, el cual forma parte de la estructura de los compuestos fenólicos [25].

Tabla 5. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en las fracciones y extractos.

Banda	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3320	O-H	Estiramiento
b	2932	R-CH ₂ -R	Estiramiento asimétrico
c	2860	R-CH ₃	Estiramiento simétrico
d	1710	C=O	Estiramiento
e	1600	C=C	Estiramiento (aromático)
f	1520	C=C	Estiramiento (aromático)
g	1447	COO-H C-OH,	Estiramiento del hidroxilo en el ácido carboxílico
h-i	1370- 1258	R-N-H =C-O-C O=COH	Estiramiento Estiramiento del carbonilo en el ácido carboxílico
j	1150	R-OH	Estiramiento (terciario)
k	1070	C-O-C	Estiramiento
l	1015	C=C-H	Relacionadas con la vibración fuera del plano en alquenos
m	894	C=C-H	Relacionadas con la vibración fuera del plano del anillo aromático
n	853	C=C-H	
ñ	812	C=C-H	

Estos datos coinciden con los reportados en la Tabla 4, en los cuales la cantidad de fenoles totales es mayor en B0 comparado con las otras fracciones. Al comparar A0 con E0 se muestra un incremento también en las bandas **d** correspondientes al grupo carbonilo C=O, debido probablemente a algunos ácidos presentes en el extracto. Disminuyen las bandas **e** y **f** pertenecientes a los movimientos de estiramiento para los aromáticos. Por último, se compara Hex0 con E0, esta fracción es la que más cambios sufre, la banda **a**, pertenecientes al grupo funcional OH y a los aromáticos **e** y **f** desaparecen. De la misma manera, también desaparecen las bandas **j**, **k**, **l** y **m**, y las bandas **g** y **h**, disminuyen su intensidad, probablemente pertenecen a algunos metabolitos de la familia de los terpenos. Mediante esta información se puede suponer

que las familias de metabolitos presentes en las fracciones son diferentes, por tal motivo, se esperan resultados diferentes durante la síntesis de TiO_2 .

8.2.6 Caracterización por TGA de las fracciones

Los termogramas de los extractos obtenidos en las diferentes fracciones se muestran en las Figuras 19, 20, 21 y 22. En todos los casos se observa una ligera pérdida de masa a temperaturas entre 80 y 160 °C, la cual puede ser atribuida al agua absorbida durante el almacenamiento y a los metabolitos termosensibles. Sin embargo, la mayoría de los metabolitos presentes en los extractos son resistentes a temperaturas mayores de 100 °C. Se degradan en un rango entre 290 a 330 °C y un porcentaje pequeño se degrada entre 420 y 450 °C. Estas temperaturas de degradación se pueden atribuir a los glucósidos de esteviol (esteviósidos y rebaudiósidos) para el caso de C0 y D0, y a los terpenos y compuestos fenólicos para los extractos A0 y B0. La fracción de hexano (Hex0) se omite debido al bajo rendimiento, el cual fue utilizado para la reacción de síntesis con el precursor de titanio. Con base en la información de las gráficas del TGA se infiere que las condiciones de temperaturas que se utilizaron en las reacciones de síntesis y secado (menores a 120 °C) no afectaron a los metabolitos presentes.

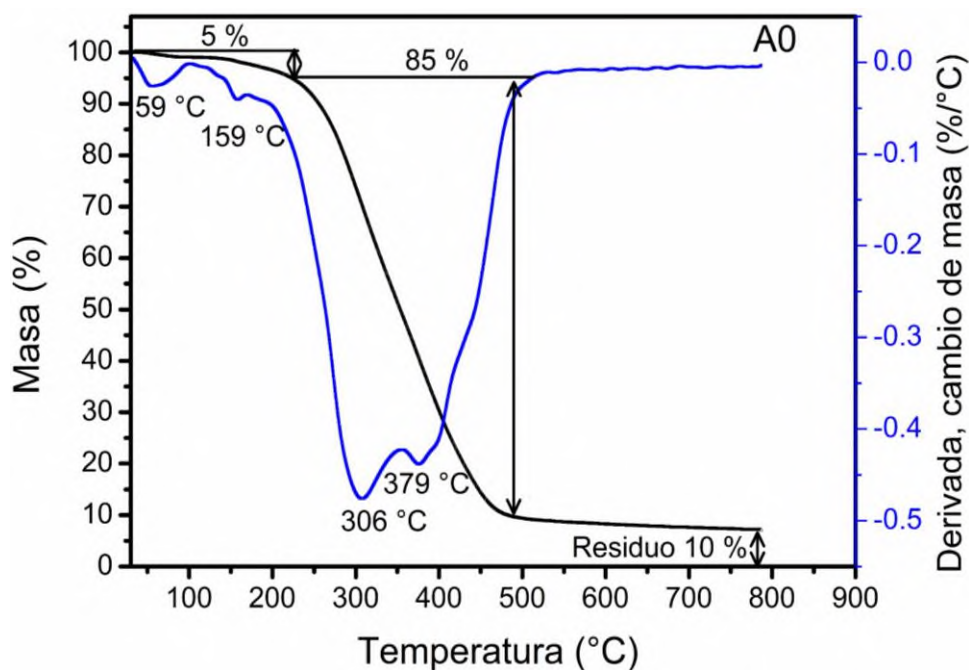


Figura 19. Termograma obtenido en el TGA de la fracción de CHCl_3 (A0).

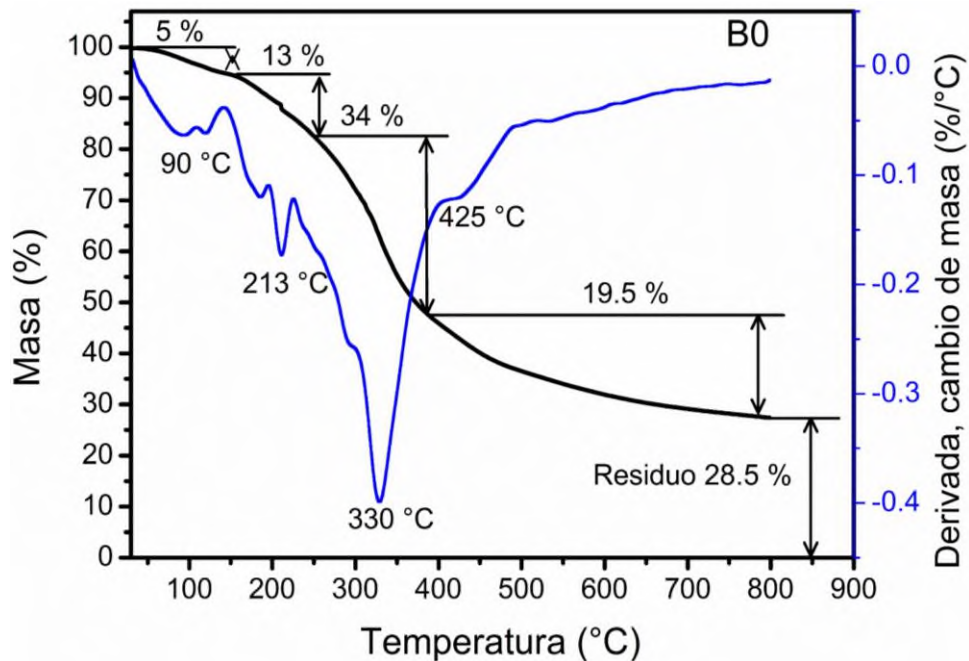


Figura 20. Termograma obtenido en el TGA de la fracción de AcOEt (B0).

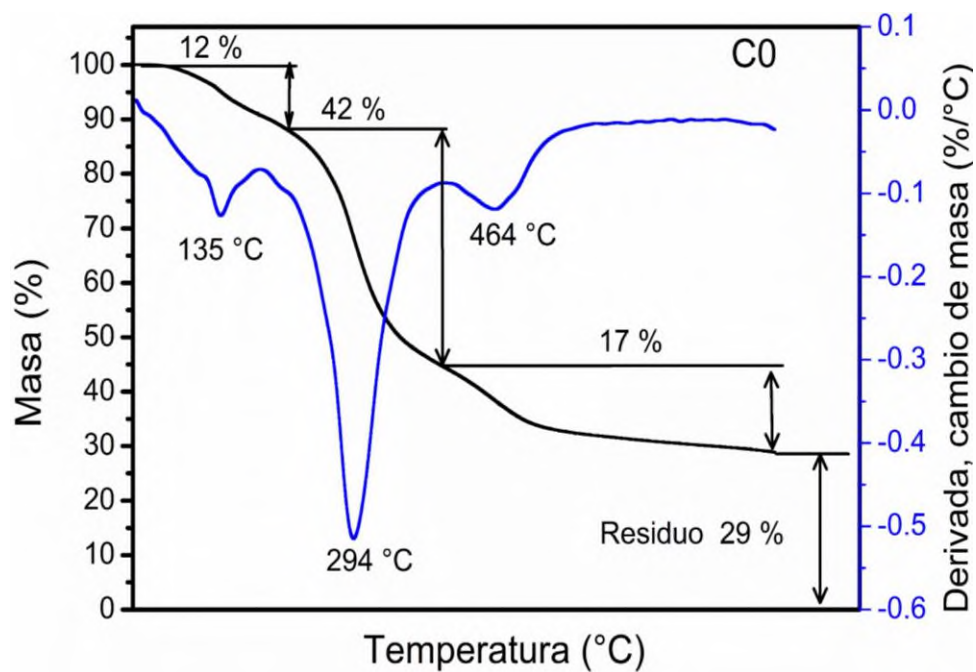


Figura 21. Termograma obtenido en el TGA de la fracción de *n*-BuOH (B0).

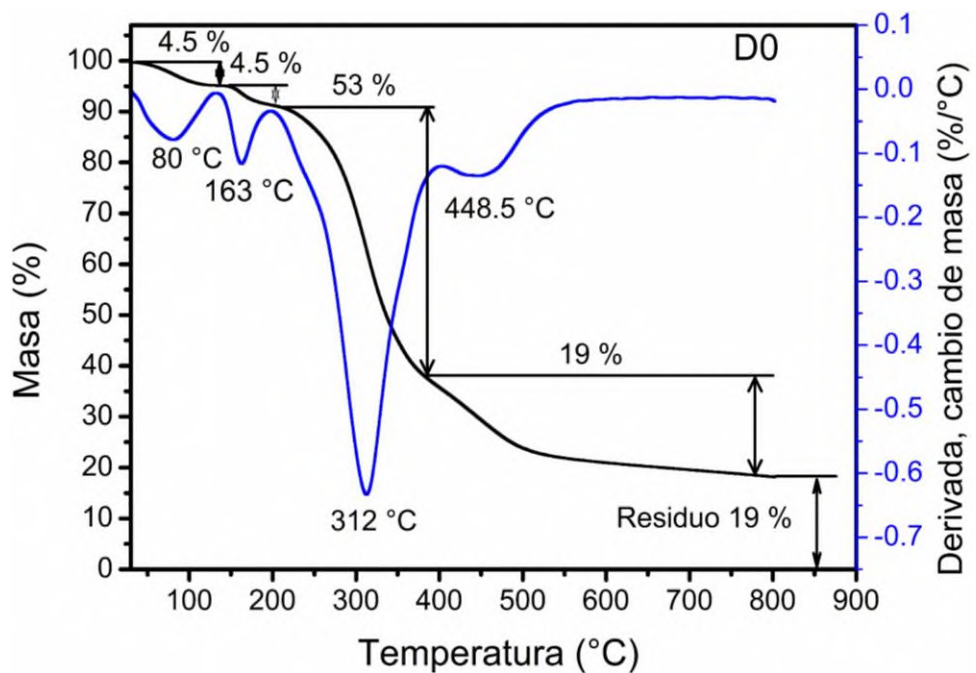


Figura 22. Termograma obtenido en el TGA de la fracción acuosa residual (C0).

8.3 Pruebas de síntesis de nanopartículas de TiO₂ con el extracto crudo de *S. rebaudiana* y estudio de algunos parámetros

Se realizaron pruebas de síntesis utilizando el extracto crudo y modificando diversos parámetros, como la relación de disolventes EtOH/H₂O, la temperatura de reacción y el tiempo de reacción.

8.3.1 Efecto de la relación EtOH/H₂O

Para estudiar este efecto se disolvió el extracto de *S. rebaudiana* (E0) en una mezcla con diferentes proporciones de EtOH/H₂O (1:0, 8:2, 5:5, 2:8, 0:1). Posteriormente, se agregó el precursor (Ti(BuO)₄) y se mantuvo con agitación constante a 400 rpm aproximadamente, realizando las reacciones a dos temperaturas, 25 y 50 °C, por un periodo de 3 h. En la Tabla 6 se muestran los datos con las nomenclaturas de las reacciones.

Tabla 6. Relación EtOH/H₂O de las diferentes reacciones

Nomenclatura de reacción a 25 °C	Relación EtOH:H ₂ O	Nomenclatura de reacción a 50 °C	Relación EtOH:H ₂ O
E1-10-t25	1:0	E1-10-t50	1:0
E1-82-t25	8:2	E1-82-t50	8:2
E1-55-t25	5:5	E1-55-t50	5:5
E1-28-t25	2:8	E1-28-t50	2:8
E1-01-t25	0:1	E1-01-t50	0:1

Con el cambio de color que se presenta después de la reacción puede ser posible establecer un criterio de identificación preliminar de nanopartículas de TiO₂ [64]. En la Figura 23 se muestran las imágenes del extracto, antes y después de la reacción, donde E0-01-t25 corresponde al extracto crudo sin el precursor de titanio a 25 °C y E0-01-t50 a 50°C.

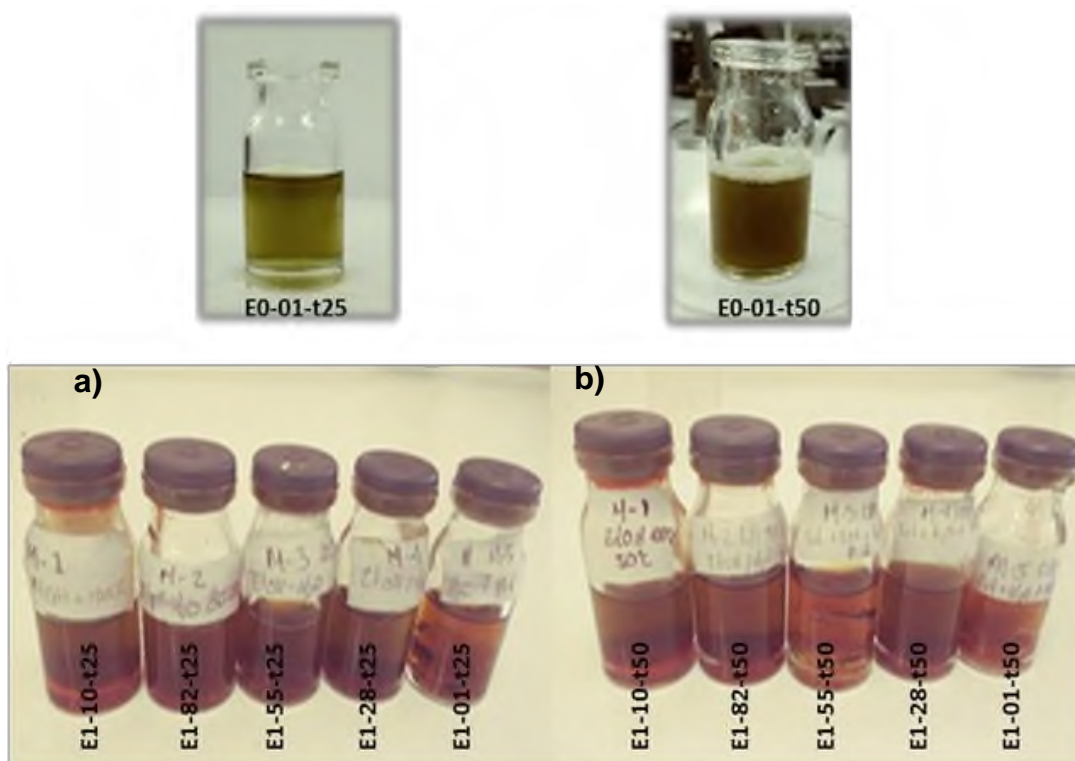


Figura 23. Productos de reacción a diferentes proporciones de EtOH/H₂O.

De acuerdo a la Figura 23, se observa un ligero cambio en la tonalidad del color verde entre los extractos crudos E0-01-t25 y E0-01-t50. Este cambio de tonalidad de color puede ser debido a la degradación de algunos de los metabolitos termosensibles presentes en el extracto. Cuando se compara con los productos de reacción se observan cambios de color que va de verde a café ladrillo. En trabajos anteriores [64], este cambio de color se ha descrito como indicativo preliminar de la presencia de nanopartículas. Sin embargo, cuando las reacciones se comparan entre sí, el color de todos los productos de reacción son similares, sin que la proporción de EtOH/H₂O muestre algún efecto en las reacciones.

8.3.2 Efecto de la temperatura

Considerando la información anterior, donde se observó que la relación de la mezcla EtOH/H₂O no tiene efecto en la coloración de los productos de reacción, se consideró modificar la temperatura. Para ello, se utilizó como disolvente únicamente agua y la misma metodología de la prueba anterior. En la Tabla 7 se muestran las temperaturas probadas y la nomenclatura asignada a las reacciones.

Tabla 7. Reacciones a diferentes temperaturas.

Nomenclatura de reacción	Temperatura °C
E1-01-t50	50
E1-01-t65	65
E1-01-t80	80

En la Figura 24 se muestran las imágenes de los productos de reacción con diferentes temperaturas. Se observa que no hay cambio de color al igual que en las reacciones con diferentes concentraciones de EtOH/H₂O que se muestran en la Figura 23.

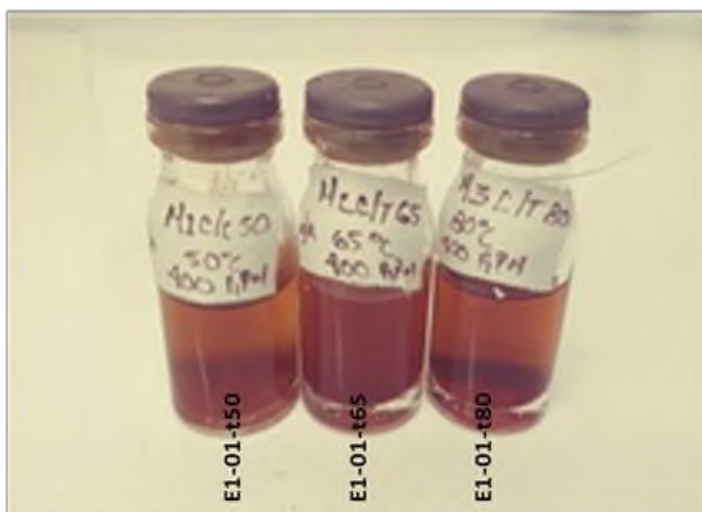


Figura 24. Reacciones a diferentes temperaturas.

8.3.3 Efecto del tiempo de reacción

Debido a que la temperatura en el rango de 50 a 80 °C no influyó sobre la coloración de los productos de reacción, se decidió analizar el efecto que tiene el tiempo de reacción. Para ello, se siguió la misma metodología anterior, pero utilizando solo la temperatura de 50 °C. En la Figura 25 se muestran los productos de reacción a los diferentes tiempos probados, 0, 0.25, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h. De acuerdo a las fotografías se observan ligeros cambios en la tonalidad del color amarillo, de ligero a intenso en función del tiempo. Para corroborar la presencia del TiO₂, los productos fueron secados en una estufa Blinter a 60 °C durante 12 h, para después analizar el comportamiento cristalográfico mediante DRX. En la Figura 26 se muestran los difractogramas de los productos de las reacciones a 3 h (E1-01-t50/3h) y 6 h de reacción (E1-01-t50/6h). Se puede observar que los productos de reacción no muestran alguna señal de cristalinidad característica para el TiO₂ (fase anatasa: una de mayor intensidad en 25, seguidas por otras de menor intensidad en 37, 48, 54 55 y 62; y rutilo: con una de mayor intensidad en 27, seguida por otras en 36, 41, 44 y 57, todas en valor de 2θ).

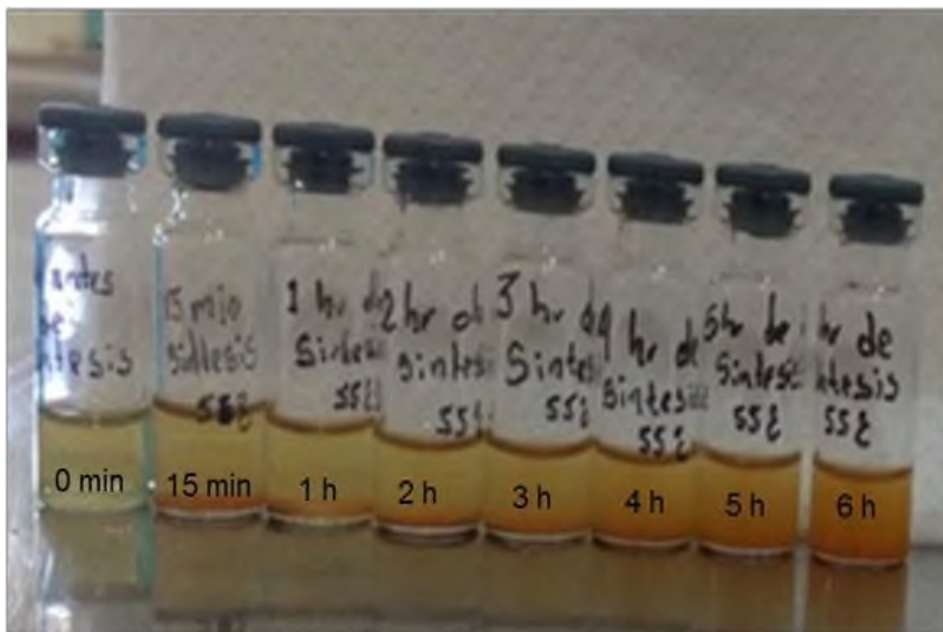


Figura 25. Productos de reacción a los tiempos de reacción indicados.

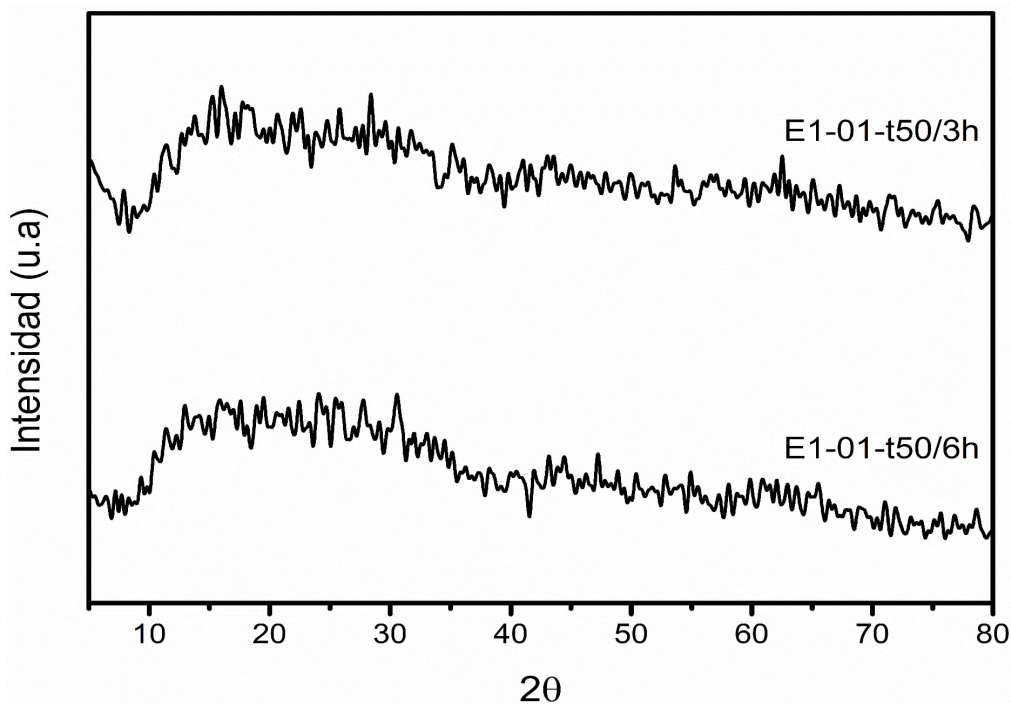


Figura 26. Patrones de difracción de los productos a 3 y 6 h de reacción.

Debido a que el extracto crudo no generó alguna evidencia de formación de TiO_2 , se optó por realizar la síntesis utilizando los extractos obtenidos con las fracciones.

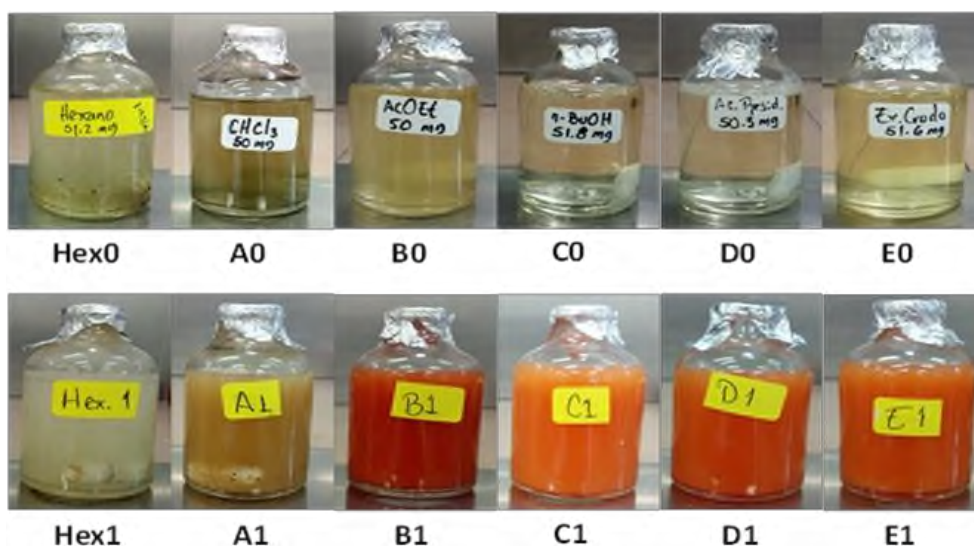
8.4 Síntesis de nanopartículas con las fracciones

Se realizaron las reacciones con las fracciones obtenidas con los diferentes disolventes y con el extracto crudo para comparar. Las reacciones se hicieron a una temperatura de 50 °C, durante 3 h de reacción y se usó agua como disolvente. Posteriormente, los productos fueron secados a dos temperaturas diferentes (60 °C y 110 °C). La nomenclatura que se asignó a los productos de reacción se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Nomenclatura de la síntesis de nanopartículas con las fracciones.

Fracciones	Nomenclaturas			
	Extractos acuosos	productos de reacción líquido	Productos de reacción secados a 60 °C por 12 h	Productos de reacción secados a 110 °C por 5 h
Hexano	Hex0	Hex1	-----	-----
CHCl ₃	A0	A1	A1-60	A1-110
AcOEt	B0	B1	B1-60	B1-110
<i>n</i> -BuOH	C0	C1	C1-60	C1-110
Acuosa residual	D0	D1	D1-60	D1-110
Extracto crudo	E0	E1	E1-60	E1-110

Los resultados obtenidos después de las reacciones se muestran en la Figura 27. Se observan cambios en la coloración entre los extractos y los productos de reacción, el cambio de color va de verde tenue a rojo ladrillo. Se ha descrito que este cambio de color es un indicativo de la formación de nanopartículas de TiO₂ [64]. La intensidad del color rojo ladrillo es mayor en el producto de reacción B1, le siguen en intensidad la fracción, D1, E1, C1 y A1. La fracción Hex1 no mostró ningún cambio.

**Figura 27.** Síntesis de nanopartículas de TiO₂ con las diferentes fracciones.

De acuerdo a algunos estudios, los compuestos fenólicos son responsables de la síntesis de nanopartículas [65]. Si consideramos esta hipótesis y de acuerdo a los resultados en la cuantificación de fenoles totales, donde la fracción B0 mostró mayor cantidad de fenoles totales, seguida por A0, D0, C0 y Hex0 respectivamente (Ver Tabla 4), entonces, cualitativamente, la intensidad en la coloración de los productos de reacción mostrados en la Figura 27 son directamente proporcional con la cantidad de fenoles totales en las fracciones, a excepción del CHCl_3 (extracto: A0, producto de reacción: A1) donde probablemente las clorofilas sean las responsables de opacar este cambio de color en el producto de reacción, ya que esta fracción contiene una cantidad considerable de fenoles que pudieran ayudar a la formación de nanopartículas. En el caso de la fracción de hexano, los resultados no son favorables, ya que el hexano extrajo metabolitos no fenólicos y sin efecto en la formación de nanopartículas de TiO_2 . Además de estos resultados, una manera para confirmar si hay o no nanopartículas, es monitorear los productos de reacción por espectroscopia UV-Vis, donde se observan señales de absorción definidas, características para nanopartículas. Si las nanopartículas fueran metálicas, a este fenómeno se le conoce como plasmón de superficie y es consecuencia de que sus electrones al estar deslocalizados absorben la energía que se le suministra por medio de la luz [56,64]. Sin embargo, en los semiconductores, como el TiO_2 , esto no sucede así, la energía suministrada por el haz de luz UV es absorbida por el semiconductor para realizar el brinco electrónico de la banda de valencia a la banda de conducción, es así que mediante UV-Vis se puede determinar la energía necesaria para que se realice ese salto electrónico [35,66].

8.4.1 Caracterización por espectroscopia UV-Vis para los extractos de las fracciones y los productos de reacción.

Los espectros de absorción de UV-Vis obtenidos para los productos de reacción de las diferentes fracciones y del extracto crudo muestran lo siguiente: en la Figura 28 correspondiente a la fracción de CHCl_3 , se observan cambios muy marcados entre A0 y A1.

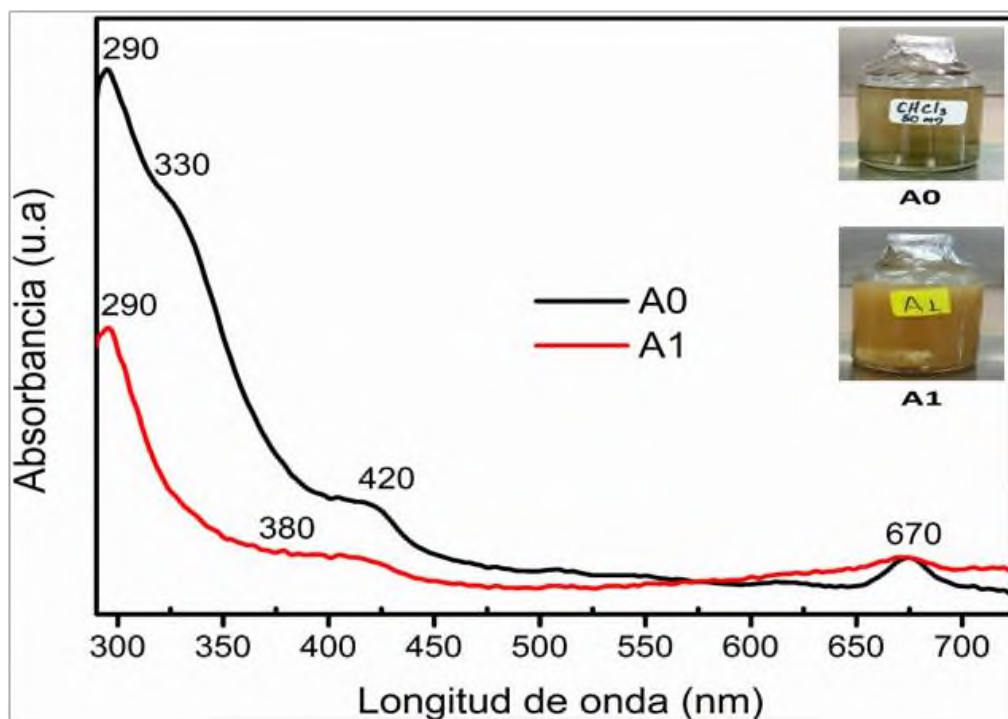


Figura 28. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción de CHCl_3 .

En A0 se observan múltiples absorciones con varias longitudes de ondas máximas dentro de las cuales destacan la de 670 nm correspondiente a la clorofila, la de 420 nm es atribuida a los carotenoides, y las absorciones en 330 y 290 nm atribuidas posiblemente a los flavonoides y fenoles. Sin embargo, en A1 estas longitudes disminuyen, probablemente se deba a que los metabolitos que provocaban estas absorciones hayan reaccionado y convertido al precursor en TiO_2 y se refleja con una absorción mínima en A1 cerca de 380 nm, misma que se le asocia a la transferencia de carga entre el $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Ti}^{4+}$ correspondiente a la excitación electrónica de la banda de valencia a la banda de conducción [60,64,66,67].

En la Figura 29, se muestra el espectro de UV-vis correspondiente a la fracción de AcOEt, se observa en B0 una absorbancia máxima en 324 nm. Sin embargo, al compararlo con B1, este presenta absorbancia en 512 nm, el cual está en el rango de la luz visible. De acuerdo a un reporte previo, esto puede deberse al complejo formado

entre los metabolitos presentes y el TiO_2 , provocando que la absorbancia normal de 300 a 380 nm en UV para el TiO_2 se recorra hacia la luz visible [66].

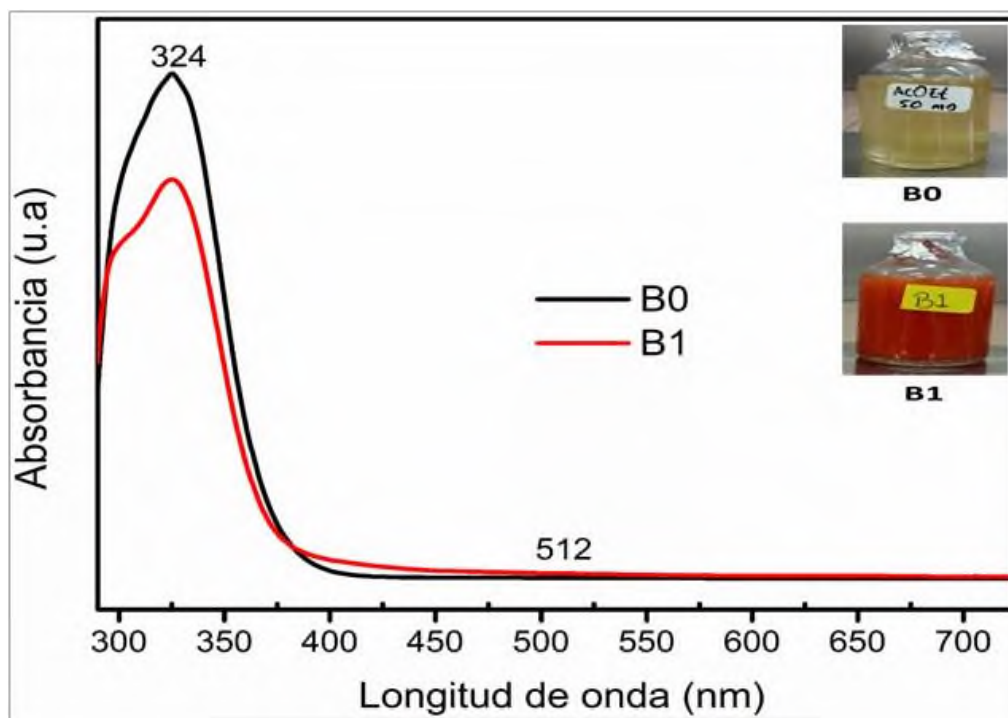


Figura 29. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción de AcOEt.

En la Figura 30 se muestra el espectro de UV-vis correspondiente a la fracción de *n*-BuOH, se observa en C0 una absorbancia máxima en 324 nm, con un pequeño hombro en 330 nm aproximadamente, al compararlo con C1 no se observan cambios interesantes, solo una pequeña disminución en las bandas antes mencionadas. Sin embargo, no se puede garantizar la ausencia de nanopartículas de TiO_2 debido al solapamiento que tienen las absorbancias de los metabolitos presentes en el extracto con la energía de transición electrónica entre la banda de valencia y la banda de conducción del TiO_2 .

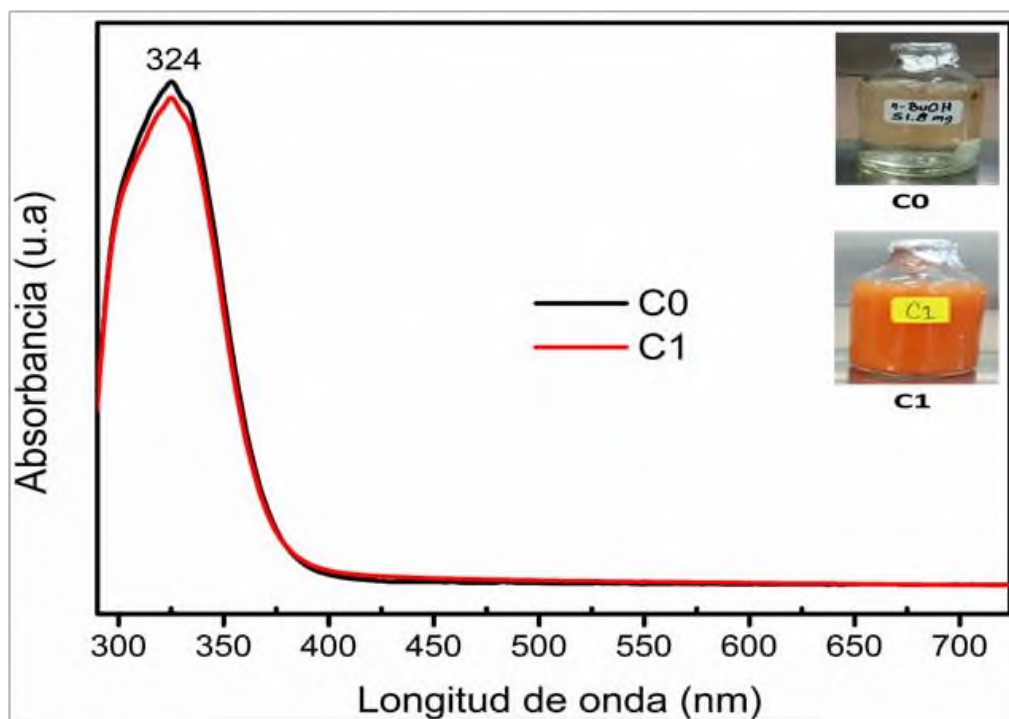


Figura 30. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción de *n*-BuOH.

El espectro de UV-vis correspondiente a la fracción de acuosa residual se muestra en la Figura 31, se observa en D0 una absorbancia máxima en 324 nm y un hombro en 310 nm aproximadamente, y cuando se compara con D1, éste presenta una disminución de las absorbancias en 310 y 324 nm. De la misma manera, presenta una absorbancia en 650 nm y puede ser atribuida al complejo que se ha formado entre el TiO_2 y los metabolitos presentes después de la reacción [66].

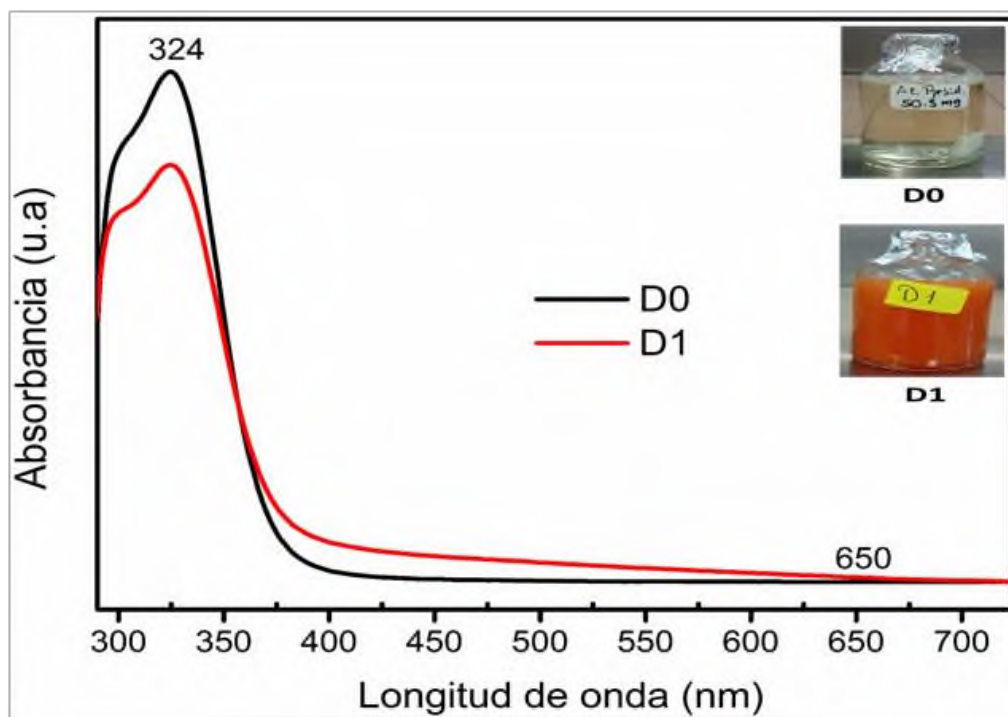


Figura 31. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción de la fracción acuosa residual.

El espectro correspondiente al extracto crudo se observa en la Figura 32, se observa el mismo patrón de la fracción *n*-BuOH (Figura 30) y de la misma manera, no se puede garantizar la ausencia de nanopartículas de TiO_2 por el solapamiento en las absorbancias entre los metabolitos y la energía de transición electrónica entre banda de valencia y banda de conducción del TiO_2 .

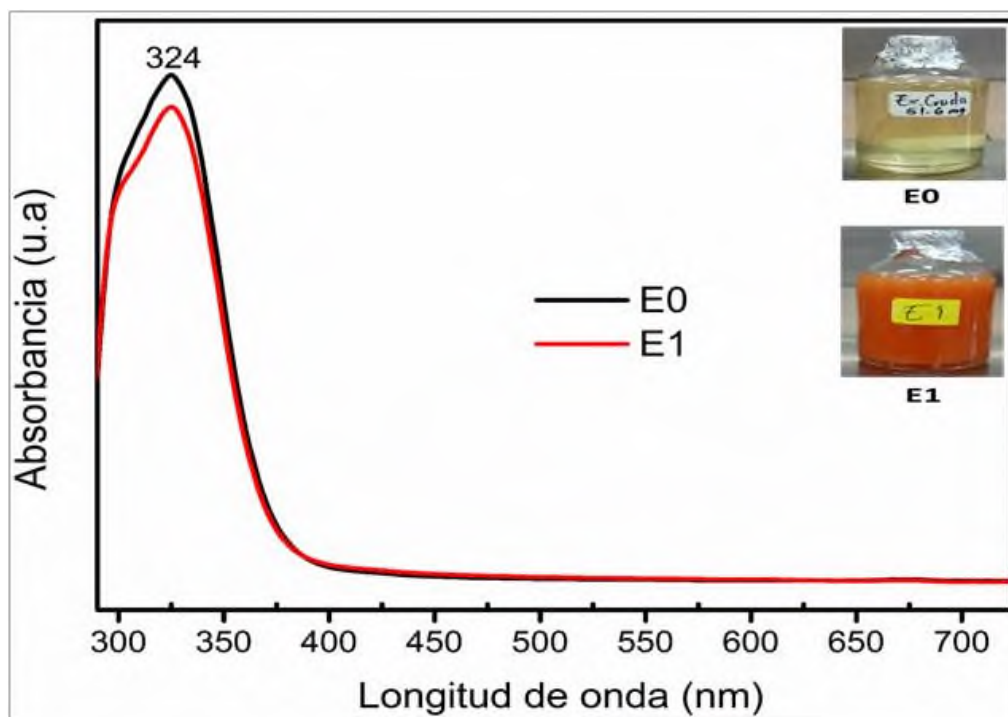


Figura 32. Espectro UV-Vis del extracto y producto de reacción del extracto crudo.

Después de haber realizado las pruebas de espectroscopia UV-Vis, se procedió a eliminar el agua en los productos de reacción mediante dos métodos distintos, el primero, a 60 °C durante 12 h y el segundo a 110 °C por 5 h, para posteriormente caracterizarlos.

8.4.2 Caracterización por FTIR de los productos de reacción.

En la Figura 33 se muestran los espectros de infrarrojo del precursor tetrabutoxido de titanio (BuOTi), de la fracción CHCl_3 (A0), del producto de reacción con CHCl_3 secado a 60 °C (A1-60), del producto de reacción con CHCl_3 secado a 110 °C (A1-110), y del dióxido de titanio comercial (TiO_2com).

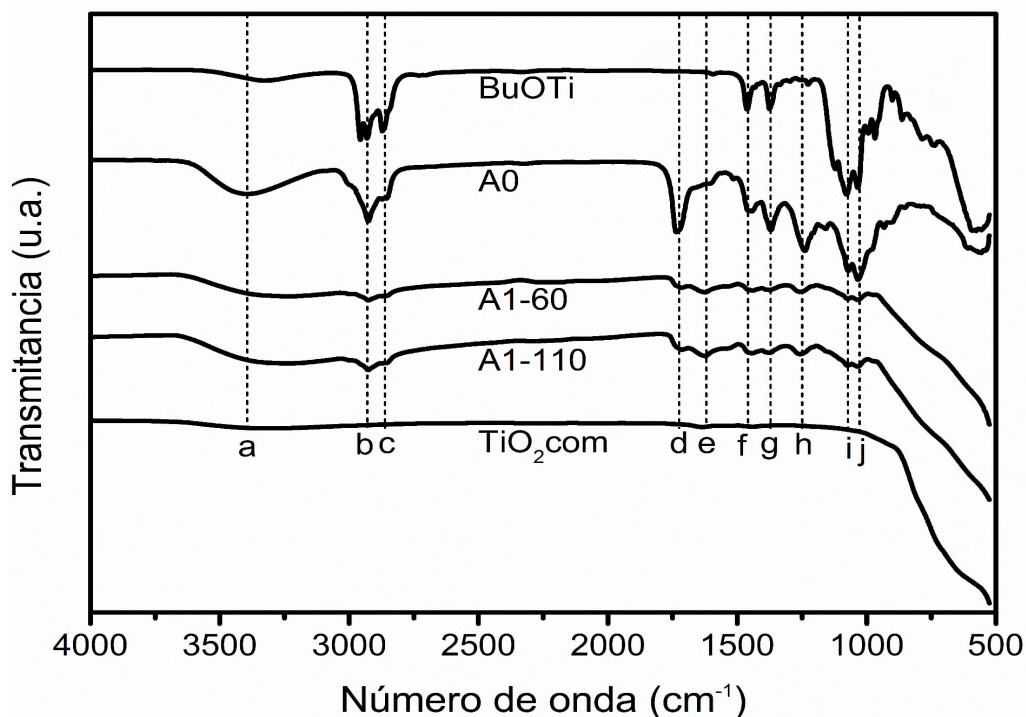


Figura 33. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción CHCl₃ (A0), producto de reacción con CHCl₃ secado a 60 °C (A1-60), producto de reacción con CHCl₃ secado a 110 °C (A1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO₂.com).

Al comparar todos los espectros es muy evidente que todas las bandas correspondientes a A0 disminuyen en el producto de reacción secado a 60 y 110 °C. Esto se debe probablemente a la degradación o transformación de los metabolitos durante la síntesis o en el proceso de secado. De la misma manera, las bandas del precursor (BuOTi) desaparecen en los dos espectros de los productos de reacción secos. Esto puede ser indicativo de que el precursor reacciona con los metabolitos y como producto de reacción se obtiene TiO₂. Este razonamiento se comprueba al comparar con el espectro del TiO₂ comercial, donde los tres espectros A1-60, A1-110 y TiO₂.com muestran una caída muy pronunciada en 800 cm⁻¹, señal característica para el TiO₂ [63]. Este resultado hace suponer que la fracción del extracto obtenido con cloroformo es favorable para la formación de partículas de TiO₂. Las bandas de absorción del FTIR asignadas a los modos de vibración de los grupos funcionales se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en la fracción de CHCl_3

Banda	Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3320	O-H	Estiramiento
b	2932	R-CH ₂ -R	Estiramiento asimétrico
c	2860	R-CH ₃	Estiramiento simétrico
d	1733	C=O	Estiramiento
e	1600	C=C	Estiramiento (aromático)
f	1447	COO-H C-OH,	Estiramiento del hidroxilo en el ácido carboxílico
g	1370	R-N-H	Estiramiento
h	1258	=C-O-C O=COH	Estiramiento del carbonilo en el ácido carboxílico
i	1070	C-O-C	Estiramiento
j	1015	C=C-H	Relacionada con la vibración fuera del plano en alquenos

En la Figura 34 se muestran los espectros de infrarrojo del precursor (BuOTi), de la fracción AcOEt (B0), del producto de reacción con AcOEt secado a 60 °C (B1-60), del producto de reacción con AcOEt secado a 110 °C (B1-110), y del TiO_2com . Las bandas de absorción del FTIR asignadas a los modos de vibración de los grupos funcionales se describen en la Tabla 10. Como se puede observar en los espectros de los productos de reacción secados a 60 y 110 °C, la tendencia es la misma que con la fracción A0. Las bandas correspondientes al precursor (BuOTi) **b**, **c**, **g**, **h**, **k** y **l** desaparecen en los espectros de los productos de reacción B1-60 y B1-110. Las bandas de la fracción B0 disminuyen en relación con B1-60 y B1-110, lo cual puede ser indicativo de que los metabolitos con grupos funcionales como OH, C=O, C=C y COOH reaccionan durante el proceso de síntesis y la banda asignada como **m**, la cual es relacionada con los movimientos de vibración fuera del plano de anillos aromáticos desaparece. Cuando se compara B1-60 y B1-110 con TiO_2com se puede observar una caída pronunciada en 800 cm^{-1} en los tres espectros. Con estos datos, se infiere que la familia de metabolitos presentes en la fracción AcEOt también favorece la formación de partículas de TiO_2 .

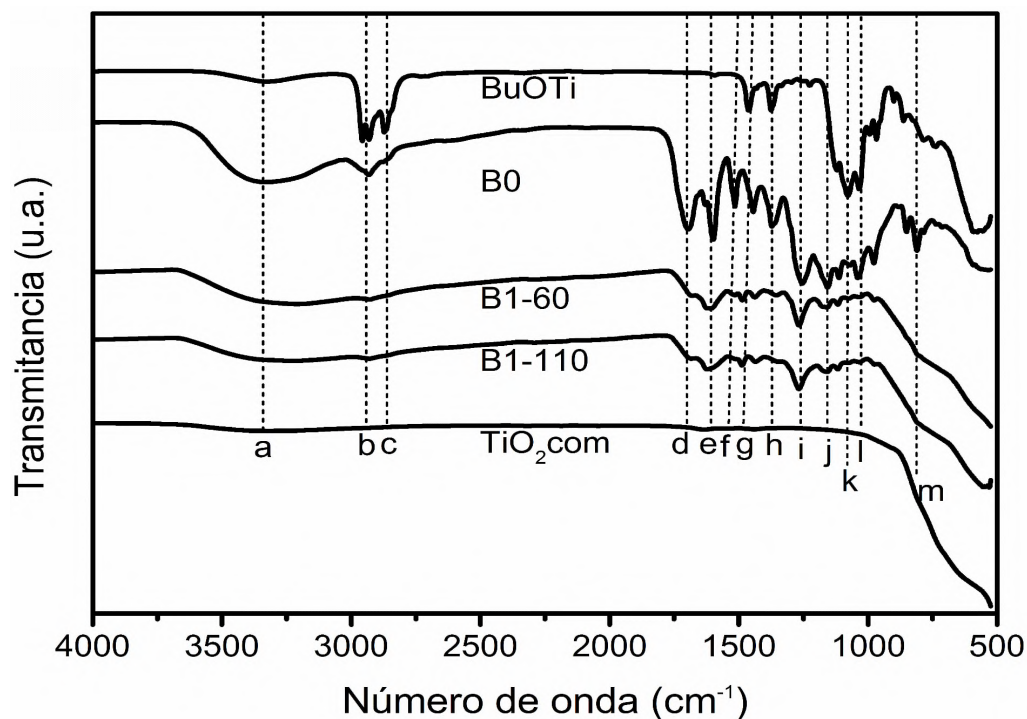


Figura 34. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción AcOEt (B0), producto de reacción con AcOEt secado a 60 °C (B1-60), producto de reacción con AcOEt secado a 110 °C (B1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO₂com).

Tabla 10. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en la fracción de AcOEt.

Banda	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3320	O-H	Estiramiento
b	2932	R-CH ₂ -R	Estiramiento asimétrico
c	2860	R-CH ₃	Estiramiento simétrico
d	1710	C=O	Estiramiento
e	1600	C=C	Estiramiento (aromático)
f	1520	C=C	Estiramiento (aromático)
g	1447	COO-H C-OH	Estiramiento del hidroxilo en el ácido carboxílico
h	1370	R-N-H	Estiramiento
i	1258	=C-O-C O=COH	Estiramiento del carbonilo en el ácido carboxílico
j	1150	R-OH	Estiramiento (terciario)
k	1070	C-O-C	Estiramiento
l	1015	C=C-H	Relacionadas con la vibración fuera del plano en alquenos
m	815	C=C-H	Relacionadas con la vibración fuera del plano del anillo aromático

En la Figura 35 se muestran los espectros de infrarrojo del precursor (BuOTi), de la fracción de *n*-BuOH (C0), del producto de reacción con *n*-BuOH secado a 60 °C (C1-60), del producto de reacción con *n*-BuOH secado a 110 °C (C1-110) y de TiO₂com. Las bandas de absorción del FTIR asignadas a los modos de vibración de los grupos funcionales de esta fracción se describen en la Tabla 11. Se puede observar que las bandas del precursor (BuOTi) permanecen con menor intensidad en C1-60 y C1-110. De la misma manera, las bandas asociadas a la fracción C0 (**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **h** y **j**) permanecen con la misma intensidad en los productos de reacción secados a 60 y 110 °C. Al comparar los espectros de los productos de reacción con el del TiO₂com se puede apreciar que no hay semejanza entre ellos. Esto implica que los metabolitos presentes en esta fracción no son favorables para la síntesis de TiO₂.

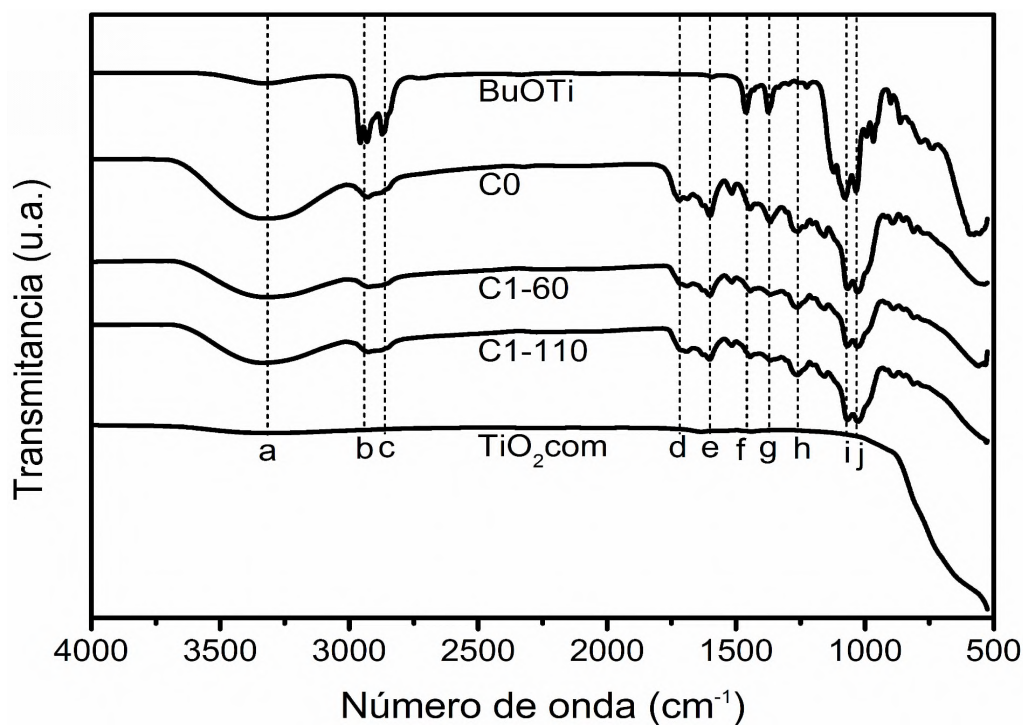


Figura 35. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción *n*-BuOH (C0), producto de reacción con *n*-BuOH secado a 60 °C (C1-60), producto de reacción con *n*-BuOH secado a 110 °C (C1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO₂com).

Tabla 11. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales de los metabolitos presentes en la fracción *n*-BuOH.

Banda	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3320	O-H	Estiramiento
b	2932	R-CH ₂ -R	Estiramiento asimétrico
c	2860	R-CH ₃	Estiramiento asimétrico
d	1710	C=O	Estiramiento
e	1600	C=C	Estiramiento (aromático)
f	1447	COO-H C-OH	Estiramiento del hidroxilo en el ácido carboxílico
g	1370	R-N-H	Estiramiento
h	1258	=C-O-C	
i	1070	O=COH C-O-C	Estiramiento del carbonilo en ácido carboxílico Estiramiento
j	1015	C=C-H	Relacionados con la vibración fuera del plano en alquenos

En la Figura 36 muestran los espectros de infrarrojo del precursor (BuOTi), de la fracción acuosa residual (D0), del producto de reacción con la fracción acuosa residual secado a 60 °C (D1-60), del producto de reacción con la fracción acuosa residual secado a 110 °C (D1-110) y del TiO₂com. Las bandas de absorción del FTIR asignadas a los modos de vibración de los grupos funcionales de esta fracción también se describen en la Tabla 11. Se puede observar que las bandas del precursor (BuOTi) (**b**, **c**, **f**, **g**, **i** y **j**) desaparecen en D1-60. Sin embargo, en el producto de reacción secado a 110 °C las bandas **i** y **j** permanecen con menor intensidad, sucede lo mismo cuando se compara el espectro de la fracción D0, con los espectros D1-60 y D1-110. En el primer caso cuando D0 se compara con D1-60, se observa que las bandas **b**, **c**, **d**, **g**, **i** y **j** desaparecen en el producto, estas bandas corresponden, de acuerdo a la Tabla 11, a los grupos funcionales R-CH₂-R, R-CH₃, C=O, R-NH, C-O-C y C=C. Cuando D0 se compara con D1-110, sucede algo interesante, las bandas **i** y **j** siguen apareciendo. Este comportamiento se puede explicar considerando una posible degradación de los metabolitos por los tiempos de secado de los productos de reacción a una relativa baja temperatura (60 °C por un periodo de 12 h). Contrariamente, el secado a 110 °C fue por un periodo de 5 h. No obstante, cuando ambos productos secados se comparan con TiO₂com, los espectros de los productos de reacción muestran una caída similar en 800 cm⁻¹ el cual es característico para el TiO₂. Por lo tanto, mediante estos datos

se puede suponer que los metabolitos presentes en esta fracción de acuosa residual, sí favorecen la síntesis de partículas de TiO_2 .

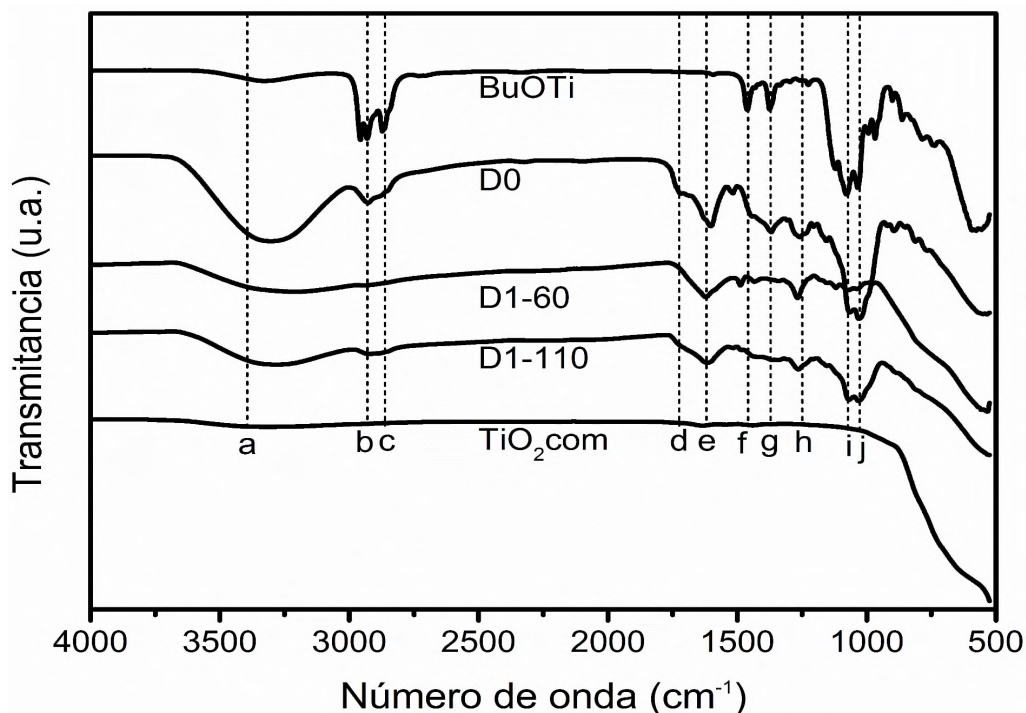


Figura 36. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), fracción acuosa residual (D0), producto de reacción con acuosa residual secado a 60 °C (D1-60), producto de reacción con acuosa residual secado a 110 °C (D1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO_2com).

En la Figura 37 se muestran los espectros del precursor (BuOTi), del extracto crudo (E0), del producto de reacción con extracto crudo secado a 60 °C (E1-60), del producto de reacción con extracto crudo secado a 110 °C (E1-110), y del TiO_2com . Las bandas de absorción del FTIR asignadas a los modos de vibración de los grupos funcionales de estos espectros se describen también en la Tabla 11. Se observa que la tendencia es igual a la que presentan las bandas de los espectros en la fracción acuosa residual, en donde el espectro de la fracción E1-60 no tiene las bandas del precursor, pero sí las bandas **e** y **h** del extracto crudo. Por otro lado, E1-110 muestra la mayoría de las bandas de E0, pero con menor intensidad, al igual que en D1-110 las bandas **i** y **j** se observan con mucha claridad. Esto puede ser debido al efecto que tuvo el tiempo en el proceso de secado. Cuando se comparan con TiO_2com se observa que E1-60 tiene mayor semejanza con este espectro que E1-110, ya que la caída en 800 cm^{-1} es más pronunciada en E1-60 que en E1-110. Esto hace suponer que el efecto del secado a

60 °C por 12 h favorece la degradación de los metabolitos y hace que en el espectro se aprecie mejor la caída en 800cm^{-1} correspondiente a partículas de TiO_2 .

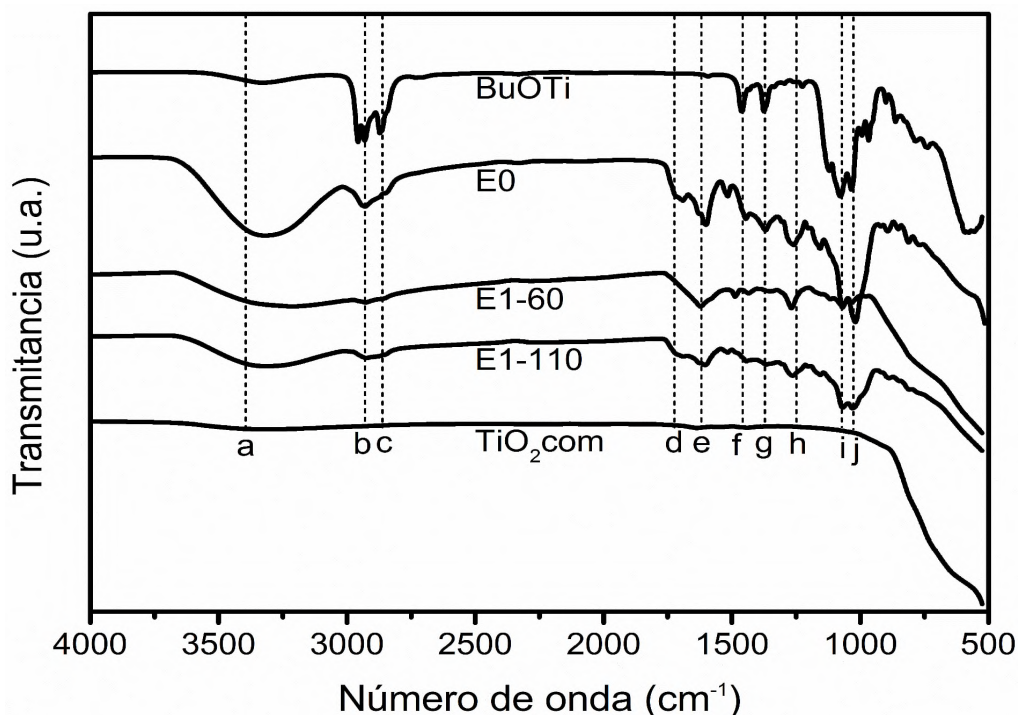


Figura 37. Espectro FTIR del precursor (BuOTi), extracto crudo (E0), producto de reacción con extracto crudo secado a 60 °C (E1-60), producto de reacción de con extracto crudo secado a 110 °C (D1-110), y dióxido de titanio comercial (TiO_2com).

Para corroborar los comportamientos mostrados en los espectros por FTIR, los productos de reacción secos fueron caracterizados por difracción de rayos X.

8.4.3 Caracterización por DRX de los productos de reacción

En la Figura 38 se muestran los difractogramas obtenidos por DRX de los productos de reacción con CHCl_3 secados a 60 y 110°C, A1-60 y A1-110 respectivamente. Se observa que el producto de reacción secado a 60°C (A1-60) muestra un patrón de difracción totalmente amorfo. Sin embargo, el producto de reacción secado a 110 °C (A1-110) muestra picos de difracción en $2\theta = 25, 37, 48, 55$ y 62 , los cuales son propios del TiO_2 en fase anatasa [36,67,68]. Estos datos son interesantes debido a que la temperatura fue un factor clave para la cristalización de las partículas de TiO_2 .

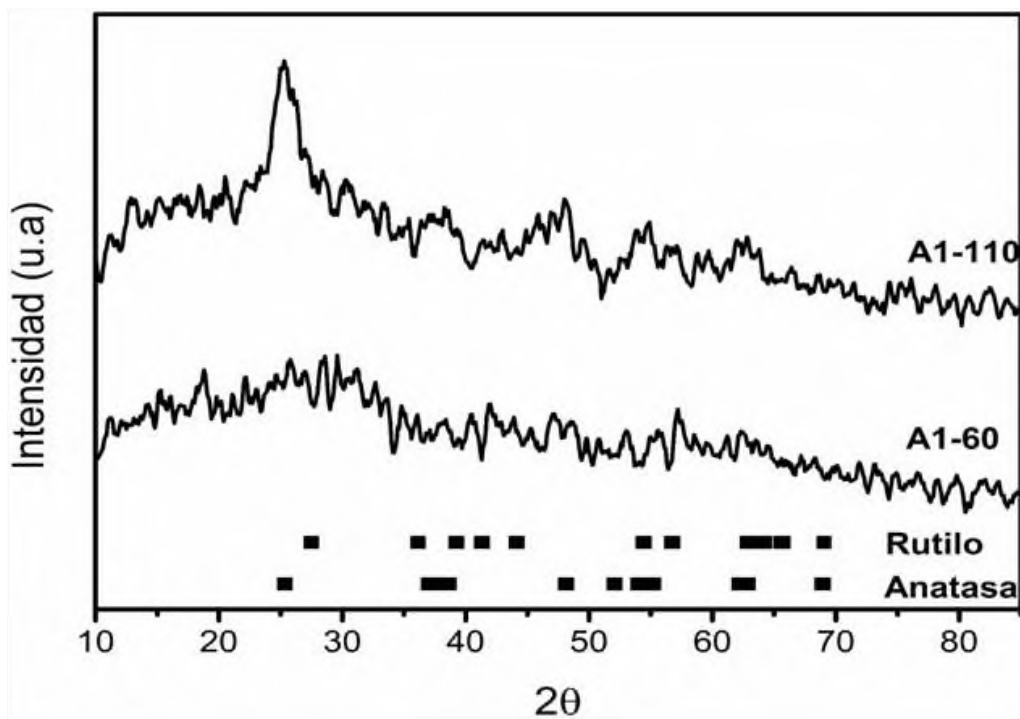


Figura 38. DRX de los productos de reacción con CHCl_3 , secados a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (A1-60) y secados a $110\text{ }^\circ\text{C}$ (A1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas de TiO_2 rutilo y anatasa.

En la figura 39 se muestran los difractogramas de los productos de reacción con la fracción de AcOEt secados a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y a $110\text{ }^\circ\text{C}$, B1-60 y B1-110 respectivamente. En ambos casos se observan difractogramas amorfos. Esto indica que, aunque hubiera formación de partículas de TiO_2 como se indica en la Figura 34, correspondiente al análisis por FTIR, no hay un arreglo cristalino definido, o posiblemente los metabolitos aun presentes estén provocando un efecto de apantallamiento, impidiendo que se puedan apreciar los patrones de difracción del TiO_2 .

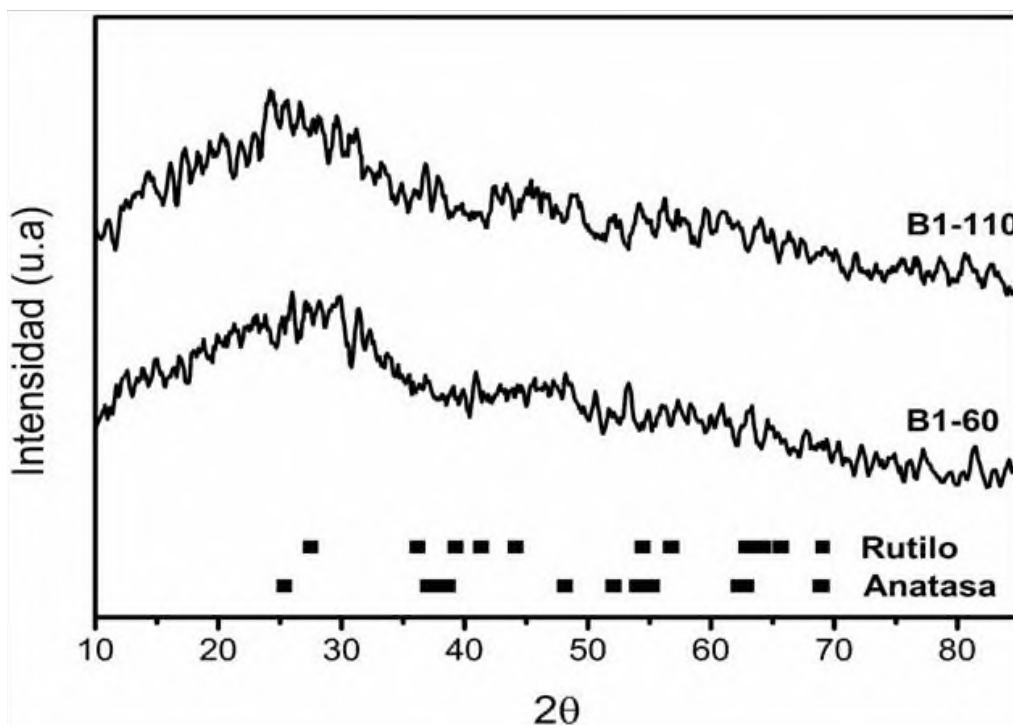


Figura 39. DRX de los productos de reacción con la fracción de AcOEt, secados a 60 °C (B1-60) y secados a 110 °C (B1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas del TiO₂ rutilo y anatasa.

En la Figura 40 se muestran los difractogramas de los productos de reacción con la fracción de *n*-BuOH secados a 60 °C y 110 °C, C1-60 y C1-110 respectivamente. Se observa que ambos difractogramas no presentan patrones de difracción de ninguna de las fases cristalinas del TiO₂, esta información se respalda con el análisis por FTIR presentados en la Figura 35, en el cual se observa que los metabolitos no sufrieron cambio alguno durante la reacción, y no hay señales que identifiquen la presencia de TiO₂. Con esta información se infiere que los metabolitos presentes la fracción de *n*-BuOH no son eficientes para la síntesis de partículas de TiO₂.

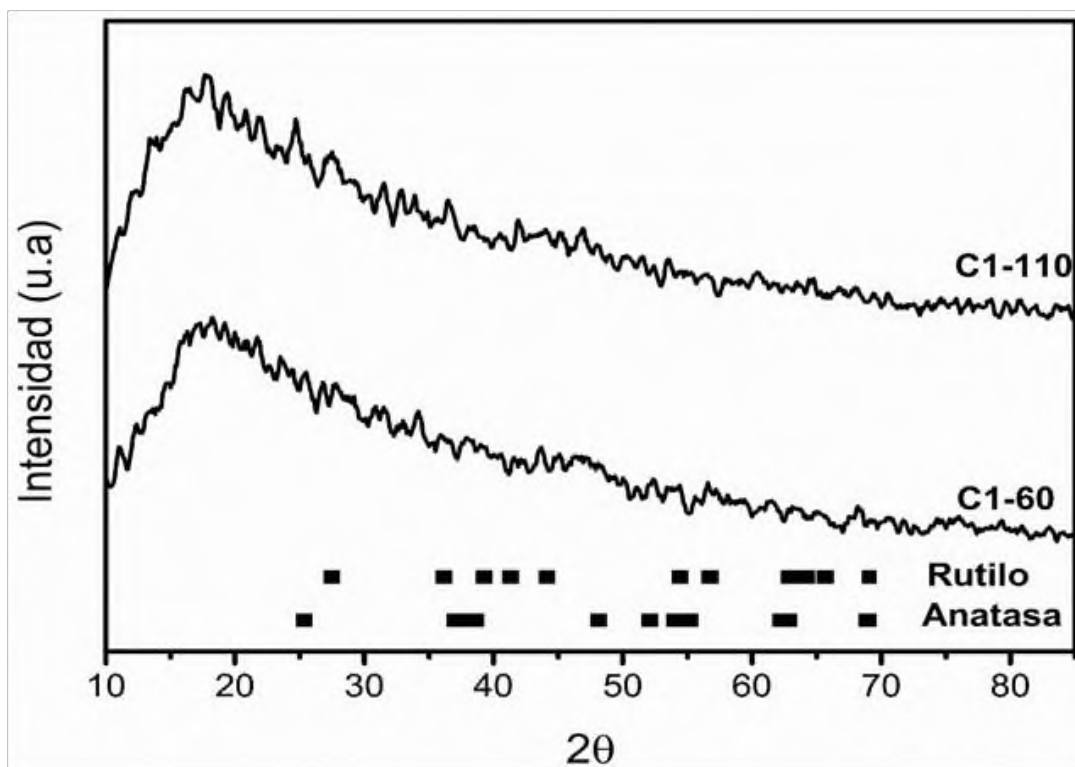


Figura 40. DRX de los productos de reacción con *n*-BuOH, secados a 60 °C (B1-60) y secados a 110 °C (B1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas del TiO₂ rutilo y anatasa.

En la Figura 41 se muestran los difractogramas de los productos de reacción utilizando la fracción acuosa residual y secados a 60 °C y 110°C, D1-60 y D1-110 respectivamente. No se observa la fase cristalina del TiO₂ en el difractograma de D1-60. Sin embargo, en D1-110 se muestran patrones de difracción bien definidos en valores de $2\theta = 27.8, 41$ y 67 . Estas señales son características para el TiO₂ en fase rutilo [21,69]. Por lo tanto, se infiere que, en la fracción acuosa residual, los metabolitos o familia de metabolitos presentes favorecen la síntesis de partículas de TiO₂ en fase rutilo.

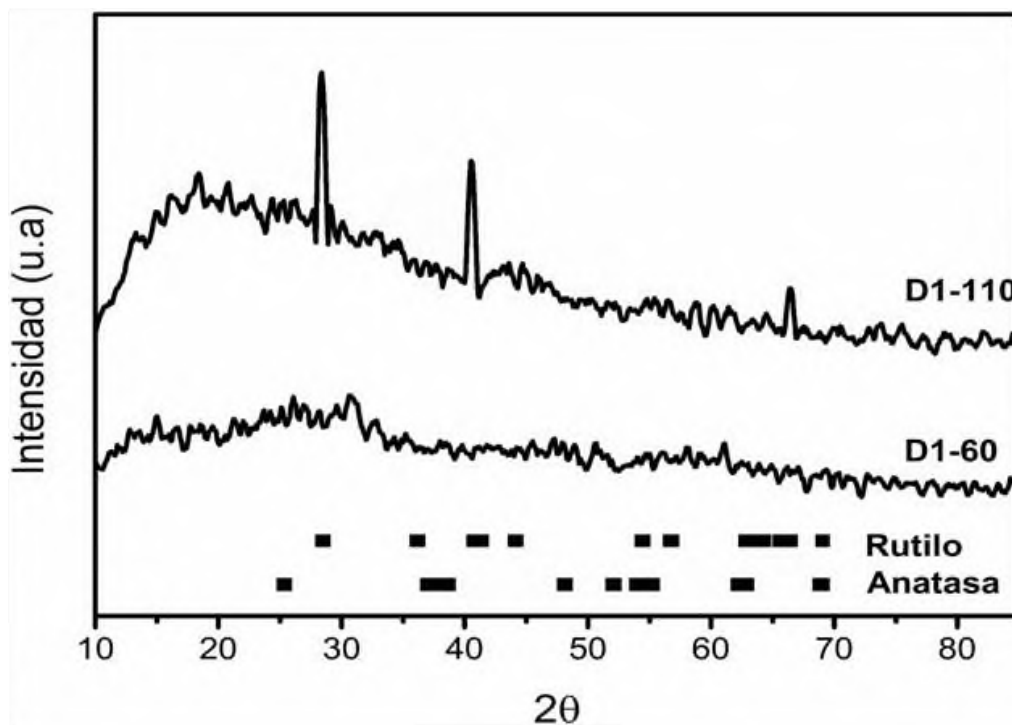


Figura 41. DRX de los productos de reacción con acuosa residual, secados a 60 °C (B1-60) y secados a 110 °C (B1-110) y posiciones de Bragg para las fases cristalinas rutilo y anatasa del TiO₂.

Por último, en la Figura 42 se muestran los difractogramas de los productos de reacción secados a 60 y 110 °C, E1-60 y E1-110 respectivamente utilizando el extracto crudo. Se observa que los difractogramas no presentan patrones de difracción característicos para alguna de las fases cristalinas del TiO₂, lo cual significa que las partículas de TiO₂, si es que existen en esta fracción, no presentan un arreglo cristalino, o probablemente los metabolitos presentes impiden que se puedan observar los picos de difracción.

Analizando todos los difractogramas, se infiere que los metabolitos o familia de metabolitos que se obtuvieron en cada una de las fracciones juegan un papel importante en la selectividad de las fases cristalinas. Es así como los metabolitos medianamente polares que se obtuvieron con la fracción de CHCl₃ sintetizan partículas de TiO₂ en fase anatasa y los polares que se obtuvieron con la fracción acuosa residual sintetizan partículas de TiO₂ en fase rutilo. Es importante señalar que los productos de

reacción no se sometieron a procesos de calcinación y su obtención fue a 50 °C durante la síntesis y a 110°C durante el proceso de secado.

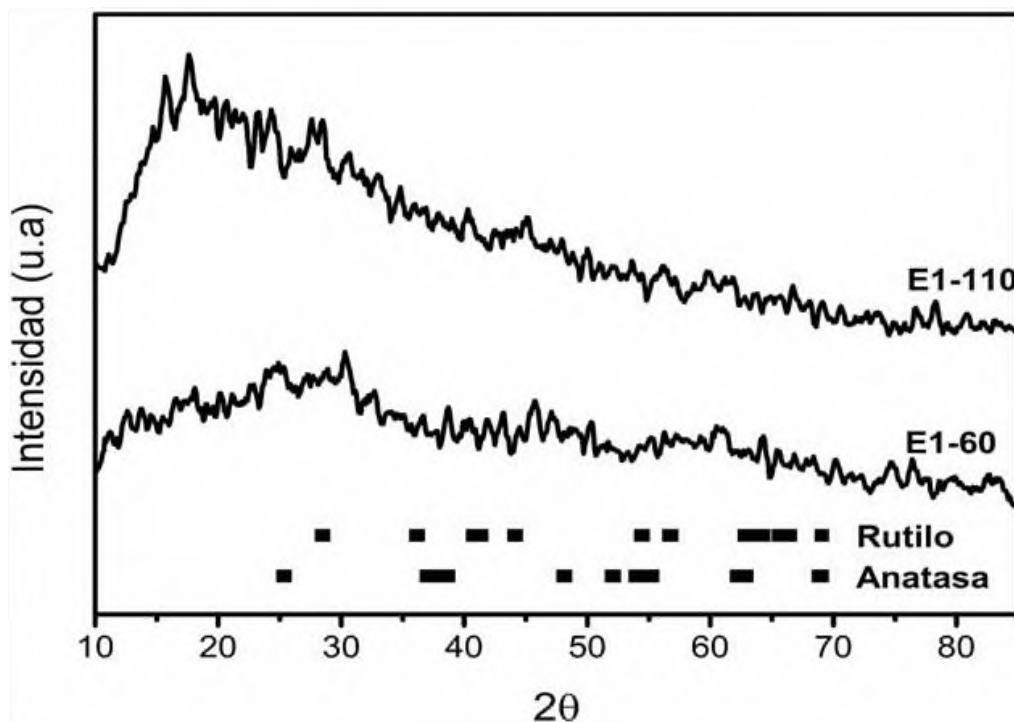


Figura 42. DRX de los productos de reacción con CHCl_3 , secados a 60 °C (A1-60) y secados a 110 °C (A1-110)

8.4.4 Caracterización por TGA a los productos de reacción

La Figura 43 muestra el termograma del producto de reacción con CHCl_3 secado a 110 °C (A1-110). Se observan cuatro temperaturas de degradación. En la primera menor a 100 °C se degrada el 8% de la masa total y se le atribuye a la pérdida de humedad. En las tres temperaturas siguientes se pierden 28% de masa, lo cual puede ser atribuido a los metabolitos que quedan en el producto de reacción después del secado. Finalmente, queda una masa residual de 64% correspondiente a las cenizas orgánicas y posiblemente a las partículas de TiO_2 .

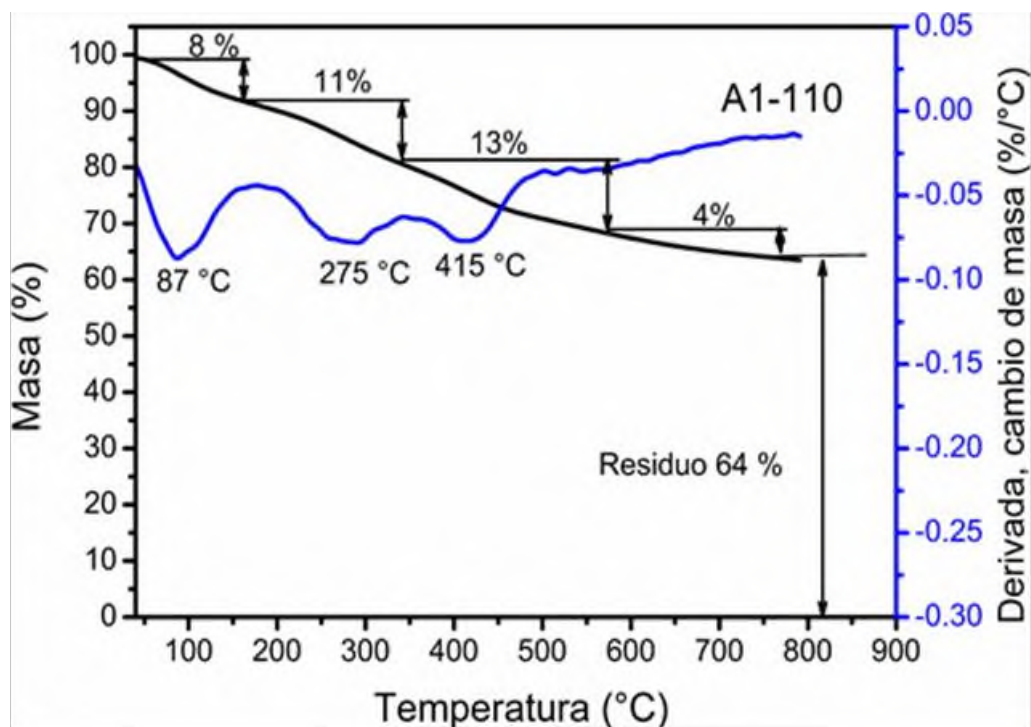


Figura 43. Termograma del producto de reacción de la fracción de CHCl_3 .

En la Figura 44 se muestra el termograma del producto de reacción con la fracción de AcOEt secado a 110 °C (B1-110). En el termograma se observa la misma tendencia, una temperatura de degradación máxima antes de los 100 °C, la cual se atribuye a la pérdida de humedad y dos temperaturas posteriores en 258 y 432 °C, en las cuales se pierde el 18% de la masa total, atribuidas a metabolitos termorresistentes, quedando una masa residual del 70%, atribuida a las cenizas y partículas de TiO_2 .

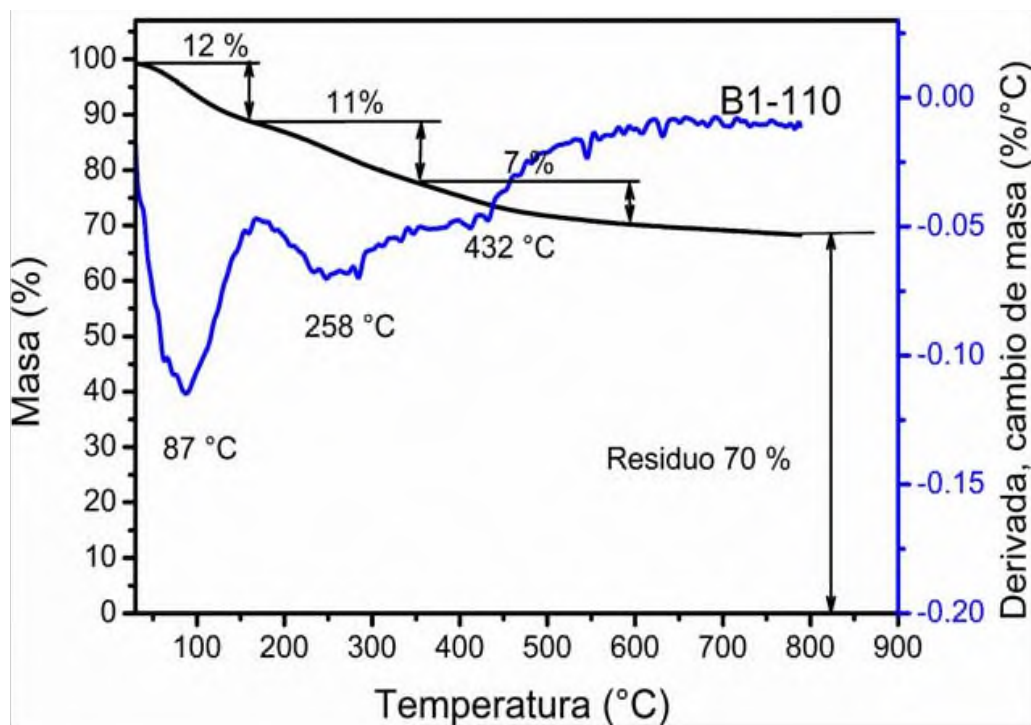


Figura 44. Termograma del producto de reacción de la fracción de AcOEt.

En la Figura 45 se muestra el termograma de los productos de reacción con la fracción de *n*-BuOH secado a 110 °C (C1-110) en él se observa que aún se encuentran metabolitos que se degradan con temperaturas superiores a los 200 °C los cuales suman una masa total cerca del 50%, sin contar el 7% de humedad que se pierde a temperaturas menores a 100 °C, para quedar al final con una masa residual del 40%. Cabe señalar que los metabolitos de esta fracción no provocaron efecto en la formación de alguna fase cristalina para el TiO₂.

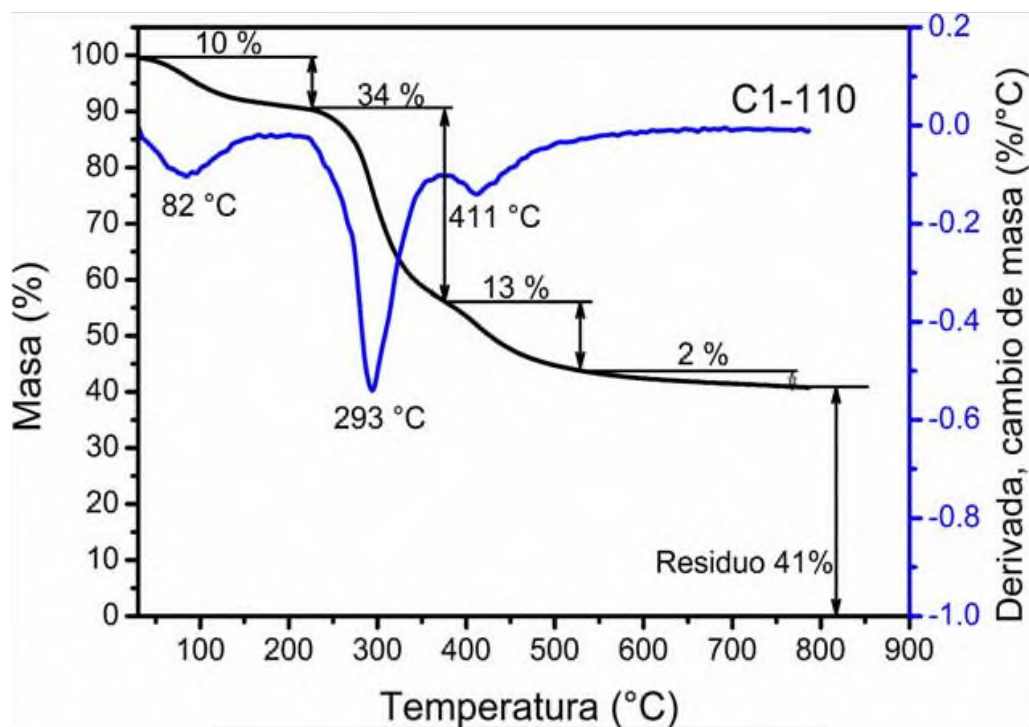


Figura 45. Termograma del producto de reacción de la fracción de *n*-BuOH.

En la Figura 46 y Figura 47 se muestran los termogramas para los productos de reacción con acuosa residual (D1-110) y extracto crudo (E1-110), en ambos casos se observan tres temperaturas de degradación idénticas a 90, 286 y 463 °C, las cuales pueden ser atribuidas al agua contenida en los productos de reacción y a metabolitos resistentes como los glucósidos de esteviol. A pesar de tener termogramas de pérdida de masa similares, mediante DRX se comprobó la presencia de TiO_2 en fase rutilo en los productos de reacción usando el extracto de acuosa residual. Contrariamente, con el extracto crudo no se observó ni una fase cristalina del TiO_2 . Esto implica que es difícil asegurar la formación de partículas de TiO_2 con el análisis termogravimétrico y que la difracción de rayos X solo confirma las fases cristalinas.

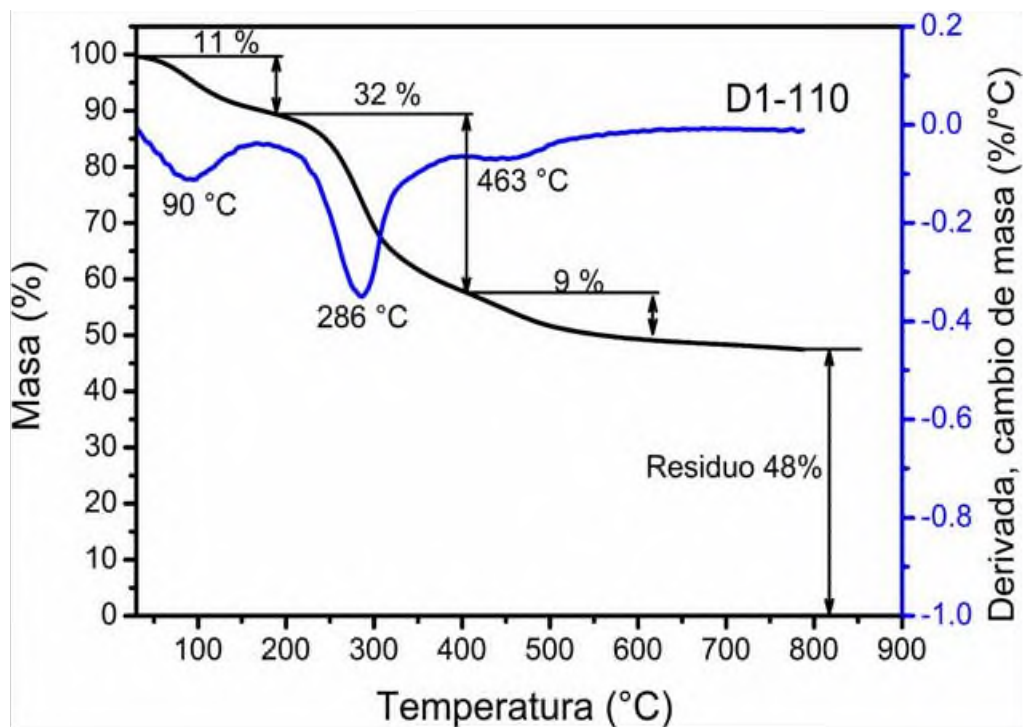


Figura 46. Termograma del producto de reacción de la fracción de acuosa residual.

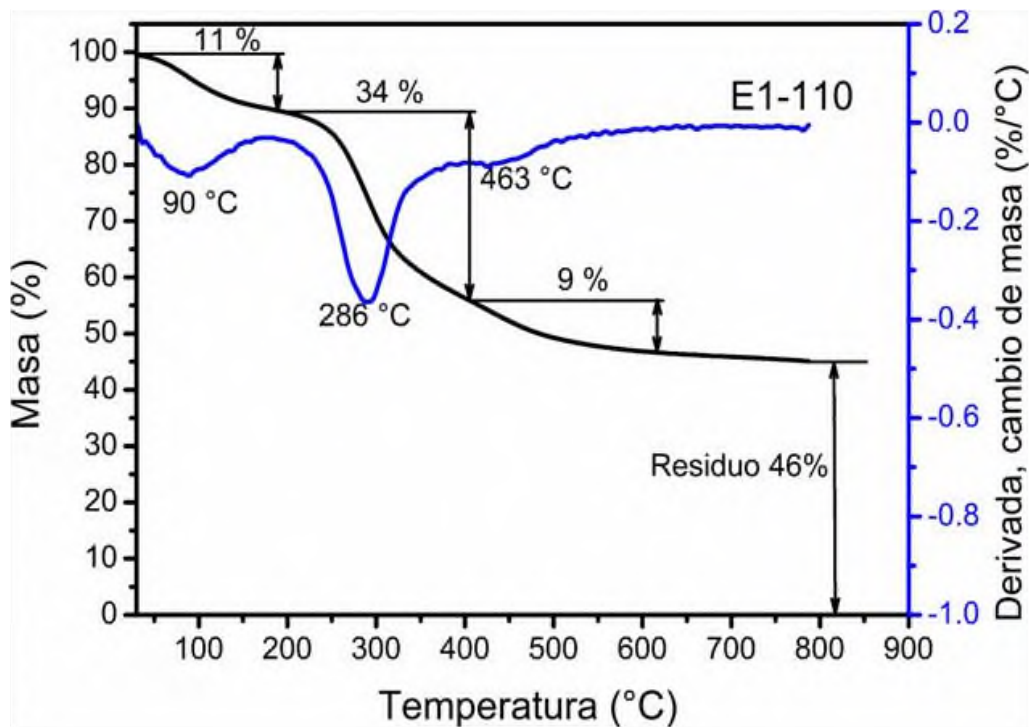


Figura 47. Termograma del producto de reacción del extracto crudo.

8.4.5. Microscopía electrónica de barrido de los productos de reacción

Con la finalidad de observar el tamaño y la morfología de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas, se caracterizaron algunas muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Figura 48 se muestran a dos magnificaciones las nanopartículas sintetizadas con la fracción CHCl_3 y secadas a $110\text{ }^\circ\text{C}$ (A1-110). En la micrografía obtenida, es posible observar aglomerados con nanopartículas irregulares de tamaño promedio menor a 100 nm . Con esta técnica se confirma que usando la fracción de cloroformo es posible obtener nanopartículas de TiO_2 .

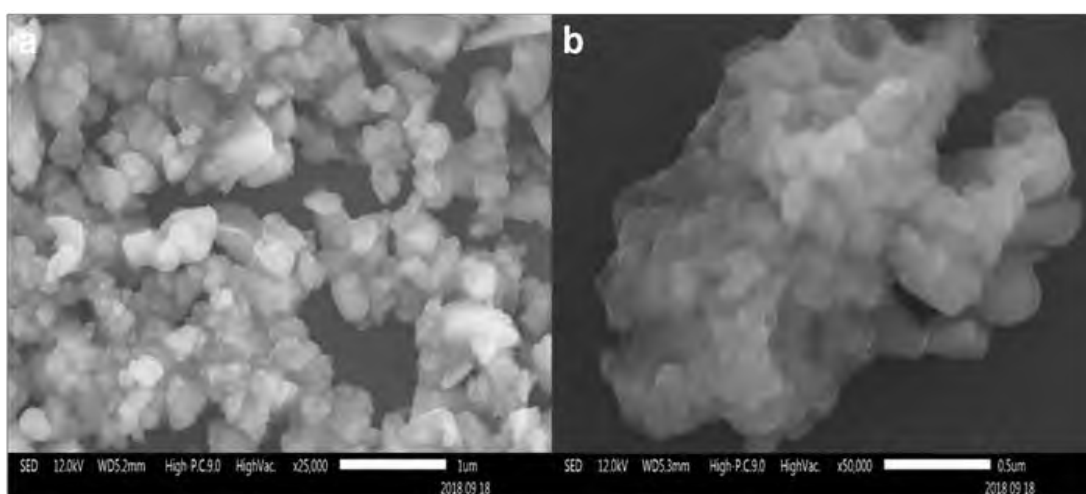


Figura 48. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con la fracción de CHCl_3 (A1-110).

En la Figura 49 se muestran las micrográficas de las nanopartículas sintetizadas con la fracción de AcOEt a $110\text{ }^\circ\text{C}$ (B1-110). También se observan aglomerados irregulares de diferentes tamaños, se considera que las nanopartículas están en el orden de 50 a 100 nm . Cabe señalar que mediante DRX no se observa un patrón de difracción definido para TiO_2 con este producto de reacción.

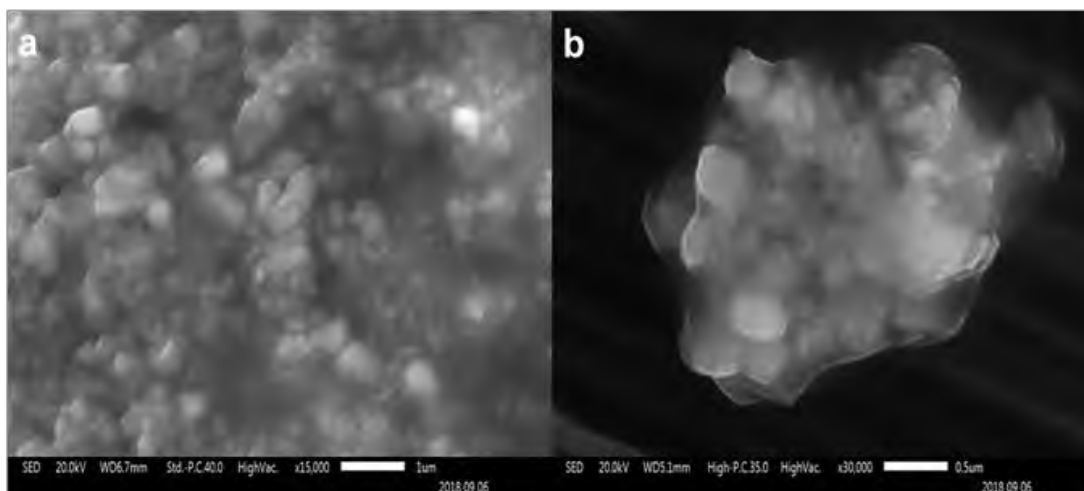


Figura 49. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con la fracción de AcOEt (B1-110).

En la Figura 50 se muestran las micrografías de las nanopartículas sintetizadas con la fracción acuosa residual (D1-110). A diferencia de los casos anteriores, se observa que las nanopartículas se aglomeran en forma de bloques no compactos, formando una especie de esponja de nanopartículas. De acuerdo a la Figura 50b, las nanopartículas que conforman el aglomerado tienden a ser esféricas con un tamaño alrededor de 100 nm.

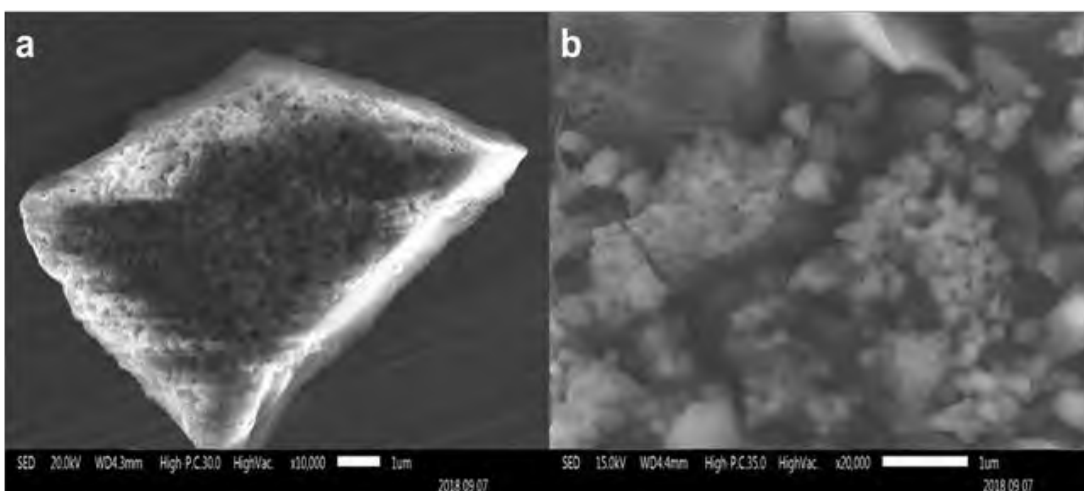


Figura 50. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con la fracción acuosa residual (D1-110).

8.4.6. Ensayo de toxicidad con las fracciones y productos de reacción

Para evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas se realizó la prueba MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Una curva de dosis respuesta fue elaborada con el programa GraphPad Prism 6.0 para cada una de las fracciones, en la Figura 51, se muestran las curvas de las fracciones de CHCl_3 (A0), AcOEt (B0), *n*-BuOH (C0) y acuosa residual (D0) sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

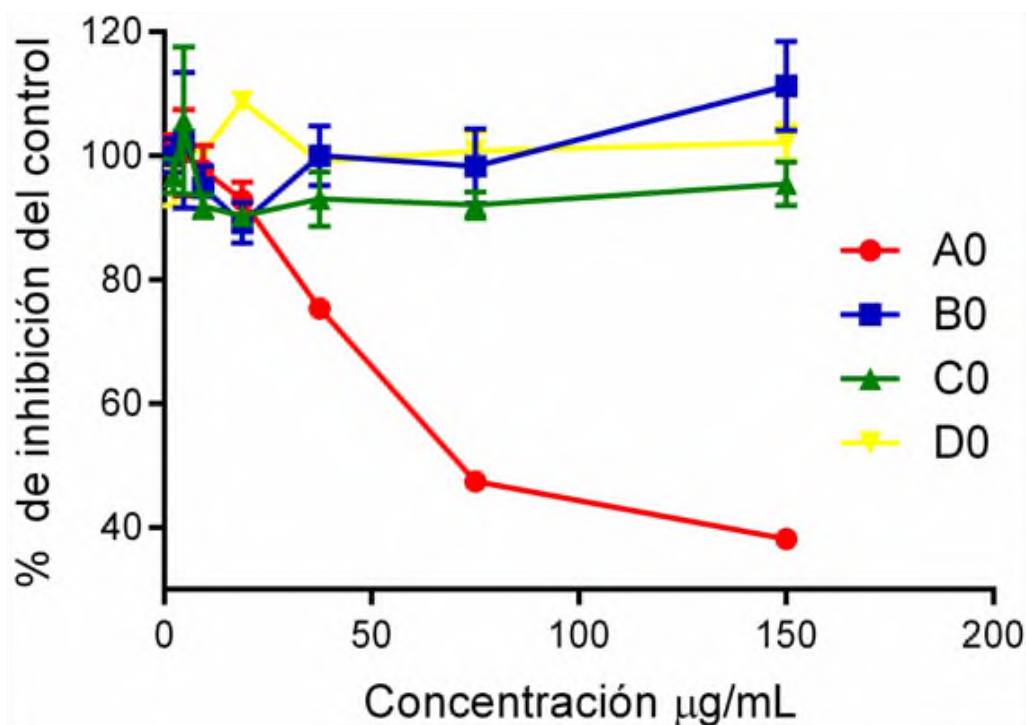


Figura 51. Ensayo de MTT de las fracciones de CHCl_3 (A0), AcOEt (B0), *n*-BuOH (C0) y acuosa residual (D0), sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, los datos son expresados como la media +/- SD.

Se observa que los metabolitos contenidos en las fracciones, B0, C0 y D0 no tienen efecto sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Sin embargo, los metabolitos medianamente polares contenidos en la fracción CHCl_3 (A0) sí tienen efecto antiproliferativo sobre esta línea celular. Se observa en la gráfica que se requieren 72 µg/mL de la fracción en estudio para inhibir el 50% de células cancerígenas y que con 150 µg/mL se inhibe el 63%.

En la Figura 52 se muestran las gráficas de los resultados con los productos de reacción secados a 110 °C de las fracciones CHCl_3 (A1-110), AcOEt (B1-110), *n*-BuOH (C1-110) y acuosa residual (D1-110). En la gráfica se observa que A1-110 muestra mayor actividad tóxica contra la línea celular MCF-7 ya que con 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ elimina el 30% de las células cancerígenas. Sin embargo, no se obtuvo el mismo comportamiento que cuando se utilizó la fracción del extracto con cloroformo sin secar (Figura 51). Esto implica que algunos metabolitos importantes para la destrucción de las células cancerígenas pueden haber sido degradados durante el secado.

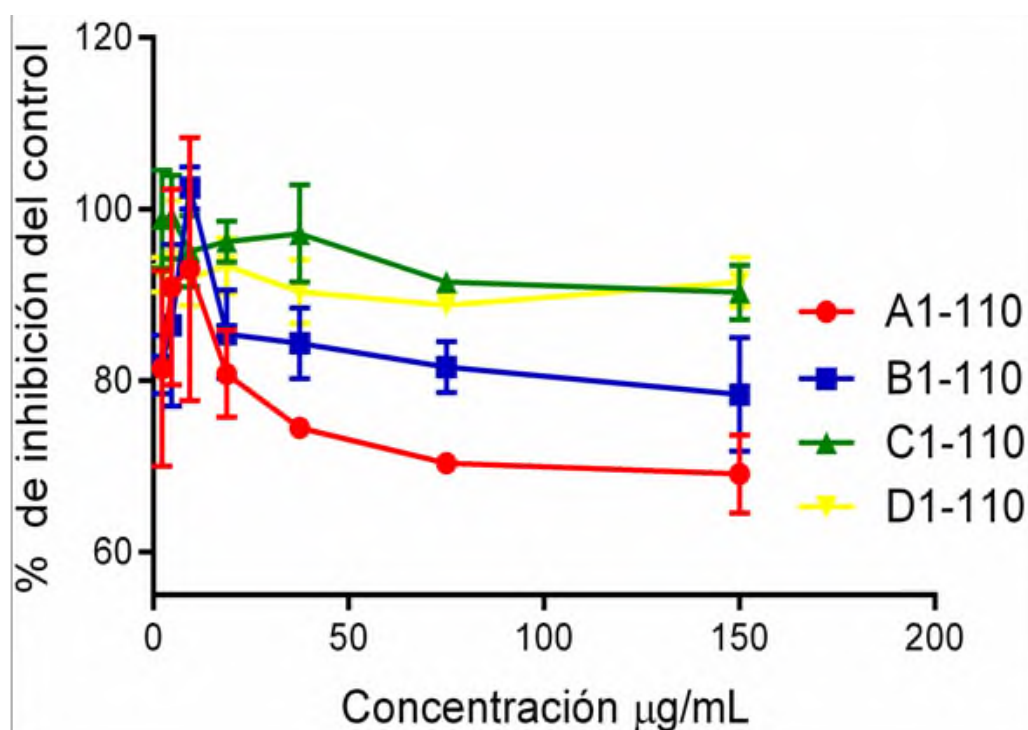


Figura 52. Ensayo de MTT de los productos de reacción secados a 110 °C de las fracciones CHCl_3 (A1-110), AcOEt (B1-110), *n*-BuOH (B1-110) y acuosa residual (D1-110), los datos son expresados como la media \pm SD.

En la Figura 53 se muestran las gráficas de la fracción A0 y A1-110, para comparar el efecto de las nanopartículas contenidas en los productos de reacción. Se observa que A0 tiene mayor actividad que A1-110. De acuerdo al termograma obtenido por TGA para el producto de reacción A1-110, solo el 36% del total son metabolitos y el resto cenizas y TiO_2 . Por lo tanto, se esperaba que el TiO_2 potencializara el efecto tóxico sobre las células cancerígenas. Sin embargo, esto no sucedió y probablemente sea

porque el ensayo con A1-110 se realizó sin aplicar irradiación UV. Por consecuencia, las nanopartículas de TiO_2 no se activaron. De acuerdo a la literatura, es necesaria la irradiación UV para que los electrones de la banda de valencia en el TiO_2 sobrepasen la banda prohibida y lleguen a la banda de conducción generando pares electrón-hueco, que con moléculas del entorno forman especies altamente energéticas, capaces de dañar a las células cancerígenas [50].

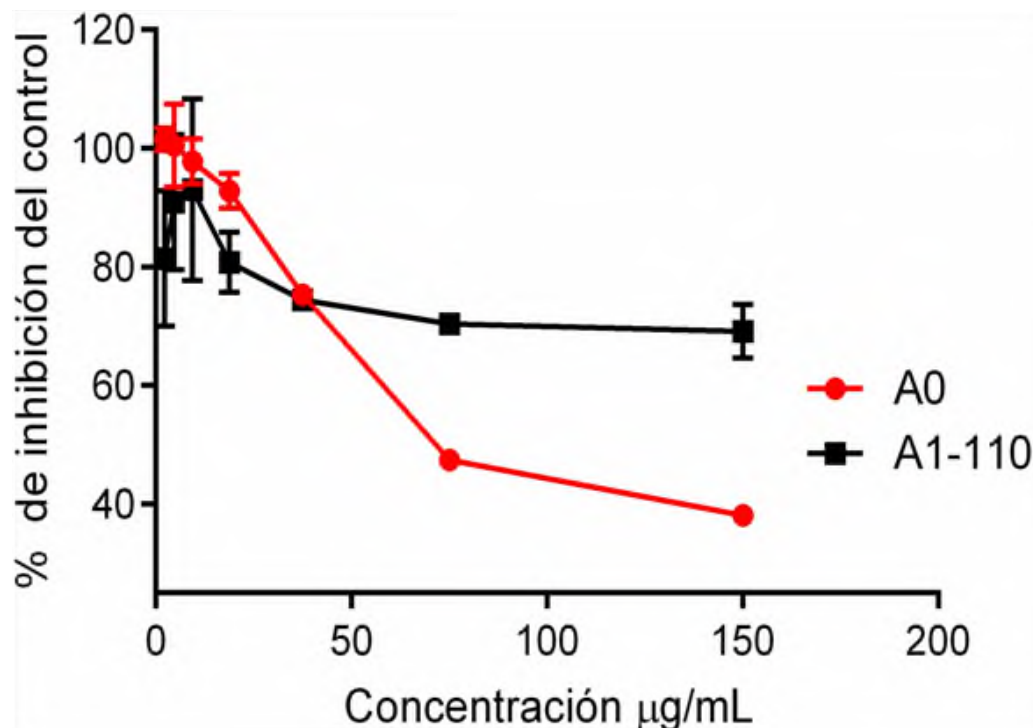


Figura 53. Ensayo de MTT con la fracción CHCl_3 (A0) y con el producto de reacción con CHCl_3 secado a 110°C (A1-110), los datos son expresados como la media \pm SD.

En la Figura 54, se muestran las gráficas de la fracción B0 y del producto de reacción B1-110. Aquí sucede algo interesante, los metabolitos de la fracción B0, no presenta actividad tóxica contra la línea celular. Sin embargo, el producto de reacción muestra una ligera actividad, de tal manera que con una concentración de $150\ \mu\text{g/mL}$ inhibe el 20% de las células cancerígenas. Cabe señalar que también este ensayo se realizó sin utilizar luz UV.

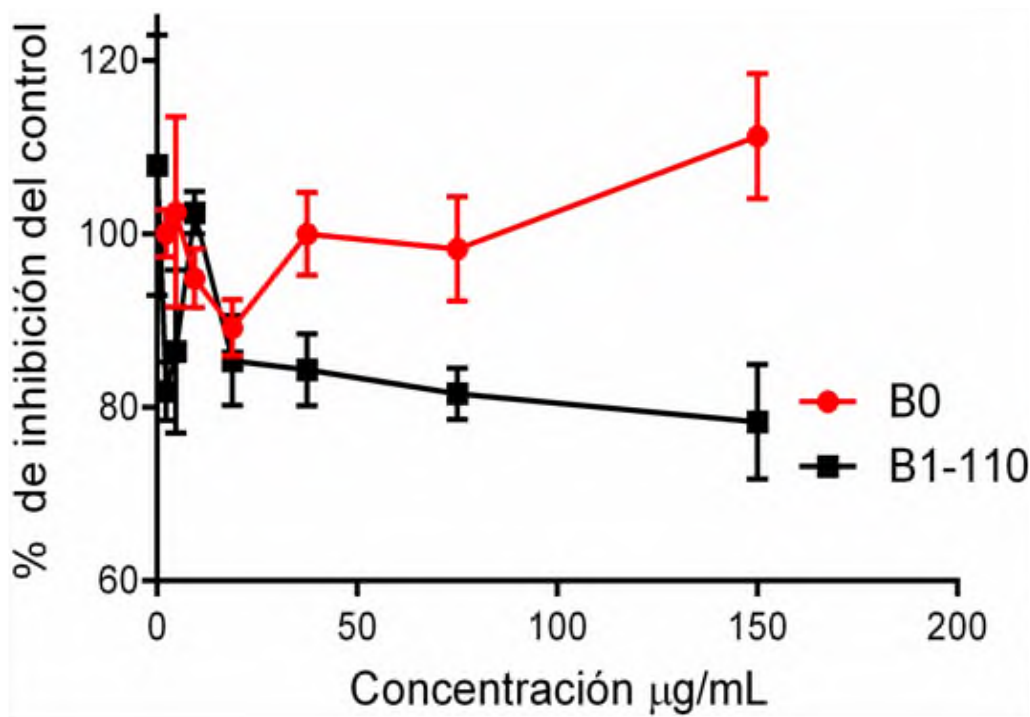


Figura 54. Ensayo de MTT con la fracción de AcOEt (B0) y del producto de reacción con AcOEt secado a 110 °C (B1-110), los datos son expresados como la media +/- SD.

En la Figura 55 se muestran las gráficas de la fracción y productos de reacción con *n*-BuOH. En esta gráfica se observa que los metabolitos presentes en la fracción antes y después de ser secados se comportan de forma similar y no tienen efecto tóxico contra la línea celular MCF-7. De acuerdo a los análisis por FTIR y DRX con esta fracción no se considera la obtención de nanopartículas de TiO₂.

En la Figura 56 se muestran las gráficas de la fracción con acuosa residual (D0) y productos de reacción (D1-110). De acuerdo a la gráfica solo se observa que D1-110 muestra un ligero efecto tóxico sobre la línea celular MCF-7, de tal manera que con 75 µg/mL inhibe el 12% de las células. Posiblemente este comportamiento sea solo debido a los metabolitos y no al TiO₂, ya que esta prueba, al igual que las anteriores, no se llevó a cabo con irradiación UV. De acuerdo a la caracterización por DRX, con esta fracción se logró la síntesis de TiO₂ en fase rutilo. Algunos reportes en la literatura indican que la fase rutilo tiene menor capacidad fotoactiva que la fase anatasa [37,38]. Aunque en nuestro caso, es necesario hacer los estudios usando irradiación UV.

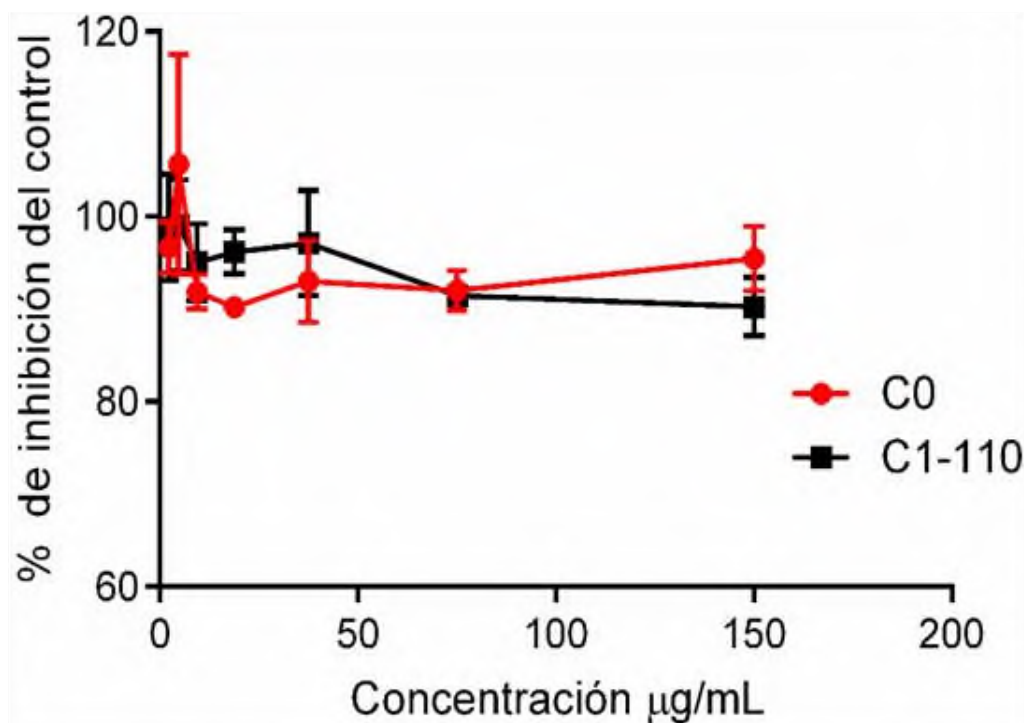


Figura 55. Ensayo de MTT con la fracción de *n*-BuOH (B0) y con el producto de reacción de *n*-BuOH secado a 110 °C (C1-110), los datos son expresados como la media +/- SD.

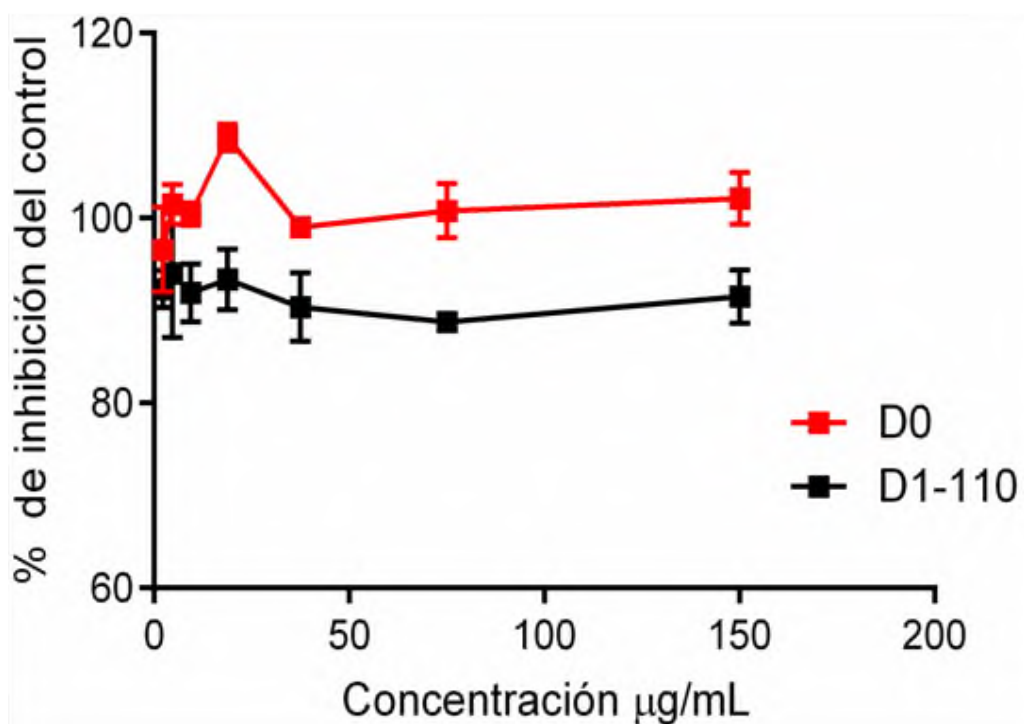


Figura 56. Ensayo de MTT con la fracción acuosa residual (D0) y con el producto de reacción secado a 110 °C (D1-110), los datos son expresados como la media +/- SD.

8.5 Películas de EVA/TiO₂

La dispersión e inmovilización de nanopartículas en diversos polímeros es una forma de obtener nanocompuestos con características superiores a las que tienen los compuestos por separado. En ese sentido, se prepararon películas con el copolímero etileno-acetato de vinilo (EVA) y los productos de reacción obtenidos con cada fracción de extracto. Los resultados se muestran a continuación.

La tonalidad de color de las películas obtenidas fue diferente con cada producto de reacción, tal como se muestra en la Figura 57. Se considera que esta diferencia de color se debe a los distintos metabolitos presentes en las fracciones de extracción con los diferentes disolventes. Notoriamente, la película de EVA con TiO₂ comercial (EVA/TiO₂com) presenta un color blanco intenso.

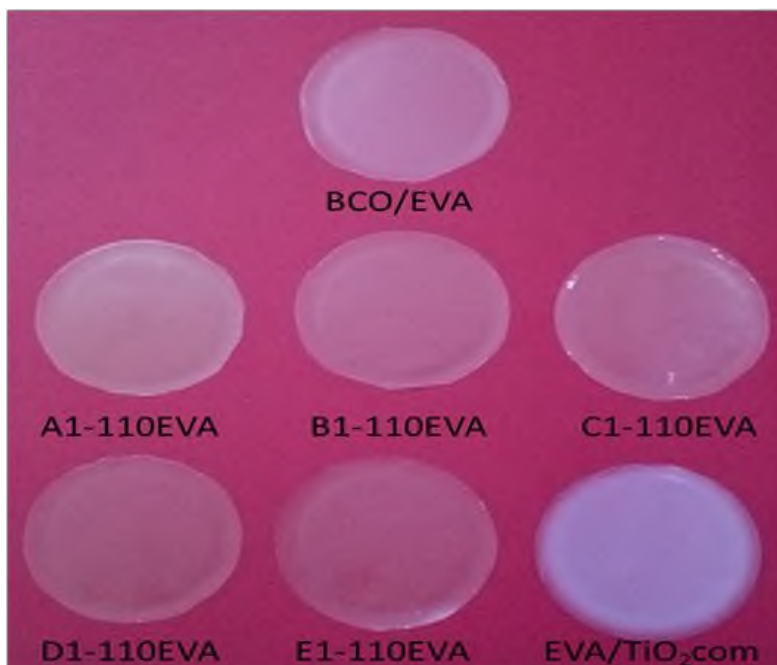


Figura 57. Películas de EVA (BCO/EVA) y de EVA con las fracciones de CHCl₃ (A1-110EVA), AcOEt (B1-110EVA), *n*-BuOH (C1-110EVA), acuosa residual (D1-110EVA), con el extracto crudo (E1-110EVA) y con TiO₂ comercial (EVA/TiO₂com).

8.5.1 Caracterización por FTIR de las películas de EVA/TiO₂

En la Figura 58 se muestra el espectro de FTIR para las películas de EVA con los productos de reacción obtenidos con las diferentes fracciones (CHCl₃; A1-110EVA, AcEOt; B1-110EVA, *n*-BuOH; C1-110EVA, acuosa residual; D1-110EVA, extracto crudo; E1-110EVA, EVA solo EVA/BCO). Se observa que los espectros presentan varias bandas dentro de las cuales destacamos a, b, c, d, e y f, (Tabla 12). A la banda a se le atribuye los movimientos de estiramiento para el grupo funcional N-H. Si bien es cierto que el EVA no presenta este grupo funcional en su estructura, el copolímero comercial denominado como ELVAX® tiene un aditivo amino. Es por ello que aparece esta banda. Las bandas restantes son características para el copolímero EVA. En general, no se observan cambios en las bandas en cualquiera de las películas, esto es debido a que el componente mayoritario es el EVA y la proporción de los productos de reacción es tan pequeña que no afecta a la estructura del copolímero.

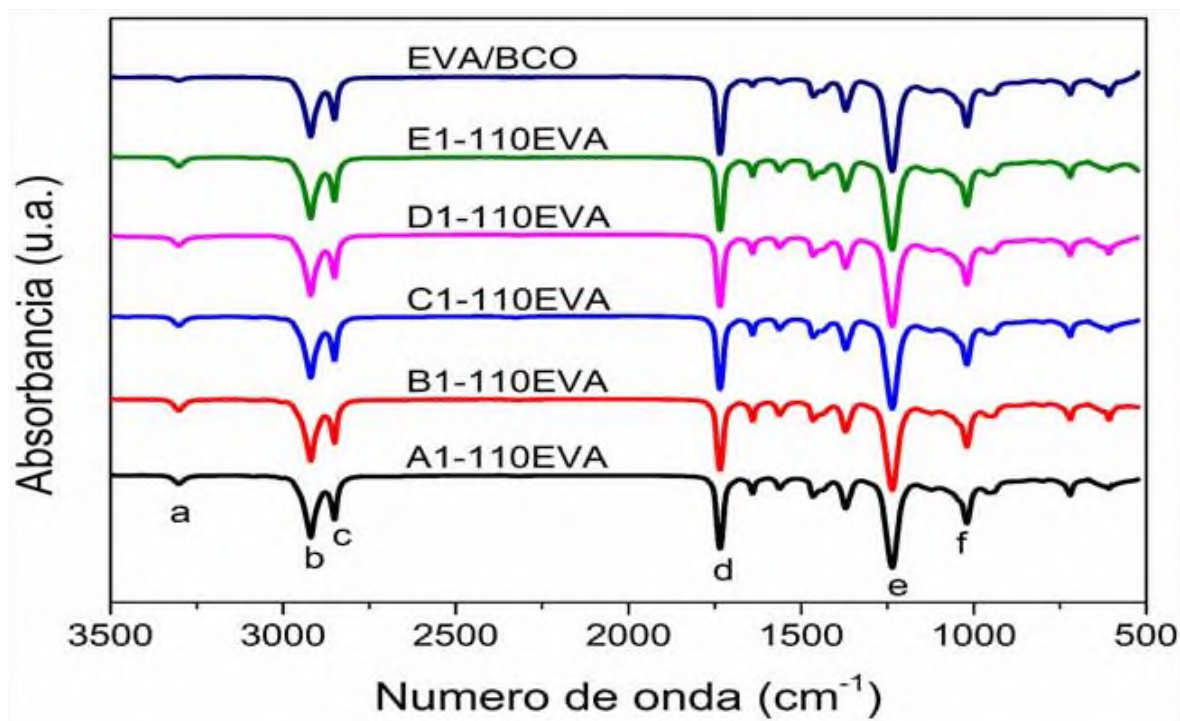


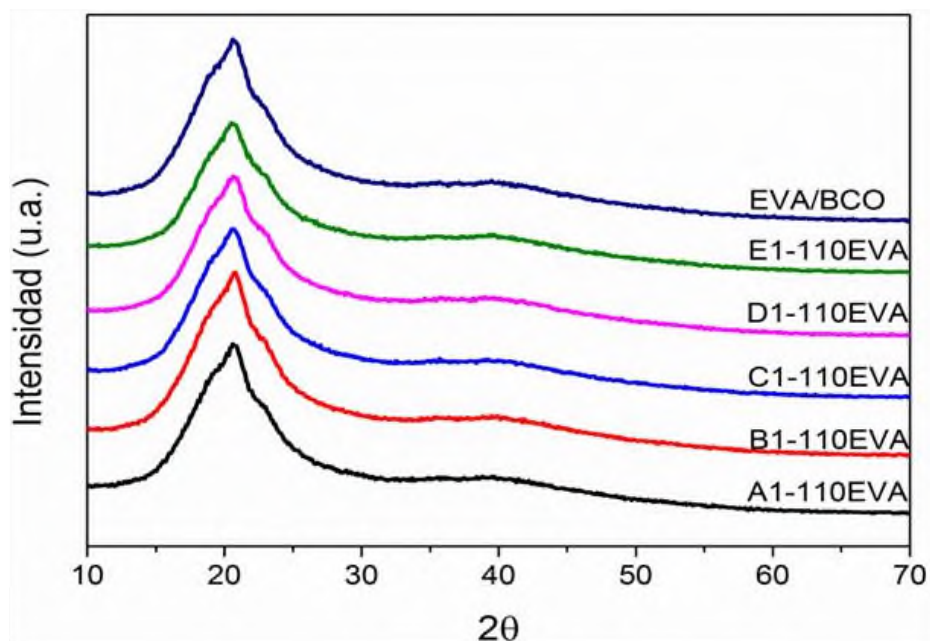
Figura 58. Espectro de FTIR de las películas EVA/productos de reacción.

Tabla 12. Bandas de absorción atribuidas a los grupos funcionales del copolímero EVA.

Banda	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de movimiento
a	3300	N-H	Estiramiento
b	2922	R-CH ₂ -R	Estiramiento asimétrico
c	2850	R-CH ₃	Estiramiento simétrico
d	1733	C=O	Estiramiento
e	1236	C-O-C	Estiramiento
f	1018	C=C-H	Relacionados con la vibración fuera del plano en alquenos

8.5.2 Caracterización por DRX de las películas de EVA/TiO₂

En la figura 59, se muestran los difractogramas de las películas obtenidas con los diferentes productos de reacción, se observa en el blanco EVA/BCO que el copolímero es semicristalino con un pico ancho en valor de $2\theta = 20$. Cuando este difractograma se compara con las películas obtenidas con los diferentes productos de reacción no se observan cambios en cuanto a anchura o intensidad en el pico del copolímero, lo que hace suponer que los productos de reacción dispersos en el EVA no tienen efecto en la cristalinidad del EVA.

**Figura 59.** Difractogramas de las películas EVA/productos de reacción.

8.5.3 Microscopía electrónica de barrido de las películas de EVA/TiO₂

Con la finalidad de observar la dispersión de las nanopartículas de TiO₂ en las películas de EVA se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Figura 60 se muestra la imagen de la película de EVA con nanopartículas de TiO₂ obtenidas con la fracción de CHCl₃ (A1-110EVA). Se observa que el grosor de la película es de aproximadamente 250 μm . y en la Figura 60b se muestra una magnificación de la imagen en la cual se observa que la dispersión de las nanopartículas no es uniforme y se encuentran aglomeradas. Posiblemente, la metodología utilizada para la dispersión no es adecuada.

En la Figura 61 se muestra la imagen de la película de EVA con nanopartículas de TiO₂ obtenidas con la fracción de AcOEt (B1-110EVA). Se observa que el grosor es uniforme de aproximadamente 250 μm , y en la Figura 61b se observa que existen aglomerados de TiO₂ no uniformes de tamaños nanométricos. A diferencia de la figura anterior, se observa una mejor dispersión de las partículas.

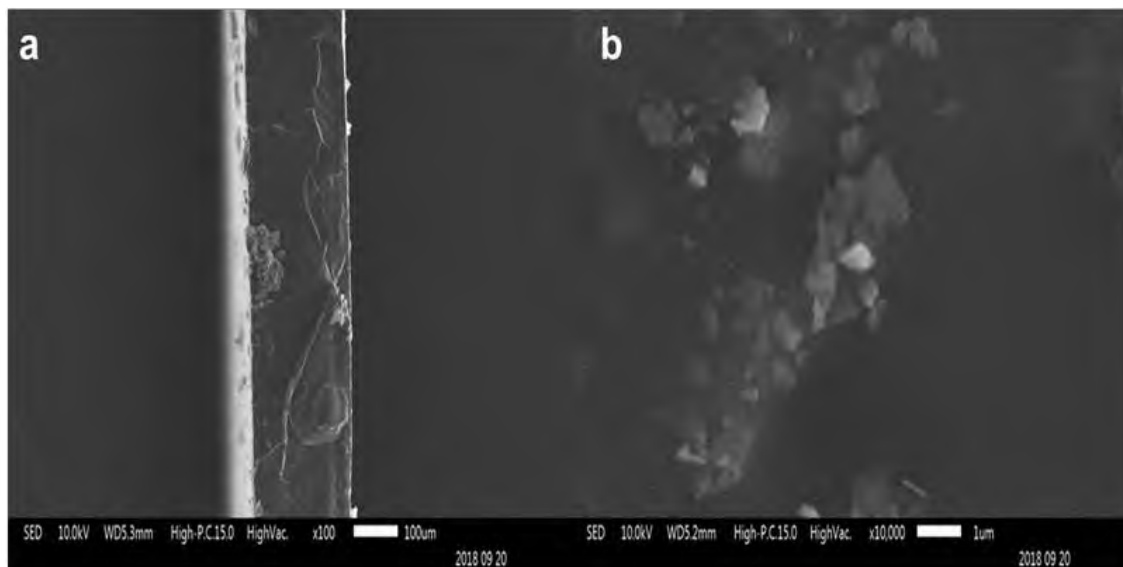


Figura 60. Imagen por SEM de la película con la fracción de CHCl₃, A1-110EVA.

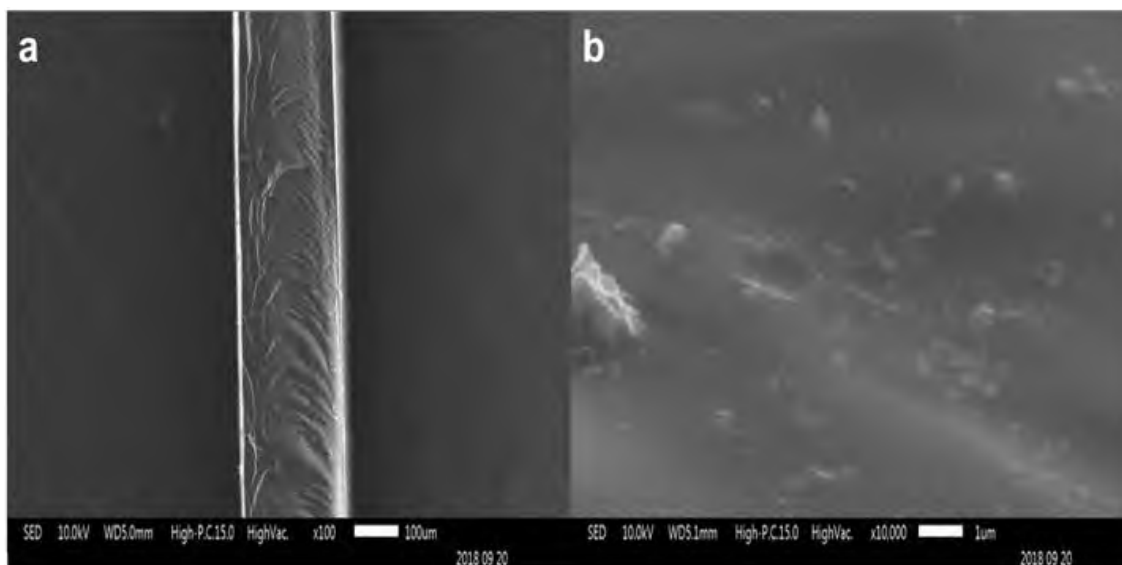


Figura 61. Imagen por SEM de la película con la fracción de AcOEt, B1-110EVA.

En la Figura 62 se muestra la imagen de la película de EVA con nanopartículas de TiO_2 obtenidas con la fracción acuosa residual (D1-110EVA). Se observa que el espesor es uniforme, con aproximadamente 250 μm . En la Figura 62b se observan aglomerados de partículas de TiO_2 mejor distribuidos que en los casos anteriores.

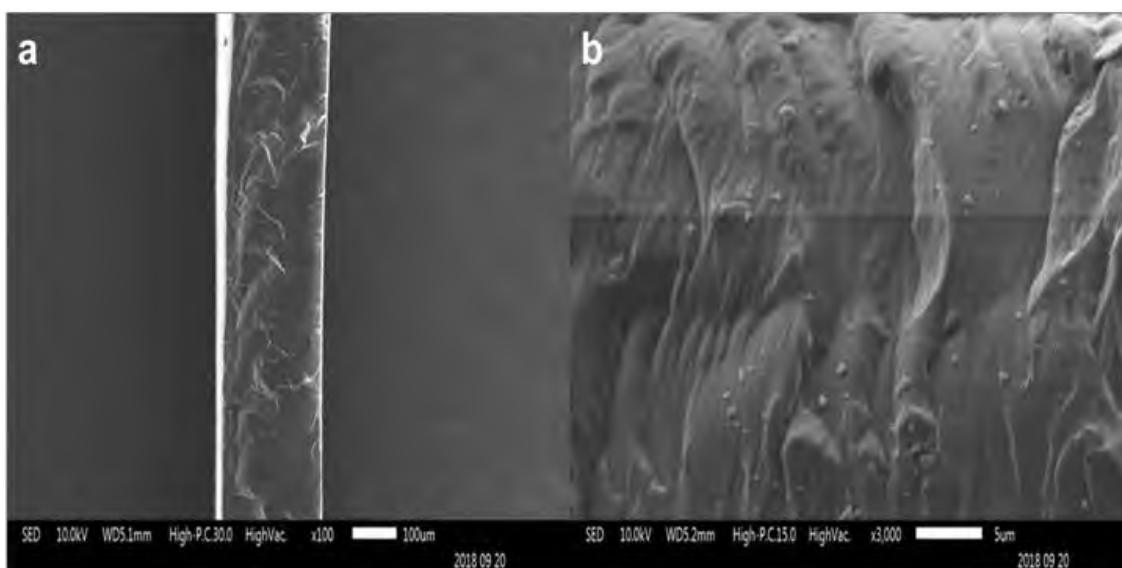


Figura 62. Imagen por SEM de la película con la fracción acuosa residual, C1-110EVA.

8.5.4 Ensayo de citotoxicidad con las películas de EVA/TiO₂

Para determinar el efecto de las películas de EVA/TiO₂ sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 se realizó el ensayo de MTT, utilizando las películas que se sabía que contenían TiO₂ (A1-110EVA, B1-110EVA y D1-110EVA), así como el blanco de EVA (EVA/BCO) y el estándar que contenía TiO₂ comercial (EVA/TiO₂com). Los resultados se muestran en la Figura 63. Se observa que el efecto sobre la línea celular de las películas es nulo. La razón de este comportamiento puede ser por varios factores, entre ellos, la pobre dispersión de las nanopartículas en el EVA o que la concentración de las partículas en el polímero es baja. De acuerdo a estudios previos, la concentración de las nanopartículas juegan un papel importante sobre el efecto tóxico en líneas celulares [48,50]. Otro factor es que el ensayo biológico fue realizado en ausencia de luz UV y por consiguiente las nanopartículas no se activaron.

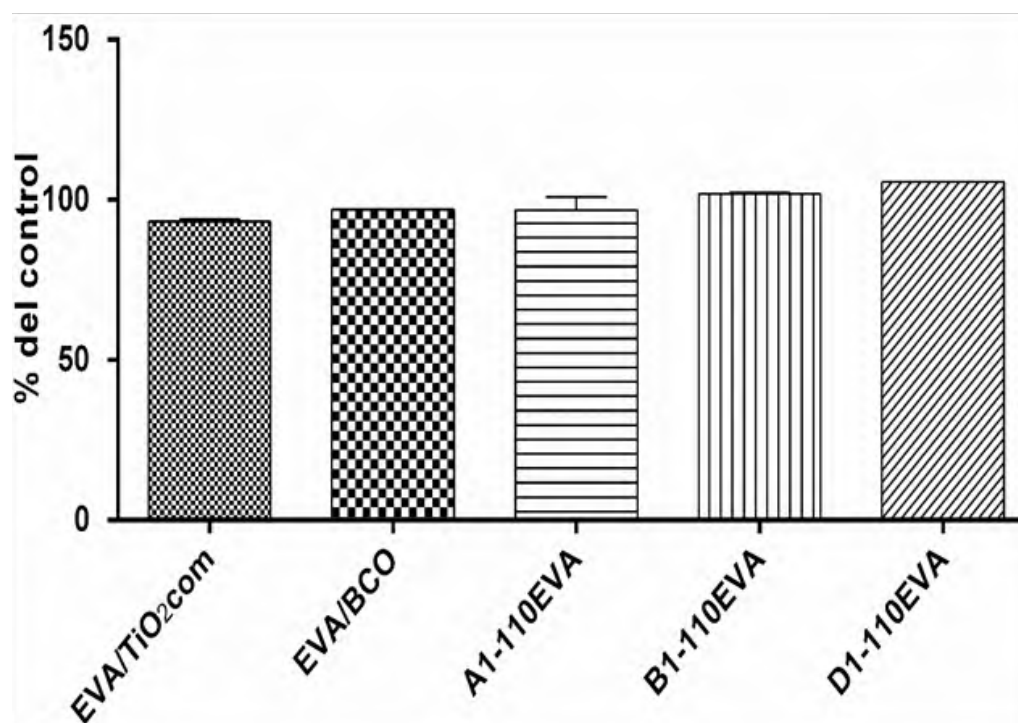


Figura 63. Ensayo de MTT en las películas de EVA/TiO₂, los datos son expresados como la media +/- SD.

X. CONCLUSIONES

Se llevaron a cabo reacciones entre el precursor $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ y el extracto crudo de *Stevia rebaudiana* extraído por maceración hidroalcohólica, así como con las fracciones de *Stevia* obtenidas con disolventes de diferente polaridad. Las reacciones obtenidas mostraron un cambio de color (indicativo de la formación de nanopartículas) en todas las fracciones, excepto en la fracción con hexano, la intensidad en la coloración fue directamente proporcional con la cantidad de compuestos fenólicos presentes, cabe mencionar que la fracción de hexano no mostró contenido de compuestos fenólicos y tampoco la formación de nanopartículas de TiO_2 . Mediante DRX se confirmó la presencia de dos fases cristalinas, anatasa y rutilo, las fases cristalinas fueron diferentes en las fracciones, lo cual hace suponer que las familias de metabolitos presentes juegan un papel importante en la selectividad de las fases. La caracterización por FTIR mostró una caída cerca del IR lejano característica para los enlaces Ti-O. Mediante SEM se determinó que el tamaño de las nanopartículas oscila entre 50 y 150 nm en los productos de reacción con CHCl_3 , AcOEt y acuosa residual. El ensayo de MTT realizado para el extracto y fracciones obtenidas, mostró que la fracción de CHCl_3 es la única que presenta capacidad tóxica contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Los productos de reacción mostraron mínimo efecto sobre esta línea celular, probablemente porque el ensayo se realizó en ausencia de luz UV y esto provocó que las nanopartículas no se activaran. Por otra parte, la dispersión de las nanopartículas en el copolímero EVA no fue eficiente, se formaron aglomerados de partículas de TiO_2 más o menos uniformes y al realizar el ensayo de MTT, las películas mostraron nula actividad sobre las células cancerígenas.

XI. PERSPECTIVAS

- 1.- Identificar a los metabolitos responsable de la síntesis de nanopartículas de TiO_2 .
- 2.- Realizar el ensayo biológico con los productos de reacción y con las películas, utilizando radiación UV para activar a las nanopartículas.
- 3.- Realizar TEM para la identificación de la morfología de las nanopartículas.

XII.- REFERENCIAS

- [1]. Liu, W. T., (2006). Nanoparticles and their biological and environmental applications, in *Journal of bioscience and bioengineering*, 1-7.
- [2]. Lu, K., (2012) *Nanoparticulate materials: synthesis, characterization, and processing*, John Wiley & Sons, 3-4.
- [3]. Medina, M. E., Galván L. E., Reyes R. E., (2015). Las nanopartículas y el medio ambiente. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 19(74), 49-58.
- [4]. Ismagilov, Z. R., Shikina, N. V., Mazurkova, N. A., Tsikoza, L. T., Tuzikov, F. V., Ushakov, V. A., Riabchikova, E. I., (2012). Synthesis of nanoscale TiO₂ and study of the effect of their crystal structure on single cell response. *The Scientific World Journal*, 2-3.
- [5]. Dávila, J. L., Gales, S., Guerrero, V. H., Pontón, P., Rosas, N.M., Sotomayor, V., Valdivieso, C., (2011). Nuevos materiales: aplicaciones estructurales e industriales, 55-58.
- [6]. Rao, C. N. R., Müller A., Cheetham A. K., (2006). *The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications*, John Wiley & Sons. 105-120.
- [7]. Zanella, R., (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1), 69-81.
- [8]. Yaya, A., (2012). Layered nanomaterials-a review. *Glob J Eng Des Technol*, 1(2), 32-41.
- [9]. de Jong, K.P., (2009). *Synthesis of solid catalysts*. John Wiley & Sons, 83-106
- [10]. Klabunde, K. J., Sergeev G. B., (2013) *Nanochemistry*. Newnes, 22-26
- [11]. Zhu, H. T., Zhang, C. Y., Yin, Y. S. (2004). Rapid synthesis of copper nanoparticles by sodium hypophosphite reduction in ethylene glycol under microwave irradiation. *Journal of Crystal Growth*, 270(3), 722-728.
- [12]. Muzafarov, A., Rebrov, E. (2000). Current Trends in the Chemistry of Dendrimers. *polymer science*, 42(1), 55-77.
- [13]. Xie, R. C., Shang, J. K. (2007). Morphological control in solvothermal synthesis of titanium oxide. *Journal of materials science*, 42(16), 6583-6589.

-
- [14]. Cheviron, P., Gouanvé F., Espuche E., (2014). Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 108, 291-298.
- [15]. Peralta-Videa, J.R., (2016). Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis? *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 1(1), 4.
- [16]. Iravani, S., (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- [17]. Kharissova, O.V., (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 31(4), 240-248.
- [18]. Parsons, J., Peralta-Videa J., Gardea-Torresdey J., (2007). Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. *Developments in environmental science*,5, 463-485.
- [19]. Jayandran, M., Haneefa M.M., Balasubramanian V., (2015). Green synthesis of copper nanoparticles using natural reducer and stabilizer and an evaluation of antimicrobial activity. *J Chem Pharm Res*,7(2), 251-259.
- [20]. Davar, F., Majedi A., Mirzaei A.,(2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles and its application in the degradation of some dyes. *Journal of the American Ceramic Society*, 98(6), 1739-1746.
- [21]. Roopan, S. M., (2012). Efficient phyto-synthesis and structural characterization of rutile TiO₂ nanoparticles using *Annona squamosa* peel extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98, 86-90.
- [22]. Santhoshkumar, T.,(2014). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(12), 968-976.
- [23]. Suman, T.Y., (2015). Larvicidal activity of titanium dioxide nanoparticles synthesized using *Morinda citrifolia* root extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and its other effect on non-target fish. *Asian Pac J Trop Dis*, 5(3), 224-230.
- [24]. Chandran, S.P., (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloevera* plant extract. *Biotechnology progress*, 22(2), 577-583.
- [25]. 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.
- [26]. Mubayi, A., (2012). Evidence based green synthesis of nanoparticles. *Adv Mat Lett*, 3(6), 519-525.
- [27]. 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(3), 1195-1202.
- [28]. Nuñez, E., (2011). *Stevia rebaudiana* Bertoni, un sustituto del azúcar. Área Ciencia de las Plantas y Recursos Naturales Maestría en Producción Vegetal–Ciclo de Seminarios.
- [29]. Salvador, R. R., Sotelo, H. M., Paucar, M. L. (2014). Estudio de la *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 157-163
- [30]. Gilabert, J., Encinas, T. (2014). De la stevia al E-960: un dulce camino. in *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos, 305-3011.
- [31]. Yantis, M.A., (2011). Refrescos bajos en calorías. *Nursing (Ed. española)*, 29(3), 52-52.
- [32]. Wong, M. S., Hsu, S. W., Rao, K. K., Kumar, C. P. (2008). Influence of crystallinity and carbon content on visible light photocatalysis of carbon doped titania thin films. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 279(1), 20-26.
- [33]. Ibhaddon, A. O., Greenway, G. M., Yue, Y. (2008). Photocatalytic activity of surface modified $\text{TiO}_2/\text{RuO}_2/\text{SiO}_2$ nanoparticles for azo-dye degradation. *Catalysis Communications*, 9(1), 153-157.
- [34]. Bouazza, N., Lillo, M. A., Linares, S. A. (2008). Enhancement of the photocatalytic activity of pelletized TiO_2 for the oxidation of propene at low concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 77(3), 284-293.
- [35]. Baño Morales, D.A., (2017). Síntesis de partículas nanométricas y submicrométricas de dióxido de titanio (TiO_2) para la formación de películas nanoestructuradas., Quito.
- [36]. Kolen'ko, Y. V., Burukhin, A. A., Churagulov, B. R., Oleynikov, N. N. (2003). Synthesis of nanocrystalline TiO_2 powders from aqueous TiOSO_4 solutions under hydrothermal conditions. *Materials Letters*, 57(5), 1124-1129.

-
- [37]. Liu, Y., (2008). Sonochemical synthesis and photocatalytic activity of meso-and macro-porous TiO₂ for oxidation of toluene. *Journal of hazardous materials*, 2008, 150(1), 153-157.
- [38]. Benedix, R., Dehn, F., Quaas, J., Orgass, M. (2000). Application of titanium dioxide photocatalysis to create self-cleaning building materials. *Lacer*, 5, 157-168.
- [39]. Perez Alvarez, J., Solis Casado D.A., (2014). Películas delgadas de TiO₂ modificado con Co para su aplicación en sistemas electrocatalíticos y fotocatalíticos.
- [40]. Serpone, N. (1995). Brief introductory remarks on heterogeneous photocatalysis. *Solar energy materials and solar cells*, 38(1), 369-379
- [41]. Linsebigler, A. L., Lu, G., Yates Jr, J. T. (1995). Photocatalysis on TiO₂ surfaces: principles, mechanisms, and selected results. *Chemical reviews*, 95(3), 735-758.
- [42]. Burgess, K.D. (2007). Self-Cleaning Titania-Polyurethane Composites. M. Sc. thesis, The University of Western Ontario, Canada.
- [43]. Wold, A. (1993). Photocatalytic properties of titanium dioxide (TiO₂). *Chemistry of Materials*, 5(3) 280-283.
- [44]. Ibhaddon, A.O. Fitzpatrick P., (2013). Heterogeneous photocatalysis: recent advances and applications. *Catalysts*, 3(1), 189-218.
- [45]. Aguirre, G. E. M., Pauker C. F. S., (2016). Estudio de la degradación fotocatalítica de colorantes azoicos con el uso de dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO) inmovilizados en soportes poliméricos.
- [46]. González, B. J., Castillo, E., Caldito, J. F. (2013). Coefficient of thermal expansion of TiO₂ filled EVA based nanocomposites. A new insight about the influence of filler particle size in composites. *European Polymer Journal*, 49(7), 1747-1752.
- [47]. Uddin, M. J., Cesano, F., Bonino, F., Bordiga, S., Spoto, G., Scarano, D., Zecchina, A. (2007). Photoactive TiO₂ films on cellulose fibres: synthesis and characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 189(2), 286-294
- [48]. Thevenot, P., (2008). Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(3), 226-236.

- [49]. Kubota, Y., (1994). Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *British journal of cancer*, 70(6), 1107.
- [50]. Cai, R., (1992). Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer research*, 52(8), 2346-2348.
- [51]. Besednjak, A., (2005). *Materiales compuestos*. Univ. Politèc. de Catalunya. 100.
- [52]. Smith, W. F., Hashemi, J., Avilés, L. C., Velasco, J. A. B. (2006). *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales* McGraw-Hill, 459-462
- [53]. Palacios, H.G., (2016). Estudio de la compatibilidad de especies químicas del magnesio con copolímeros de etileno-acetato de vinilo (EVA) como prometedores materiales almacenadores de hidrógeno, Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec.
- [54]. Bidsorkhi, H. C., Soheilmoghaddam, M., Pour, R. H., Adelnia, H., Mohamad, Z. (2014). Mechanical, thermal and flammability properties of ethylene-vinyl acetate (EVA)/sepiolite nanocomposites. *Polymer Testing*, 37, 117-122.
- [55]. Valera-Zaragoza, M., Ramirez-Vargas E. Medellin-Rodriguez, F. J. Huerta-Martinez, B. M., (2006). Thermal stability and flammability properties of heterophasic PP-EP/EVA/organoclay nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 91(6) 1319-1325.
- [56]. Sivaranjani, V., Philominathan, P. (2016). Synthesize of Titanium dioxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves and evaluation of wound healing activity. *Wound Medicine*, 12, 1-5.
- [57]. Rodríguez, M., (2013). Synthesis and Characterization of Anatase TiO₂ Nanofibers Using *Stevia rebaudiana* Leaf Aqueous Extract. *Recent Research Developments in Material Sciences*, Research Signpost, Kerala, 45-58.
- [58]. Valentim, A. C. S., Tavares, M. I. B., Silva, E. O. D. (2014). Effect of adding TiO₂ to ethylene vinyl acetate copolymer on the latter's thermal properties and crystallinity. *Química Nova*, 37(2), 255-259.
- [59]. Londhe, S. V., Nanaware, S. M. (2013). HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journal of AOAC International*, 96(1), 24-26.
- [60]. Ali, M. B., Singh, N., Shohael, A. M., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2006). Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science*, 171(1), 147-154.

- [61]. Chaturvedula, V.S.P., Mubarak C., Prakash I., (2012). IR Spectral Analysis of Diterpene Glycosides Isolated from *Stevia rebaudiana*. Food and Nutrition Sciences, 3(10), 1467.
- [62]. 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(2), 5-8.
- [63]. Langle, A., et al., *Stevia rebaudiana* loaded titanium oxide nanomaterials as an antidiabetic agent in rats. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2015. 25(2): p. 145-151.
- [64]. Sankar, R., Dhivya R., Shivashangari K. S., Ravikumar V., (2014) Wound healing activity of *Origanum vulgare* engineered titanium dioxide nanoparticles in Wistar Albino rats. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 25(7), 1701-1708.
- [65]. Kumar, V. Yadav, S.K.,(2009) Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84(2), p. 151-157.
- [66]. Silija, P., Yaakob, Z., Yarmo, M. A., Sugunan, S., Binitha, N. N., (2011). Visible light active anion codoped sol gel titania photocatalyst for pollutant degradation. Journal of sol-gel science and technology,59(2), 252-259.
- [67]. Hernández Enríquez, J. M., García Serrano, L. A., Zeifert Soares, B. H., García Alamilla, R., Zermeño Resendiz, B. B., Del Angel Sánchez, T., Cueto Hernández, A. (2008). Síntesis y caracterización de nanopartículas de N-TiO₂-Anatasa. Superficies y vacío, 21(4), 1-5..
- [68]. Mosquera, E., Rosas, N., Debut, A., Guerrero, V. H. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio obtenidas por el método de sol-gel. Revista Politécnica, 36(3), 7.
- [69]. Rajakumar, G., Rahuman, A. A., Jayaseelan, C., Santhoshkumar, T., Marimuthu, S., Kamaraj, C., Arora, P., (2014). *Solanum trilobatum* extract-mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles to control *Pediculus humanus capitis*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Anopheles subpictus*. Parasitology research, 113(2), 469-479.