



**Síntesis de nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de plantas de Ecuador:  
Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Llantén (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta  
graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa  
officinalis* L.) y caracterizarlas posteriormente**

Pérez Rosales, Mikaela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ing. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo, M.Sc., Ph.D.

6 de marzo de 2023



CERTIFICADO DE ANÁLISIS  
magister

## TESIS PEREZ ROSALES MIKAELA

2% Similitudes

< 1% Texto entre comillas  
0% similitudes entre comillas  
2% idioma no reconocido

Nombre del documento: TESIS PEREZ ROSALES  
MIKADLA.pdf  
ID del documento: ac23535b8b09ac78e14e2f0e95947bb5fa0ddc2  
Tamaño del documento original: 3,01 Mo

Depositante: ANDRÉS RICARDO IZQUIERDO ROMERO  
Fecha de depósito: 23/2/2023  
Tipo de carga: interface  
fecha de fin de análisis: 23/2/2023

Número de palabras: 19.630  
Número de caracteres: 125.901

Ubicación de las similitudes en el documento:



### Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<a href="http://www.redalyc.org/journal/492/49218251818008/">www.redalyc.org   Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu...</a> 8 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (85 palabras)
2	<a href="https://hdl.handle.net/2454/423676">hdl.handle.net   Estudio de metodologías limpias para la extracción de polifenoles a...</a> 6 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (67 palabras)
3	<a href="http://www.scielo.org.pe/handle/doc/html/abstract/52077961720190001900010">www.scielo.org.pe   Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos...</a> 4 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (66 palabras)
4	<a href="http://dspace.uceuenca.edu.ec/bitstream/123456789/5406719/Proyecto%20de%20elaboraci%C3%B3n%20de%20un%20trabajo%20de%20grado.pdf">dspace.uceuenca.edu.ec   Determinación de compuestos fenólicos en extractos y frac...</a> 5 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (48 palabras)
5	<a href="http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643228023.pdf">www.redalyc.org</a> 3 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (64 palabras)

### Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<a href="https://hdl.handle.net/10290/21981">hdl.handle.net   Nuevas técnicas electroquímicas para la determinación de la capaci...</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (31 palabras)
2	<a href="https://library.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14225/1/UPS-C7007881.pdf">library.ups.edu.ec   CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO - Actividad antioxidante de los compu...</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (31 palabras)
3	<a href="#">Documento de otro usuario</a> #65208 El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (20 palabras)
4	<a href="http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14225/1/UPS-C7007881.pdf">dspace.ups.edu.ec   Comparación de la capacidad anti oxidante de cuatro metabólito...</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (15 palabras)
5	<a href="http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643228023.pdf">www.redalyc.org</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (15 palabras)



ANDRÉS RICARDO  
IZQUIERDO ROMERO



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Síntesis de nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de plantas de Ecuador: Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Llantén (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa officinalis* L.) y caracterizarlas posteriormente" fue realizado por la señorita **Pérez Rosales, Mikaela**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de mayo de 2023.



.....  
FIRMADO DIGITALMENTE POR:  
ANDRÉS IZQUIERDO ROMERO

Ing. Andrés Izquierdo Romero, M.Sc., Ph.D.

C. C. 1714479506



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Pérez Rosales Mikaela**, con cédula de ciudadanía n° **1723405609**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular con Título: "**Síntesis de nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de plantas de Ecuador: Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Llantén (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa officinalis* L.) y caracterizarías posteriormente"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos, establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 04 de mayo de 2023

Pérez Rosales, Mikaela

C.C. 1723405609



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Pérez Rosales Mikaela**, con cédula de ciudadanía n° **1723405609**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular con Título: "**Síntesis de nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de plantas de Ecuador: Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Llantén (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa officinalis* L.) y caracterizarlas posteriormente**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 04 de mayo de 2023

Pérez Rosales, Mikaela

C.C. 1723405609

## Dedicatoria

A mi familia: Miguel, Diany, Dani “memesuki” y Dianita, por ser un soporte aún en los días más complicados, llenarme de amor, palabras de apoyo y darme la mano en todo este camino; este logro es tan mío como suyo. A mis amigos: Dani, Mario, Nash y Marce; por hacer las épocas difíciles de la carrera un poco más livianas y porque nunca faltaron las risas y los momentos a su lado. A mi novio, Sebastián por ser un apoyo y llenarme de amor, aunque no entienda de lo que hablo la mayoría del tiempo. A mis profesores especialmente a Erika, Claudia, Marbel y Mónica por enseñarme tanto sobre las materias y aún más sobre la vida. Un agradecimiento especial a Erika y Andrés por darme la oportunidad de realizar este proyecto, permitirme aprender y ser una guía a lo largo del mismo. Finalmente me agradezco a mí, por luchar, seguir adelante y no rendirme, aunque existieron días difíciles, por dejarme soñar y trabajar por esos sueños.

## Agradecimientos

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, especialmente al Centro de Nanociencia y Nanotecnología CENCINAT, por permitirme realizar este proyecto de integración curricular. A mis tutores Andrés Izquierdo y Erika Murgueitio, por permitirme trabajar y aprender de ustedes. A todo el resto de mis profesores por sus conocimientos y dedicación.

A todos mis compañeros y amigos que han estado conmigo a lo largo de este tiempo: Gaby, Mishu, Dani, Mario, Nash, Marce, Mile, Josué y todos los demás; gracias por hacer estos años mejores.

## Tabla de contenido

Resumen .....	18
Abstract.....	19
Capítulo I: Introducción .....	20
Formulación del Problema.....	20
Justificación del Problema .....	20
Alcance.....	21
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos .....	22
Hipótesis .....	23
Capítulo II: Marco teórico .....	23
Plantas medicinales en Ecuador .....	23
Compuestos polifenólicos en plantas medicinales.....	24
Síntesis verde de nanopartículas .....	27
Nanopartículas de Cobre .....	29
Nanopartículas de yoduro de cobre .....	31
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	33
Preparación de las plantas para los extractos .....	33
Determinación de humedad en las muestras.....	34
Extracción de compuestos polifenólicos de plantas.....	34



Medición de la concentración de compuestos fenólicos .....	36
Curva de calibración.....	36
Preparación de las muestras.....	39
Medición de la concentración de compuestos fenólicos en los extractos .....	40
Diseño experimental para la medición de la concentración de compuestos fenólicos en los extractos	40
Medición de la capacidad antioxidante .....	41
Diseño experimental para el porcentaje de capacidad antioxidante .....	42
El diseño experimental para el porcentaje de capacidad antioxidante en las muestras de plantas se llevó a cabo analizando el extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos para cada planta. Una vez seleccionado este extracto se realizó el análisis anteriormente explicado y se realizó un diseño experimental preliminar para analizar el Tipo de planta y los datos obtenidos de porcentaje de capacidad antioxidante, la Tabla 5 es la tabla preliminar para este diseño experimental. Para el análisis estadístico se realizó un análisis ANOVA de una vía con este se comparó los tipos de planta con los datos obtenidos para el porcentaje de capacidad antioxidante. ....	42
Síntesis de nanopartículas de Cobre.....	43
Síntesis de nanopartículas de Yoduro de Cobre .....	45
Análisis de estabilidad y caracterización de las nanopartículas sintetizadas .....	47
Capítulo VI: Resultados .....	48
Determinación de la humedad .....	48
Extracción de compuestos polifenólicos de plantas.....	48
Medición de la concentración de compuestos fenólicos .....	50

	10
Curva de calibración.....	50
Análisis de los mejores extractos para cada planta. ....	53
Análisis ANOVA para la concentración de compuestos polifenólicos .....	56
Hipótesis a probar con el análisis ANOVA.....	56
Datos obtenidos del análisis ANOVA con nivel de significancia de 0.05 .....	57
Interpretación de los datos obtenidos del análisis ANOVA para un nivel de significancia de 0.05....	59
Datos obtenidos del análisis ANOVA con nivel de significancia de 0.01 .....	60
Medición de la capacidad antioxidante .....	60
Promedios de absorbancias obtenidas para los extractos de las plantas analizadas y su respectivo porcentaje de capacidad antioxidante. ....	61
Análisis ANOVA de la capacidad antioxidante .....	63
Análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.05%.....	64
Interpretación de los resultados para el análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.05.....	65
Análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.01 .....	66
Interpretación de resultados para el análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.01.....	67
Análisis de las de nanopartículas de Cobre sintetizadas .....	68
Nanopartículas con extracto de Ruda.....	68
Nanopartículas con extracto de Santa María .....	71
Nanopartículas con extracto de Toronjil.....	73

	11
Síntesis de nanopartículas de Yoduro de Cobre .....	76
Nanopartículas con extracto de ruda .....	76
Nanopartículas con extracto de santa maría .....	78
Nanopartículas con extracto de toronjil .....	81
Capítulo V: Discusión .....	83
Concentración de compuestos fenólicos.....	83
Capacidad antioxidante .....	86
Nanopartículas de cobre.....	89
Nanopartículas de yoduro de cobre .....	91
Capítulo VI: Conclusiones.....	92
Capítulo VII: Recomendaciones .....	93
Capítulo VII: Bibliografía .....	93

### Índice de tablas

Tabla 1 Valores de potenciales de reducción de algunos polifenoles .....	26
Tabla 2 Diluciones de la sustancia patrón de ácido gálico para obtener las sustancias de diferentes concentraciones que se van a usar para la curva de calibración.....	37
Tabla 3 Preparación de las soluciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu y el carbonato de sodio para la elaboración de la curva de calibración.....	38
Tabla 4 Diseño experimental preliminar sobre la concentración de polifenoles de las plantas a analizarse. ....	41
Tabla 5 Diseño experimental preliminar sobre el porcentaje de capacidad antioxidante a analizarse .....	43
Tabla 6 Resultados de los análisis del porcentaje de humedad en las muestras de las plantas a analizar. ....	48
Tabla 7 Observaciones cualitativas de los extractos en diferentes concentraciones de etanol. ....	49
Tabla 8 Medias de las concentraciones obtenidas por agitación orbital con los diferentes porcentajes de etanol utilizados para las extracciones.....	52
Tabla 9 Medias de las concentraciones obtenidas por agitación rotacional con los diferentes porcentajes de etanol utilizados para las extracciones.....	53
Tabla 10 Cuadro comparativo de la concentración de compuestos polifenólicos analizados durante este proyecto de integración curricular y otras plantas medicinales analizadas en otros proyectos anteriormente.....	55
Tabla 11 <i>Tabla obtenida del análisis de los datos de concentración de compuestos polifenólicos en el software "SigmaPlot"</i> .....	58
Tabla 12 <i>Errores estándar de las medias de mínimos cuadrados en cada una de las comparaciones realizadas</i> .....	59

Tabla 13 Promedios de absorbancias obtenidos para los extractos de las plantas analizadas y el porcentaje de capacidad antioxidante promedio de cada una de ellas. ....	61
Tabla 14 Cuadro comparativo del porcentaje de capacidad antioxidante analizados durante este proyecto de integración curricular y otras plantas medicinales analizadas en otros proyectos anteriormente.....	62
Tabla 15 Tabla de cómo se colocaron los datos para el análisis ANOVA.....	64
Tabla 16 Tabla de los datos obtenidos durante el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante .....	64
Tabla 17 Resultados del test de Turkey .....	65
Tabla 18 Tabla de los datos obtenidos durante el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante .....	66
<i>Tabla 19 Tabla de las Fuentes de variación obtenidas por el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante .....</i>	<i>66</i>
Tabla 20 <i>Tabla de comparaciones por el factor: tipo de planta. Para un ANOVA con nivel de significancia de 0.01.....</i>	<i>67</i>
Tabla 21 Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de ruda .....	70
Tabla 22 Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de santa maría.....	72
Tabla 23 Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de toronjil .....	75
Tabla 24 Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre a su vez sintetizadas con extracto de ruda.....	77

Tabla 25 Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre a su vez sintetizadas con extracto de santa maría. .... 80

Tabla 26 Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre a su vez sintetizadas con extracto de toronjil. .... 82

## Índice de Figuras

<i>Figura 1 Ruta del ácido shikímico la cual es la principal ruta en plantas para la generación de metabolitos secundarios. ....</i>	25
<i>Figura 2 Explicación gráfica de los enfoques “bottom-up” y “top-Down” de la síntesis de nanopartículas. ....</i>	29
Figura 3 Mapa del lugar de recolección de las muestras en Amaguaña y el lugar donde se compraron las muestras en el mercado de Conocoto.....	33
Figura 4 A) Separación de las muestras de Toronjil ( <i>Melissa officinalis</i> L.), previamente cortadas para colocarlas en los tubos de ensayo correspondientes. B) Extractos después del protocolo de extracción de Toronjil ( <i>Melissa officinalis</i> L.).....	35
<i>Figura 5 Protocolo gráfico y resumido de la extracción de compuestos polifenólicos a partir de las diferentes plantas. ....</i>	36
<i>Figura 6 Preparación de las soluciones para la curva de calibración de ácido gálico.....</i>	38
<i>Figura 7 Extracción de los sobrenadantes de las muestras de llantén (<i>Plantago major</i> L.) .....</i>	39
<i>Figura 8 Proceso de medición de la concentración de compuestos polifenólicos.....</i>	40
Figura 9 Proceso de síntesis de nanopartículas en línea de gas nitrógeno .....	43
Figura 10 Mecanismo de reacción entre los polifenoles presentes en los extractos de las plantas y la sal de cobre. ....	44
<i>Figura 11 Proceso de síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre en línea de gas nitrógeno .....</i>	45
<i>Figura 12 Nanopartículas de yoduro de cobre .....</i>	46
Figura 13 Imagen referencial cualitativa de algunos de los extractos obtenidos.....	50
Figura 14 Curva de calibración obtenida a partir de ácido gálico, reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio. $R=0.9984$ .....	51

Figura 15 Comparación gráfica entre las concentraciones de compuestos polifenólicos en las plantas medicinales analizadas, según el extracto que presentó mayor concentración de estos compuestos. ....	55
Figura 16 Comparación gráfica de los promedios de los porcentajes de capacidad antioxidante de los 5 extractos que fueron analizados.....	62
Figura 17 Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de ruda ( <i>Ruta graveolens</i> L.).....	69
Figura 18 Curva cinética de las mediciones tomadas a lo largo de 405 minutos para las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de ruda.....	70
Figura 19 Curva obtenida en el UV-Visible de las nanopartículas de cobre obtenidas a partir de extracto de Santa María ( <i>Tanacetum parthenium</i> L. Sch.Bip.) .....	71
Figura 20 Curva sintética de las mediciones tomadas a lo largo de 405 minutos para las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de santa maría. ....	73
Figura 21 Curva obtenida en el UV-Visible de las nanopartículas de cobre obtenidas a partir de extracto de Toronjil ( <i>Melissa officinalis</i> L.).....	74
Figura 22 Curva sintética de las mediciones tomadas a lo largo de 405 minutos para las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de toronjil .....	75
Figura 23 Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de nanopartículas de cobre con extracto de ruda ( <i>Ruta graveolens</i> L.) .....	76
Figura 24 Curva sintética de las mediciones tomadas a lo largo de 405 minutos para las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre a su vez sintetizadas con extracto de ruda.....	78
Figura 25 Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de nanopartículas de cobre con extracto de Santa María ( <i>Tanacetum parthenium</i> L. Sch.Bip.) ..	79



Figura 26 Curva sintética de las mediciones tomadas a lo largo de 405 minutos para las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre a su vez sintetizadas con extracto de santa maría. ....	80
Figura 27 Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de nanopartículas de cobre con extracto de Toronjil ( <i>Melissa officinalis</i> L.).....	81
Figura 28 Curva sintética de las mediciones tomadas a lo largo de 405 minutos para las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre a su vez sintetizadas con extracto de toronjil. ....	82

## Resumen

Ecuador posee una flora privilegiada a nivel mundial, lo que incluye una variedad de plantas medicinales. Los metabolitos secundarios presentes les otorgan a las plantas características de interés debido a tienen propiedades antibacteriales, antifúngicas y antivirales. Sin embargo, la información sobre las plantas ecuatorianas es limitada y se encuentra desactualizada. El objetivo de este proyecto es sintetizar nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de plantas de Ecuador: hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), llantén (*Plantago major* L.), ruda (*Ruta graveolens* L.), santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y toronjil (*Melissa officinalis* L.) como agentes reductores y bio protectores durante la síntesis de nanopartículas de cobre y de yoduro de cobre; y caracterizarlas posteriormente. La metodología de este proyecto se dividió en dos partes la primera consistió en realizar extractos con diferentes concentraciones de etanol (0%, 20%, 40% y 80%), así como dos métodos de agitación (orbital y rotacional), a continuación, se realizó el análisis de la concentración de compuestos polifenólicos y del porcentaje de capacidad antioxidante. La segunda parte consistió en base a los análisis utilizar los tres mejores extractos para realizar una síntesis verde de nanopartículas de cobre y de yoduro de cobre, las cuales fueron caracterizadas y analizadas por DLS y espectro UV-Visible. Los resultados de la primera parte mostraron que los tres extractos mayor concentración de compuestos fenólicos y mayor porcentaje de capacidad antioxidante, fueron los obtenidos de Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa officinalis* L.), estos poseían 6.6 mg EAG/L, 5.34 mg EAG/L, 5.66 mg EAG/L de concentración de polifenoles y 82%, 63%, 61% de capacidad antioxidante respectivamente. Con estos se sintetizaron nanopartículas de cobre con un tamaño entre 9-10 nm y nanopartículas de yoduro de cobre con un tamaño de entre 8-9 nm.

*Palabras clave:* Polifenoles, capacidad antioxidante, plantas, síntesis verde, nanopartículas

### Abstract

Ecuador has a privileged flora worldwide, which includes a variety of medicinal plants. The secondary metabolites present give plants interesting characteristics because they have antibacterial, antifungal and antiviral properties. However, information on Ecuadorian plants is limited and out of date. The objective of this project is to synthesize nanoparticles, using polyphenolic extracts from Ecuadorian plants: lemon verbena (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Plantain (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) and Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) as reducing and bioprotective agents during the synthesis of copper and copper iodide nanoparticles; and characterize them later. The methodology of this project was divided into two parts, the first consisted of making extracts with different concentrations of ethanol (0%, 20%, 40% and 80%), as well as two shaking methods (orbital and rotational), then the analysis of the concentration of polyphenolic compounds and the percentage of antioxidant capacity was carried out. The second part consisted, based on the analysis, of using the three best extracts to carry out a green synthesis of copper nanoparticles and copper iodide, which were characterized and analyzed by DLS and UV-Visible spectrum. The results of the first part showed that the three extracts with the highest concentration of phenolic compounds and the highest percentage of antioxidant capacity were those obtained from Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) and Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), these had 6.6 mg EAG/L, 5.34 mg EAG/L, 5.66 mg EAG/L of polyphenol concentration and 82%, 63%, 61% antioxidant capacity respectively. With these, copper nanoparticles with a size between 9-10 nm and copper iodide nanoparticles with a size between 8-9 nm were synthesized.

**Keywords:** Polyphenols, antioxidant capacity, plants, green synthesis, nanoparticles

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del Problema

Las plantas medicinales son utilizadas por las comunidades del Ecuador desde el inicio de la civilización, esto se debe principalmente a las características que estas poseen, muchas de las cuales se deben a los compuestos fenólicos que producen las cuales les otorgan propiedades antioxidantes, antivirales, anti fúngicas, entre otras (Valencia-Avilés, y otros, 2017). A pesar de sus características y propiedades los compuestos fenólicos de las plantas medicinales ecuatorianas apenas están estudiándose a fondo, y mucho menos estudiadas aún son las aplicaciones de estos compuestos extraídos de las plantas para la nanotecnología (Yáñez Yunga, 2022).

Por ello, es importante entender la cantidad de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante que se encuentran en plantas medicinales de uso cotidiano como: la hierba luisa, el llantén, la ruda, la santa maría, y el toronjil. Por otro lado, la nanotecnología es una ciencia que ha crecido a nivel exponencial en los últimos años, sin embargo, se están implementando nuevos enfoques para generar nanociencia de una manera más responsable con el medio ambiente.

Las nanopartículas de cobre y de yoduro de cobre poseen la ventaja de que presentan características similares a las nanopartículas de oro y plata a una fracción de su costo. Además, este tipo de nanopartículas poseen aplicaciones diversas especialmente en el área de la electrónica, mecatrónica, farmacéutica y la medicina. El proceso de síntesis de estas nanopartículas es relativamente simple siguiendo protocolos establecidos y al poder realizarse con extractos vegetales se añade la posibilidad de una síntesis verde de nanopartículas.

### Justificación del Problema

Este proyecto de integración curricular se dividió en dos partes, la primera fue realizar los extractos de las plantas medicinales seleccionadas, de las cuales se analizó la concentración de

polifenoles y el porcentaje de capacidad antioxidante. Al ser plantas de uso medicinal se esperó que posean altas cantidades de polifenoles y una buena capacidad antioxidante; debido a que esto podría justificar su uso en medicina ancestral.

Para la segunda parte, se usaron estos extractos para la síntesis “verde” de nanopartículas tanto de cobre como de yoduro de cobre, esto se debe a que la síntesis tradicional de nanopartículas utiliza agentes químicos que son tóxicos o de difícil degradación para el medio ambiente y deben ser desechados correctamente para no causar daños permanentes. Por ello el conseguir una síntesis de nanopartículas a partir de extractos vegetales es importante para estudios y aplicaciones futuras de las nanopartículas sintetizadas por este método.

Las dos partes que constituyen este proyector integrador tienen posibilidades de aplicación en distintas áreas. Solo el conocimiento de la cantidad de compuestos fenólicos como la capacidad antioxidante de cada planta medicinal puede servir como base para otros estudios en áreas de farmacología, alimentos, etc. Por otro lado, las nanopartículas que se generan utilizando los extractos de las plantas medicinales a su vez tienen aplicación en áreas de biofertilizantes, biomedicina, cosmética, alimentos y más; como ha sido estudiando previamente por (Murgueitio, 2018) y (Alharbi, Alsubhi, & Felimban, 2022).

### **Alcance**

Este proyecto de integración curricular tiene un alcance exploratorio tanto cuantitativo como cualitativo. Esto se debe a que una investigación exploratoria se caracteriza por ser aplicada a fenómenos de los que no se conoce o de los que el conocimiento es limitado. Este proyecto de integración curricular entra dentro de esta categoría debido a que las plantas medicinales seleccionadas tienen pocos estudios previos sobre su capacidad antioxidante y sobre la cantidad de compuestos fenólicos que poseen en general; a su vez la síntesis verde de nanopartículas es un protocolo

relativamente nuevo que se ha dado a partir de que se ha observado el impacto negativo de los químicos tradicionales utilizados en la síntesis de nanopartículas.

Este alcance se clasificó de tipo cuantitativo debido a que el diseño experimental que se va a realizar contiene análisis estadístico de los datos que se van a recolectar a lo largo del proyecto. Por otro lado, también tiene un alcance cualitativo debido a que se analizarán la estabilidad de las nanopartículas después de su síntesis.

### **Objetivo general**

Sintetizar nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de plantas de Ecuador: Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Llantén (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa officinalis* L.) y caracterizarlas posteriormente.

### **Objetivos específicos**

- Extraer polifenoles de plantas de Ecuador: Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Llantén (*Plantago major* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L.), Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y Toronjil (*Melissa officinalis* L.), obtenidas del mercado de Conocoto, utilizando 4 diferentes concentraciones de etanol (0%, 20%, 40% y 80%) y dos métodos de agitación (rotacional y orbital); para medir su concentración posteriormente.
- Medir la concentración de polifenoles con la técnica de reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio por medio de absorbancia en el UV-VIS y capacidad antioxidante de los polifenoles con el reactivo DPPH y midiendo la absorbancia en el UV-VIS, en los laboratorios del CENCINAT y comparar estadísticamente los datos obtenidos entre las plantas seleccionadas para seleccionar los 3 extractos con mejores características conjuntas.

- Sintetizar nanopartículas dentro de los laboratorios del CENCINAT, por el método de precipitación a partir de sales de cobre y de yodo, con los 3 extractos de plantas con mayor concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante seleccionados.
- Caracterizar y analizar la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas, mediante DLS y UV-VIS, dentro de los laboratorios del CENCINAT, para corroborar que los extractos polifenólicos de plantas funcionan para una correcta síntesis de nanopartículas.

### **Hipótesis**

Los extractos polifenólicos con alta concentración de fenoles, obtenidos de plantas de Ecuador, funcionan como agentes estabilizantes y reductores en la síntesis de nanopartículas.

## **Capítulo II: Marco teórico**

### **Plantas medicinales en Ecuador**

La medicina ancestral se basa en el uso de plantas, frutas, hongos, entre otros organismos que se encuentran en la naturaleza, para elaborar diferentes productos medicinales a partir de estos para brindar a las comunidades (Bottaso, 2019). Este tipo de medicina, como su nombre lo dice ha sido utilizada desde el principio de los tiempos y continua hasta el día de hoy, en Ecuador existen según el Consejo de Desarrollo de las Nacionalidades y Pueblos del Ecuador (CODENPE), 18 pueblos indígenas en el país, los cuales se encuentran distribuidos en las cuatro regiones del país (FLACSO Ecuador, 2015). Ecuador es considerado un país relativamente pequeño, pero con enorme biodiversidad vegetal, contando aproximadamente con 1700 de plantas (Yáñez Yunga, 2022).

Las plantas medicinales se usan debido a que poseen compuestos conocidos como metabolitos secundarios, que le otorgan a la planta mecanismos de defensa ante otros organismos y sirven para una mejor adaptación al estrés biótico (Rodríguez-Hernández, 2019). En Ecuador, las plantas comunes de uso medicinal de la sierra incluyen: la ruda, la hierba luisa, el llantén, la santa maría y el toronjil (Mazón,

Castillo, Velásquez, & Barrera, 1997); pueden ser encontradas con facilidad en los mercados de la ciudad, esto se debe a que su uso sigue siendo común entre los ciudadanos, dentro de los mercados las vendedoras ayudan a los clientes a encontrar las plantas para cada enfermedad. El uso de las plantas medicinales ha sido pasado de generación en generación, es por ello que las abuelas conocen la combinación de las plantas y el uso que se le da a cada una de ellas (El Tiempo, 2018). En el 2019 se elaboró la guía “Plantas Medicinales de Mercados de Quito”, dentro de esta se encontraron 40 plantas de uso y venta dentro de los establecimientos, en la lista están las 5 plantas que se van a analizar durante este proyecto integrador (Monar, Lagla, & López, 2019).

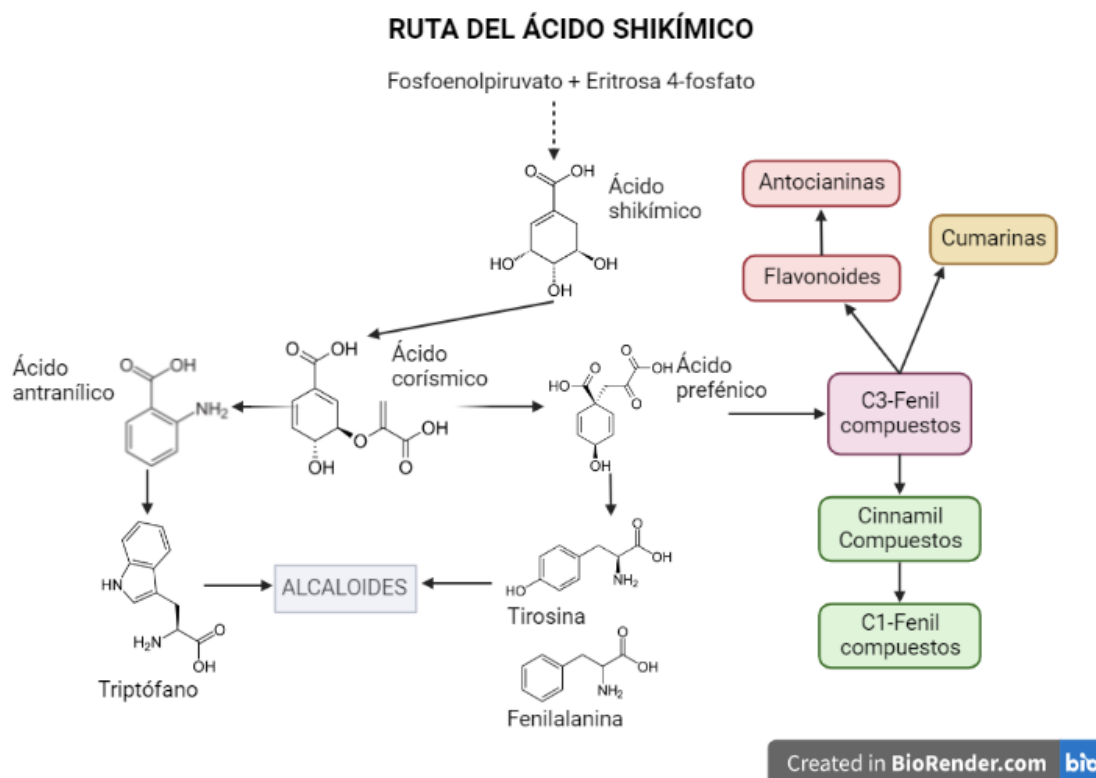
### **Compuestos polifenólicos en plantas medicinales**

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que poseen las plantas como metabolitos secundarios, cada planta tendrá diferentes compuestos y en diferentes cantidades. La clasificación de compuesto polifenólicos más común es la de Harborne (Harborne, 1973), la cual los clasifica según su esqueleto de carbono. Estos basan su jerarquía en el número de anillos de benceno que posee la estructura del metabolito y las cadenas que se encuentren unidas al anillo. A su vez también existen compuestos que se clasifican como poliméricos (Jordá, 2020), los cuales son estructuras repetidas y los híbridos, los cuales están unidos a otras estructuras como terpenos, estructuras con un anillo de benceno y un carbono, o lípidos, cadenas largas de hidrocarburos lineales (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019). Estos compuestos provienen de la ruta biosintética del ácido shiquímico la cual se observa en la Figura 1.



Figura 1

Ruta del ácido shikímico la cual es la principal ruta en plantas para la generación de metabolitos secundarios.



Existen más de 8000 compuestos fenólicos encontrados en diferentes plantas (Garrido, Cosme, Rodríguez, & Espino Javier, 2020), cada planta presenta compuestos distintos que se adaptan al estrés abiótico o biótico que la planta deba enfrentar y de ello también dependerá la cantidad de los compuestos fenólicos encontrados. Estos fitoquímicos son la razón por la cual se utilizan las plantas como medicinas herbales debido a que se han identificado importantes propiedades en la salud humana como: actividad antioxidante, antiviral, antibacteriana, anti fúngica, antiinflamatoria, entre muchas otras (Tungmunnithum, Thongboonyou, Pholboon, & Yangsabai, 2018).

La actividad antioxidante es una de las propiedades de mayor interés cuando se analizan las plantas y sus metabolitos, esta se debe a los compuestos polifenólicos de ellas, algunos de estos se describen en la Tabla 1. La actividad antioxidante es la encargada de evitar que las especies reactivas de oxígeno (ROS) causen oxidaciones prematuras a los organismos, en este caso el polifenol se reduce en lugar de que se vean afectados metabolitos del organismo, lo que en el caso de los humanos puede conllevar cáncer o desarrollo de otras enfermedades (Fernández-Panchón, Villaño, Troncoso, & García, 2006). La actividad antioxidante está relacionada con la estructura química del metabolito y del agente oxidante, la habilidad para formar puentes de hidrógeno, la capacidad de la reducción de metales y el potencial oxidativo. Estas dos últimas son unas de las características que permiten que los extractos de plantas sean una alternativa para ser usados como agente reductores y bioprotectores en la síntesis de nanopartículas (Olszowy, 2019).

**Tabla 1**

*Valores de potenciales de reducción de algunos polifenoles* (Santos-Espinoza, Gutiérrez-Miceli, Ruíz-Vadiviezo, & Montes-Molina, 2020)

<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>[V]*</b>	<b>Referencia</b>
<b>Miricetina</b>	0.20	(Freeman, Eggett, & Parker, 2010)
<b>Quercentina</b>	0.29	(Freeman, Eggett, & Parker, 2010)
<b>Ácido Cafeico</b>	0.45	(Simić, Manohlović, Segan, & Todorovic, 2007)
<b>Catequina</b>	0.36	(Butkovic, Klasinc, & Bors, 2004)
<b>Ácido Clorogénico</b>	0.39	(Sousa, Da Rocha, Cardoso, Silva, & Zanoni, 2004)
<b>Kaempferol</b>	0.39	(Butkovic, Klasinc, & Bors, 2004)
<b>Fisetina</b>	0.39	(Gil & Couta, 2013)
<b>Luteolin</b>	0.41	(Freeman, Eggett, & Parker, 2010)
<b>Ácido Ferúlico</b>	0.53	(Sousa, Da Rocha, Cardoso, Silva, & Zanoni, 2004)
<b>Ácido p-cumárico</b>	0.59	(Freeman, Eggett, & Parker, 2010)
<b>Hesperetina</b>	0.72	(Freeman, Eggett, & Parker, 2010)
<b>Narigenina</b>	0.76	(Freeman, Eggett, & Parker, 2010)

*Nota: En la tabla se muestran los potenciales de reducción de polifenoles encontrados en plantas medicinales. \*Las unidades de medida para este factor es de voltios debido a que se usa una celda electroquímica para obtenerlos.*

### **Síntesis verde de nanopartículas**

La nanociencia es una rama de la ciencia que está en crecimiento exponencial en los últimos años, parte de ella es la síntesis de nanopartículas. Las nanopartículas de diferentes metales como oro, plata, cobre, y zinc se están utilizando para aplicaciones que van desde productos medicinales, hasta cosmética e incluso la industria textil (El-Shafey, 2019). Sin embargo, la síntesis tradicional de las nanopartículas incluye químicos que generan residuos tóxicos a una escala nanométrica; los cuales deben desecharse correctamente para evitar que tengan un impacto negativo en el ambiente (Jadoun, Arif, Kumari, & Kumar, 2020). Además del efecto negativo para el ambiente, las técnicas fisicoquímicas para la síntesis tradicional de nanopartículas resultan costosas y poseen un consumo sumamente alto de energía, por lo que causan que el precio de las nanopartículas sintetizadas aumente (Waris, y otros, 2021).

La conocida “química verde” es una nueva manera de hacer ciencia con un enfoque más amigable con el medio ambiente, este tipo estudio inició aproximadamente hace 15 años debido al rápido avance del cambio climático (Pájaro & Olivero, 2011). La síntesis verde de nanopartículas incorpora este tipo de acercamiento utilizando extractos de plantas, bacterias y hongos para utilizarlos como agente reductores y estabilizantes (Badri & Sakthivel, 2011). Un agente reductor es aquel que pasa electrones a otra sustancia conocida como agente oxidante y la reduce (Chang, Kenneth, Alvarez, & Ponce, 2013). De esta manera se consigue una síntesis más barata, debido a que obtener estos extractos naturales aminora el costo de los procesos, el gasto energético es menor debido a que los desechos no deben ser tratados; lo que en la síntesis tradicional involucra un proceso adicional (Alárcon, Tolmos, Villacrés, & Huarote, 2021). Finalmente, la síntesis verde es un procedimiento que lleva estudiándose poco y para perfeccionarlo se debe continuar investigando con extractos de diferentes organismos.

Las plantas en específico tienden a ser más fáciles de usar para este tipo de síntesis debido a que el obtener los extractos es sumamente sencillo pues son fábricas de químicos naturales, son costo-eficientes y necesitan poco mantenimiento (Iravani, 2011). Además, los extractos de las plantas pueden obtenerse de partes específicas como: hojas, frutos, semillas, entre otros; los cuales individualmente o en conjunto poseen gran cantidad de fitoquímicos útiles para la síntesis (Jadoun, Arif, Kumari, & Kumar, 2020). Las plantas fueron de los primeros organismos en ser estudiados, sorprendiendo a los científicos por la complejidad de sus rutas metabólicas. Ahora, los metabolitos obtenidos a partir de estas rutas son de uso para la síntesis de nanopartículas debido a la capacidad antioxidante que poseen (Chand, y otros, 2020).

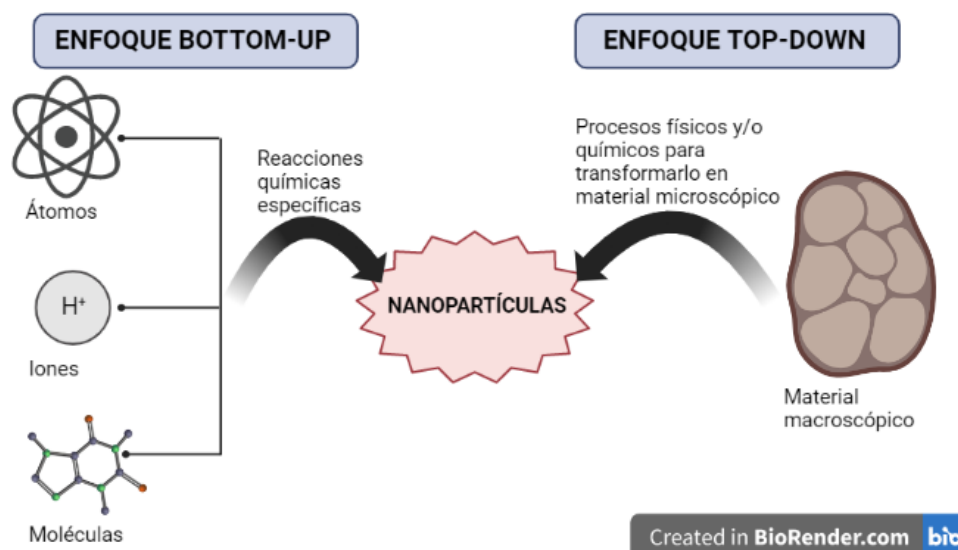
Los extractos de plantas son los más estudiados al momento de realizar síntesis verde de nanopartículas, sin embargo, es importante que los extractos posean ciertas características para una síntesis exitosa. Entre esas características es que la planta posea gran cantidad de metabolitos secundarios como flavonoides y compuestos fenólicos (Alharbi, Alsubhi, & Felimban, 2022); Otra característica deseada es que la capacidad antioxidante sea alta, debido a que de esta depende la capacidad de reducción del extracto, es decir la capacidad de donar electrones al agente oxidante, que en este caso sería la sal del metal (El-Shafey, 2019). Además, se busca que las plantas usadas sean de fácil acceso y que no se encuentren protegidas o en peligro de extinción porque se perdería el objetivo de química verde. Es importante mencionar que en este tipo de síntesis depende de controlar correctamente parámetros como: el periodo de incubación, el pH y la temperatura (Singh, Kim, Zhang, & Yang, 2016).

Para la síntesis de nanopartículas existen dos tipos de enfoques, “bottom-up” y “top-Down”, estos se pueden observar en la Figura 2 (Zanella, 2012). El primer tipo se basa en empezar la síntesis desde abajo, es decir con unidades más pequeñas que las nanopartículas como átomos. Mientras que el enfoque de “top-Down” consiste en sintetizar nanopartículas a partir de un material más grande

después de pasarlo por procesos físicos o químicos para disminuir su tamaño hasta alcanzar la escala nanométrica, es decir menor a 100nm (Sebastián, 2018) . En el caso de la síntesis a partir de extractos de plantas, esta se clasifica en un enfoque “bottom-up” debido a que se empieza la biosíntesis a partir de los extractos de plantas, los cuales tienen moléculas más pequeñas, que después al mezclarlas con otras sustancias químicas a través de protocolos específicos se obtendrán las nanopartículas (Jadoun, Arif, Kumari, & Kumar, 2020).

**Figura 2**

*Explicación gráfica de los enfoques “bottom-up” y “top-Down” de la síntesis de nanopartículas.*



### **Nanopartículas de Cobre**

Las nanopartículas de metales tienen diferentes usos desde su descubrimiento por Faraday, estos dependen directamente del tamaño, forma y estructura de las nanopartículas (Imran Din & Rehan, 2017); lo cual a su vez está ligado al metal de las cuales están elaboradas y el método de síntesis. El uso de metales para sintetizar nanopartículas se debe a que poseen características de interés como la sensibilidad UV-Visible; es decir que puede absorber la luz a diferentes nanómetros y de esta manera generar una curva característica, propiedades catalíticas, eléctricas, térmicas y antibacterianas (Wang,

2000). La síntesis verde de nanopartículas de metales es un proceso simple que consta de reducir las sales del metal seleccionado mezclando la solución de la sal con los extractos de las plantas para generar un cambio de color, una vez que ha cambiado el color, quiere decir que se han formado nanopartículas (Al-Hakkani, 2020).

Entre los metales más usados para sintetizar nanopartículas están el oro, la plata y el cobre. Los dos primeros suelen tener una estabilidad mayor, pero a su vez un costo más elevado que las nanopartículas de cobre (Cadenas, 2021). El cobre, presenta conductividad eléctrica alta, capacidad de conducción de calor elevada, resistencia a la corrosión y tiene una fácil manejabilidad (Al-Hakkani, 2020). Esto ha hecho que la sociedad lo utilice durante el desarrollo de nueva maquinaria y estructuras a escala macroscópica. Por ello, en la actualidad también se han analizado los usos que se le puede dar en escala microscópica. En esta escala el cobre interviene en procesos importantes en la salud humana y es parte esencial para algunas enzimas (Feoktistova & Clark, 2018).

La nanociencia también ha estudiado al cobre y se ha descubierto que las nanopartículas de cobre poseen una relación superficie/volumen grande, por lo que resultan sumamente reactivas (Guzmán Duxtán, Rengifo, & Echevarría, 2020); esto causa que tenga facilidad de interactuar con otro tipo de partículas lo que es de interés en áreas como la farmacología porque a su vez esto está relacionado con la eficacia antimicrobiana. El problema constante con la síntesis exitosa de nanopartículas de cobre es que tiende a oxidarse con facilidad debido a que sus especies oxidadas son más termodinámicamente estables (Al-Hakkani, 2020). Por ello, la síntesis de estas nanopartículas suele ser más tediosa o debe realizarse en línea de gas noble o en una atmósfera inerte. Lastimosamente, las nanopartículas de cobre en su estado oxidado tienen una conductividad eléctrica mucho menor que las nanopartículas de cobre no oxidadas, este es un problema que para industrias como la electrónica no son deseables. (Yabuki & Arrifin, 2010)

La síntesis de nanopartículas de cobre tiene 3 posibles alternativas en caso de que las nanopartículas si hayan sido sintetizadas: se obtendrán nanopartículas frescas y sin oxidarse, se obtendrán nanopartículas oxidadas o se obtendrán nanopartículas agregadas (Kapoor, Joshi, & Mukherjee, 2002). Estas se pueden identificar por diferentes colores presentes; las nanopartículas frescas tienden un color cobrizo o rojizo; las nanopartículas oxidadas tienen un color amarillo y las nanopartículas agregadas tienen un color negruzco o verdoso (Markina, Pozharov, & Markin , 2016). Estas diferencias cualitativas también se pueden observar cuantitativamente leyendo la absorbancia en el UV-Visible, las nanopartículas normales suelen tener un pico notorio alrededor de 600nm, las nanopartículas oxidadas tienen un pico entre 300-400 nm y las nanopartículas agregadas no tienen un pico tan notorio pero una curva entre 600-650 nm (Markin & Markina, 2019). Las nanopartículas oxidadas, es decir de óxido de cobre, poseen características disminuidas que las nanopartículas no oxidadas; por ejemplo, seguirán siendo conductoras de calor y de electricidad, pero en menor medida. Mientras que las nanopartículas agregadas tienden a ser de tamaño mayor perdiendo levemente su característica “nano”. Sean oxidadas o sin oxidar, las nanopartículas de cobre presentan ventajas de precios y aplicaciones. Entre las aplicaciones de mayor interés para las nanopartículas de cobre están el área tecnológica debido a que presentan un metal más accesible para generar nanotecnología. También es de interés en el área farmacéutica debido a que como se mencionó con anterioridad el cobre es un metal esencial en muchas enzimas del cuerpo humano, por lo que tendría aplicaciones importantes en esta área.

### **Nanopartículas de yoduro de cobre**

El yoduro de cobre (CuI) es un halogenuro metálico semiconductor, se puede encontrar en la naturaleza, pero también se lo puede conseguir sintetizándolo a partir de reacciones químicas de óxido-reducción (Zanella, 2012). Este haluro presenta además propiedades ópticas inusuales que incluyen: depende casi por completo de la temperatura, posee gran ionicidad (gran cantidad de enlaces iónicos),

además de un comportamiento anómalo del diamagnetismo (una manera inusual de repeler un campo magnético), una fase de alta presión, entre otras (Abass, Alaubydi, & Ulwali, 2020). Estas características son las razones para usar al yoduro de cobre como un conductor superiónico, es decir presenta una conductividad iónica (la habilidad de conducir energía) inusualmente alta (Dieterich, 1985) y por lo que las nanopartículas de este halogenuro metálico se están estudiando mucho más en la actualidad (Vijayakumar & Rajagopal, 2016). El cobre solo como metal para nanopartículas ya tiene mucha atención de los científicos, el yoduro de cobre (CuI) está llamando la atención debido a que posee propiedades especiales, mencionadas anteriormente. La síntesis tradicional de nanopartículas de yoduro de cobre requiere sustancias tóxicas, agentes químicos reductores y temperaturas altas para una buena síntesis lo que conlleva una amenaza al medio ambiente si no se desechan los residuos correctamente (Archana, Rajagopal, Gayathri, & Aishwarya, 2021).

Ya existen estudios para la síntesis verde de nanopartículas de yoduro de cobre, se han sintetizado con extractos de *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (Fernandez, Archana, & Rajagopal, 2020) y con extractos de semilla de *Phaseolus vulgaris* (Vijayakumar & Rajagopal, 2016). Ambos extractos fueron seleccionados debido a que poseen gran cantidad de antocianinas, lo que está ligado a que son agentes reductores fuertes y tienen la capacidad de usarse para reducir, bioproteger y estabilizar en la síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre. La síntesis tradicional y la síntesis verde de nanopartículas han mostrado resultados prometedores generando nanopartículas con aplicaciones variadas entre las más notorias están una alta citotoxicidad para bacterias y hongos; además se han hecho pruebas para utilizar las nanopartículas de yoduro de cobre para utilizarlas en telas de mascarillas y así lograr una mejor protección contra la pandemia del COVID-19 y las pandemias que puedan venir en el futuro (Archana, Rajagopal, Gayathri, & Aishwarya, 2021).



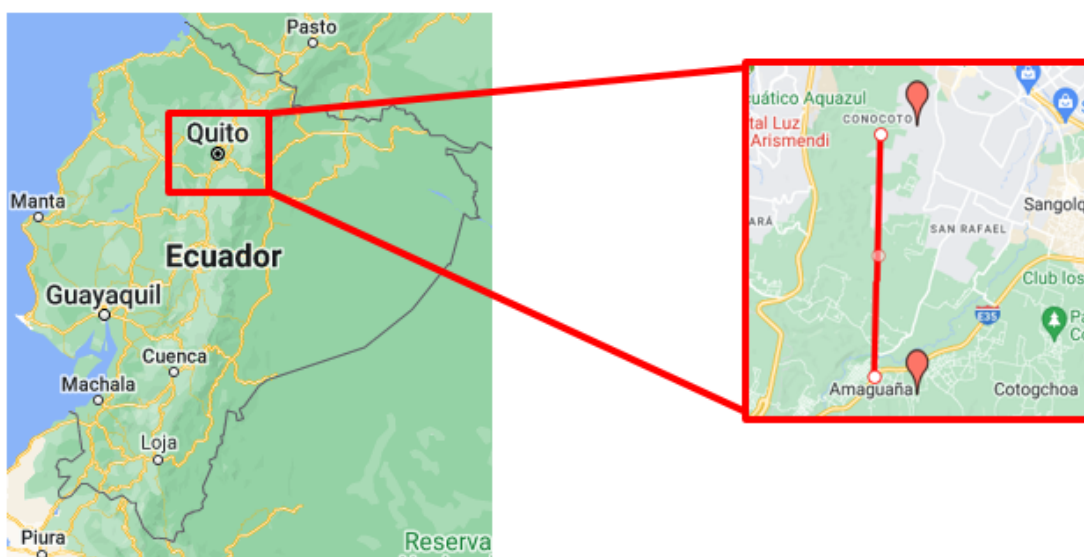
### Capítulo III: Materiales y Métodos

#### Preparación de las plantas para los extractos

Las plantas se obtuvieron del mercado ubicado en la parroquia de Conocoto, del cantón Quito, provincia de Pichincha. Todas las muestras se llevaron al mercado la parroquia Amaguaña del cantón Quito, provincia de Pichincha; las cuales se encuentran a aproximadamente 30 minutos de distancia entre ellas. Las muestras obtenidas se seleccionaron frescas, el mapa aproximado de la ubicación se observa en la Figura 3.

#### Figura 3

*Mapa del lugar de recolección de las muestras en Amaguaña, (Lat. -0.3871685328900406; Long. -78.50012708626325); y el lugar donde se compraron las muestras en el mercado de Conocoto, (Lat. -5.5695462; Long. -79.526038443357).*



Se procedió a lavar las muestras con jabón neutro de manos y agua potable, asegurando que se retiraran insectos y cualquier suciedad de las muestras. Se utilizaron solo las plantas que no presentaban ningún hongo o bacteria a la vista. Se desinfectaron los cuchillos, tijeras, mesas y cualquier otro material que se fuera a utilizar con alcohol al 70%. Una vez completado el protocolo de limpieza se cortaron el

tallo, las hojas y las flores (de ser el caso) de las plantas medicinales seleccionadas en pedazos pequeños y uniformes.

### **Determinación de humedad en las muestras**

Para determinar de humedad se utilizó el método conocido como “Secado al Horno” (Ranganna, 1977), el cual se basa en la diferencia de peso que existe entre la muestra fresca y la muestra seca, después de haberla mantenido en un horno o estufa por un tiempo determinado. Para determinar la cantidad de humedad de cada una de las muestras, se procedió a utilizar la fórmula presente en la Ecuación 1. Se registró el peso inicial de cada muestra, a continuación, se colocó en la estufa marca Memmert SN30, por 2 horas a 105°C y después en el desecador de cristal por otros 30 minutos. Una vez terminado este proceso se registró el peso final de la muestra y se realizaron los cálculos correspondientes para el porcentaje de humedad de cada planta.

### **Ecuación 1**

*Fórmula utilizada para determinar el porcentaje de humedad en cada una de las muestras de plantas por analizar.*

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\text{Peso}_{\text{Húmedo}} - \text{Peso}_{\text{Seco}}}{\text{Peso}_{\text{Húmedo}}} * 100$$

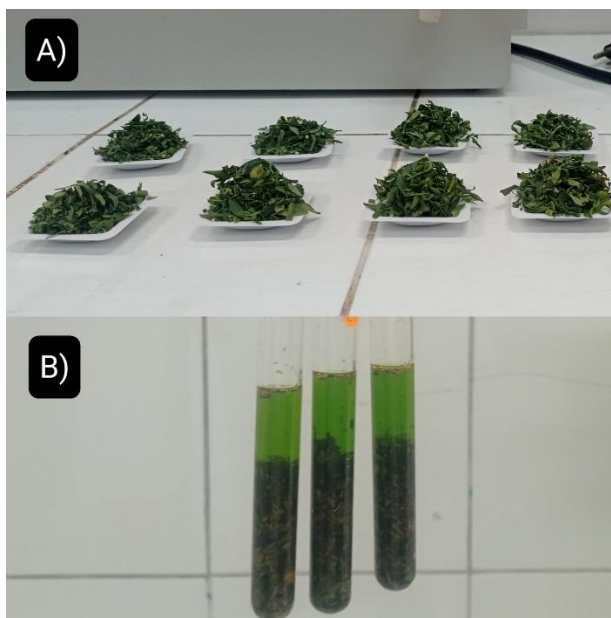
### **Extracción de compuestos polifenólicos de plantas**

El protocolo de extracción se basó en protocolos realizados anteriormente por (Manriquez , 2022) y (Salgado, 2018). Se realizó la extracción de 5 plantas de uso medicinal en Ecuador: hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), llantén (*Plantago major* L.), ruda (*Ruta graveolens* L.), santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y toronjil (*Melissa officinalis* L.); Se tomaron en cuenta variables tanto de concentración de etanol como del tipo de agitación. Para ello se varió la concentración de etanol al 0%, 20%, 40% y 80%. Mientras que los tipos de agitación que se usaron fueron orbital y

rotacional. Se pesaron 3 gramos de la planta previamente cortada y se los colocó en tubos de ensayo con 10 ml de etanol a la concentración necesaria por triplicado; esto se repitió para cada planta, en ejemplo de este procedimiento se observa en la Figura 4. Se colocó los tubos de ensayo en la agitación respectiva, cada muestra se realizó por triplicado, teniendo un total de 24 muestras diferentes por planta. En la agitación rotacional se dejó a las muestras toda la noche en rotación en el agitador rotativo marca SIEMENS y al día siguiente se obtuvieron los extractos. Por otro lado, la agitación orbital se realizó en el equipo WiseShake a 115rpms por 2 horas. Este procedimiento se observa en la Figura 5.

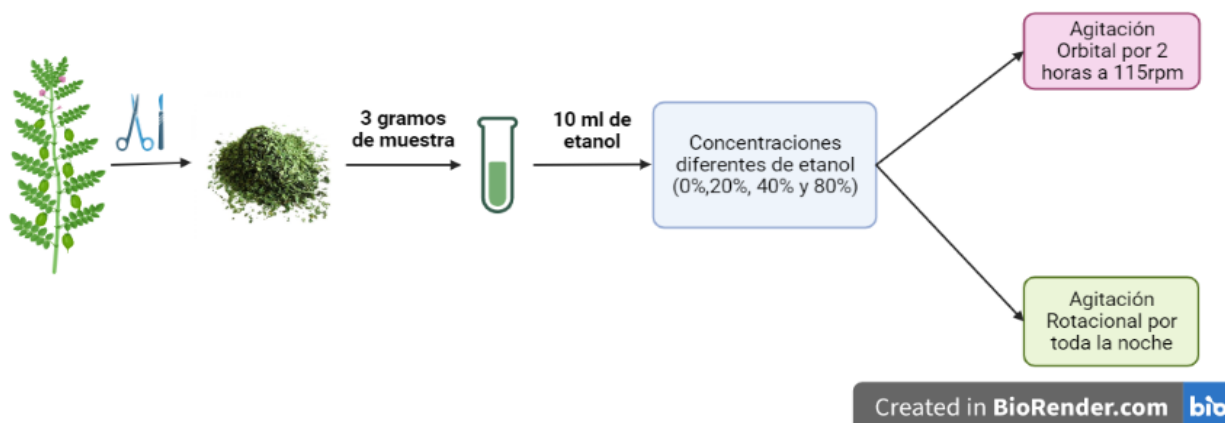
#### Figura 4

A) Separación de las muestras de toronjil (*Melissa officinalis* L.), previamente cortadas para colocarlas en los tubos de ensayo correspondientes. B) Extractos después del protocolo de extracción de toronjil (*Melissa officinalis* L.) por agitación rotacional.



**Figura 5**

*Protocolo gráfico y resumido de la extracción de compuestos polifenólicos a partir de las diferentes plantas.*



### **Medición de la concentración de compuestos fenólicos**

Para la medición de la concentración de compuestos fenólicos se utilizó el protocolo estándar por (Dewanto, Wu, Adom, & Liu, 2002), se incluyeron modificaciones realizadas por (Salgado, 2018) con ciertas alteraciones, las cuales constituyeron en realizar filtraciones de las soluciones para obtener mejores resultados.

### **Curva de calibración**

Se realizó la curva de calibración a partir de ácido gálico marca FISHER S., carbonato de sodio marca SIGMA y reactivo de Folin-Ciocalteu marca MP. Esta se realizó debido a que se usan concentraciones conocidas de ácido gálico, a partir de las cuales se obtienen absorbancias; al analizar las muestras se obtuvieron por su lado las absorbancias a partir de las cuales se obtuvieron las concentraciones en unidades de equivalentes ácido gálico por litro (mg EAG/L). Se preparó la solución de carbonato de sodio al 20%, mezclando 20 gramos de carbonato de sodio y aforándolos a 100ml en un matraz, se filtró esta solución antes de usarla en la curva de calibración y en el análisis de las muestras.

Después se preparó la solución de ácido gálico, previo a la preparación se cubrió un balón de 250ml con papel aluminio para protegerlo del sol; se pesaron 0,025 gramos de ácido gálico, se lo colocó en el matraz y se completó el volumen con agua destilada. Así se obtuvo una solución de ácido gálico de 0.1g/L. Finalmente para la preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu, se necesita una solución 1N, la disponible dentro del laboratorio es 2N por lo que se diluyó con agua destilada en una proporción 1:1 de agua y de reactivo; Primero se debe proteger el matraz de la luz solar con papel aluminio. Para preparar la solución se mezclaron 15 ml del reactivo con 15 ml de agua destilada. Todas las soluciones se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

Para la curva de calibración se realizaron soluciones de ácido gálico de concentración 5mg/L, 4mg/L, 3mg/L, 2mg/L, 1mg/L y 0mg/L. Para ello se hizo una solución patrón de 10ml de concentración 5mg/L de ácido gálico en un matraz ámbar, para ello se colocaron 0.5ml de la solución 1g/L de ácido gálico y se colocó 9.5ml de agua destilada. A partir de esta se realizaron las diluciones mostradas en la Tabla 2 para obtener las diferentes concentraciones de ácido gálico.

**Tabla 2**

*Diluciones de la sustancia patrón de ácido gálico para obtener las sustancias de diferentes concentraciones que se van a usar para la curva de calibración.*

Número de dilución	Concentración inicial de la solución	Volumen de la solución inicial	Volumen de agua destilada	Concentración final de la solución
1	5 mg/L	6,4 ml	1.6 ml	4mg/L
2	4mg/L	4.5 ml	1.5ml	3mg/L
3	3mg/L	2.67 ml	1.33ml	2mg/L
4	2mg/L	1.5 ml	1.5 ml	1mg/L

A partir de todas estas diluciones, se va a tomó 1.5ml de ellas y se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu y el carbonato de sodio siguiendo la Tabla 3, tomando en cuenta que todas se realizaron en

frascos ámbar y debían estar protegidas de la luz solar directa. Parte de este procedimiento se observa en la Figura 6.

**Tabla 3**

*Preparación de las soluciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu y el carbonato de sodio para la elaboración de la curva de calibración.*

Muestra	Concentración Ac. Gálico (1.5ml)	Reactivo de Folin-Ciocalteu		Carbonato de sodio
1	0mg/L	250 ul	<b>Agitación por 5 minutos utilizando el ultrasonido</b>	250 ul
2	1mg/L	250 ul		250 ul
3	2mg/L	250 ul		250 ul
4	3mg/L	250 ul		250 ul
5	4mg/L	250 ul		250 ul
6	5mg/L	250 ul		250 ul

**Figura 6**

*Preparación de las soluciones para la curva de calibración de ácido gálico*



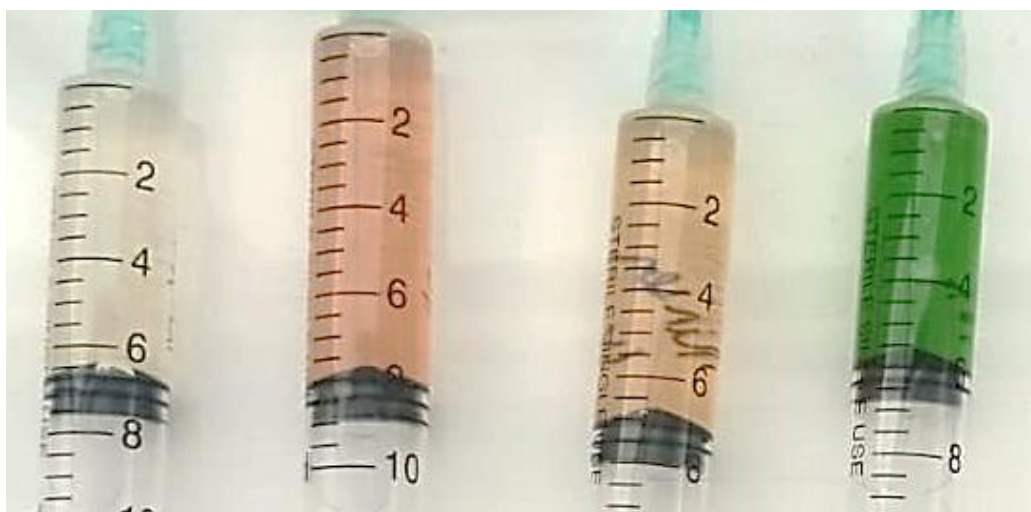
A continuación, se midió la absorbancia a 760nm de cada una de las muestras en el espectrofotómetro de UV-Visible y se obtuvo la curva de calibración.

### *Preparación de las muestras*

Se separó el sobrenadante de los extractos utilizando una centrífuga marca ThermoFisher a 3000rpm durante 5 minutos, este sobrenadante se colocó en otros tubos previamente etiquetados y limpios, utilizando jeringas para una fácil extracción después del centrifugado; este procedimiento se observa en la figura 7. Una vez que obtenidos los extractos, se los colocó en baño maría marca Fisherbrand modelo CPX8800 a 40°C entre 10-15 minutos para evaporar los rastros de etanol sobrantes, hasta que el olor característico a etanol ya no se pudo oler en las muestras; esto se hizo para que el etanol utilizado en la extracción no interfiera en la lectura de la concentración de polifenoles. Se preparan las muestras siguiendo el protocolo de (Salgado, 2018), haciéndose diluciones 1:1000 de cada extracto colocando 100ul del extracto en 10ml de agua destilada tipo 1.

### **Figura 7**

*Extracción de los sobrenadantes de las muestras de llantén (Plantago major L.) por agitación orbital*



Nota: De izquierda a derecha se observan las extracciones con concentración de etanol 0%, 20%, 40% y 80%.

### *Medición de la concentración de compuestos fenólicos en los extractos*

En diferentes viales ámbar se tomó 0.5ml de cada dilución y se mezcló con 0.75ml de reactivo de Folin-Ciocalteu de concentración 1N preparado previamente para la curva de calibración, y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se agregaron 0.75ml de la solución de carbonato de calcio al 20% preparada previamente. A continuación, se agitaron fuertemente los viales por 5 minutos y se los dejó reposar por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad; los viales preparados se observan en la Figura 8. Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 760nm en el UV-Visible y se leyeron los resultados de cada extracto por triplicado.

**Figura 8**

*Proceso de medición de la concentración de compuestos polifenólicos*



Nota: A) Preparación de los viales para la medición de la concentración de compuestos fenólicos B) celda con la reacción característica donde se observa un cambio de color a azul al reaccionar los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu y el carbonato de sodio al 20%

### **Diseño experimental para la medición de la concentración de compuestos fenólicos en los extractos**

Para la concentración de compuestos fenólicos en los extractos se realizó un diseño en cuadro factorial, debido a que de esta manera se pudieron controlar varios factores de bloque. Se midieron cada una de



las concentraciones por triplicado para realizar un análisis estadístico tipo ANOVA de tres vías, en ella se analizaron los factores de: Tipo de planta, Tipo de agitación y Concentración de Etanol; analizándose los datos de concentración de compuestos fenólicos en los extractos. Para este análisis se usó la Tabla 4 como diseño experimental preliminar para la concentración de compuestos fenólicos en los extractos.

**Tabla 4**

*Diseño experimental preliminar sobre la concentración de polifenoles a analizarse*

Tipo de Agitación	Concentración de Etanol	Concentración de polifenoles en la muestra				
		Hierba luisa	Llantén	Ruda	Santa maría	Toronjil
ORBITAL	0%					
	20%					
	40%					
	80%					
ROTACIONAL	0%					
	20%					
	40%					
	80%					

Nota: Dependiendo de los factores de concentración de etanol y el tipo de agitación como las variables independientes para la extracción, mientras que la concentración de fenoles se midió por triplicado y será la variable dependiente.

#### **Medición de la capacidad antioxidante**

Para la capacidad antioxidante se usaron protocolos de (Mejía, Salcedo, Vargas, Serna, & Torres, 2018) y (Ruiz, Venegas, Valdivieso, & Plasencia, 2018), los cuales se basa en el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) descubierto por Blois en 1958, este método se relaciona con atrapar los radicales libres, como ROS (especies reactivas de oxígeno), haciendo que la solución DPPH reaccione con un sustrato antioxidante (polifenoles) y acepte un átomo de hidrógeno, haciendo que el color de la muestra cambie de color morado intenso a amarillo. Este método se realizó solamente en los extractos con mayor

concentración de compuestos polifenólicos obtenidos con el protocolo anterior de cada una de las plantas. Para este método se preparó el DPPH pesando 3.9mg del radical DPPH marca SIGMA en un matraz aforado de 100ml previamente protegido del sol con papel aluminio, en este se colocó el DPPH pesado y se aforó con metanol al 80%. Se colocó la solución en el sonicador marca Cole-Parmer por 20 minutos para asegurar una adecuada disolución. En la celda se coloca 1ml de DPPH y se toman 200ul de los extractos seleccionados de cada planta sin diluirlos. Se leyeron en el UV-VIS a 517nm primero el DPPH sin la muestra y después de colocar la muestra cada 2 minutos por 10 minutos, tomando un total de 6 mediciones al igual que realizó previamente (Ruiz M. , 2020). Se repitió el proceso para cada extracto. Una vez que se han realizado todas las mediciones se utiliza realizaron los cálculos con la Ecuación 2 y se obtuvieron los porcentajes de capacidad antioxidante para cada extracto analizado.

## **Ecuación 2**

*Ecuación usada para determinar el porcentaje de capacidad antioxidante en las muestras de plantas a analizar. Fuente: (Ruiz M. , 2020)*

$$\% \text{ de Capacidad Antioxidante} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}}}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} * 100$$

## **Diseño experimental para el porcentaje de capacidad antioxidante**

El diseño experimental para el porcentaje de capacidad antioxidante en las muestras de plantas se llevó a cabo analizando el extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos para cada planta. Una vez seleccionado este extracto se realizó el análisis anteriormente explicado y se realizó un diseño experimental preliminar para analizar el Tipo de planta y los datos obtenidos de porcentaje de capacidad antioxidante, la Tabla 5 es la tabla preliminar para este diseño experimental. Para el análisis estadístico se realizó un análisis ANOVA de una vía con este se comparó los tipos de planta con los datos obtenidos para el porcentaje de capacidad antioxidante.

Tabla 5

*Diseño experimental preliminar sobre el porcentaje de capacidad antioxidante a analizarse*

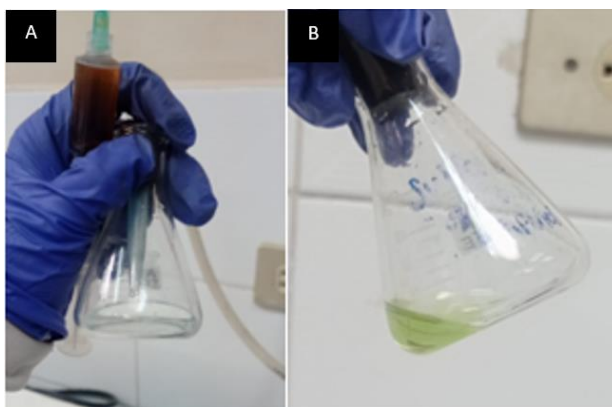
Medidas de Absorbancia (nm)	Porcentaje de Capacidad Antioxidante				
	Hierba luisa	Llantén	Ruda	Santa maría	Toronjil
Medida 1					
Medida 2					
Medida 3					
Medida 4					
Medida 5					

### Síntesis de nanopartículas de Cobre

Una vez que se ha analizado tanto la capacidad antioxidante como la concentración de polifenoles, se eligieron los 3 extractos que presentaron la mayor concentración de compuestos polifenólicos y la mayor capacidad antioxidante. Con ellos se procedió a realizar una síntesis de nanopartículas de cobre. La síntesis se realizó en línea de gas noble, en este caso se usó gas nitrógeno debido a que estaba disponible en el laboratorio. Se burbujea este gas en cada una de las sustancias previo y durante la síntesis como se observa en la Figura 9.

Figura 9

*Proceso de síntesis de nanopartículas en línea de gas nitrógeno*



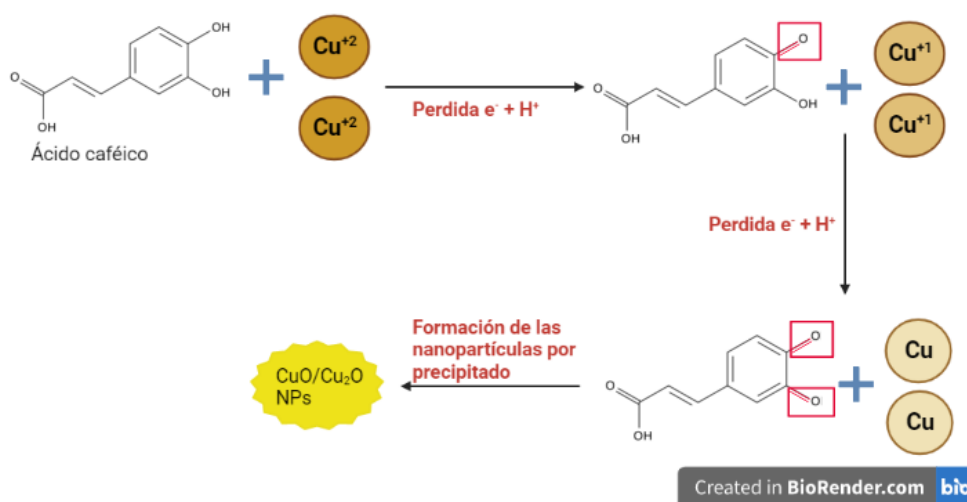
Nota: A) proceso de síntesis de nanopartículas en línea de gas. B) cambio de color observable después de agregar el extracto de plantas usado como agente reductor durante la síntesis de nanopartículas.

Se preparó una solución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 0.01M, colocando 0.038 gramos del reactivo sulfato de cobre pentahidratado marca FISHER S. con 15ml de agua destilada tipo 1 en un matraz limpio y etiquetado. Después procedió a elaborar una solución de 150ml de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 0,01M, esto se hizo pesando 0.06 gramos de  $\text{NaOH}$  marca FISHER S. y completando el volumen con agua destilada tipo 1.

Las posibles reacciones y el mecanismo de reacción que se lleva a cabo durante la síntesis se detallan en la Figura 10 y en la Ecuación 3, no se puede saber con certeza las interacciones que ocurren debido a que se está trabajando con un extracto de varios compuestos fenólicos, los cuales pueden interactuar todos a la vez en la formación de las nanopartículas.

**Figura 10**

*Mecanismo de reacción entre los polifenoles presentes en los extractos de las plantas y la sal de cobre.*



Nota: En este caso se toma como polifenol genérico al ácido caféico, como se presentó en el marco teórico el potencial redox del ácido caféico es 0.45V mientras que el del cobre es 0.34V.

**Ecuación 3** (Markin & Markina, 2019):

*Semireacción de cobre:*  $\text{Cu}^{+2} + 2e^- \rightarrow \text{Cu}$  (Potencial Redox  $E^0 = +0.34\text{V}$ )

Este procedimiento se realizó en línea de gas noble (nitrógeno) debido a que la interacción con oxígeno va a intervenir con la síntesis de nanopartículas ya que serán más propensas a oxidarse, en este caso se utilizó gas nitrógeno debido a que es un gas inerte. Se colocan en un matraz 5ml de sulfato de cobre y por goteo se coloca el extracto de la planta medicinal, una vez que se produce el cambio de color se procede a medir el pH con un pH-metro marca Mettler-Toledo. Se utilizó el hidróxido de sodio previamente preparado para ajustar el pH entre 9-10; una vez que se encuentre ajustado se procedió a hacer las mediciones tanto en el equipo de dispersión de luz dinámica (DLS), con el cual se mide el tamaño de las nanopartículas y se obtuvo un tamaño promedio. Así como con el espectro UV-Visible, con el cual se obtuvieron curvas debido a las absorbancias que presentan las nanopartículas, las cuales se compararon con curvas estipuladas previamente en otras investigaciones. Se repitió el proceso para cada uno de los tres extractos seleccionados previamente debido a su capacidad antioxidante y su concentración de polifenoles.

### **Síntesis de nanopartículas de Yoduro de Cobre**

Este procedimiento también se realizó en línea de gas nitrógeno, como se puede observar en la Figura 11, por las mismas razones estipuladas en la síntesis de nanopartículas de cobre. Se realizó a partir de las nanopartículas de cobre sintetizadas con el protocolo anterior.

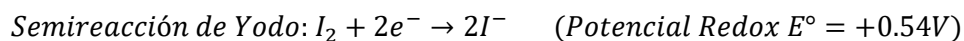
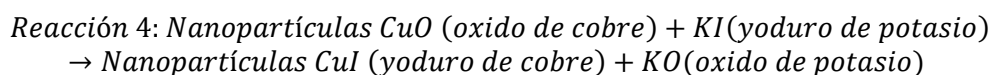
### **Figura 11**

*Proceso de síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre en línea de gas nitrógeno*



Para ello se hizo una solución de yoduro de potasio (KI) 0.01M, la cual se preparó pesando 0.03 gramos de KI marca FISHER S. y se completan 15ml de agua destilada tipo 1. Se colocó en relación 1:1, colocando 5ml de nanopartículas de cobre con 5ml de la solución de yoduro de potasio, se las mezcla y se procede a medir el pH utilizando el pH metro marca Mettler-Toledo. Se ajustó el pH entre 9-10 utilizando la solución de hidróxido de sodio (NaOH). Se repitió el procedimiento para las tres nanopartículas sintetizadas con los diferentes extractos. Este proceso y las reacciones que ocurren se observan en la Ecuación 4.

**Ecuación 4** (Archana, Rajagopal, Gayathri, & Aishwarya, 2021):



Una vez sintetizadas las nanopartículas de yoduro de cobre, como se observa en la Figura 12, se hicieron los análisis en el DLS y en el espectro UV-Visible explicados anteriormente.

**Figura 12**

*Nanopartículas de yoduro de cobre*



Nota: Nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre y después de agregar Yoduro de potasio en línea de gas. De izquierda a derecha se observan las nanopartículas de Toronjil, Ruda y Santa María.

### **Análisis de estabilidad y caracterización de las nanopartículas sintetizadas**

Para la medición de caracterización se realizó una lectura en el espectro UV-VIS marca Specord S600, con el cual se obtuvo una curva con diferentes absorbancias a diferentes nanómetros, la cual luego se comparó con curvas obtenidas con otras nanopartículas sintetizadas previamente, para tener una idea de si la síntesis fue exitosa. Después, para la medición de estabilidad se realizó mediciones en el equipo de Dispersión de luz dinámica (DLS), marca Horiba LB-550; con este equipo se obtiene el de tamaños de nanopartículas en la celda de análisis y se obtiene a su vez un tamaño promedio después 5 mediciones consecutivas.

Primero fue necesario realizar una medición de prueba para obtener la cantidad de muestra a utilizar para obtener una buena lectura en el DLS. Esto se llevó a cabo tomando alícuotas de 10ul, colocándolas en una celda de cuarzo y después en ella se colocaron 3ml de agua destilada tipo 1 para diluir la muestra, se procedió a medir y observar si las lecturas tenían buenos resultados. Se repitió este proceso agregando de 10ul en 10ul hasta llegar a 60 ul, manteniendo los 3ml de agua destilada. Después de este proceso se decide la cantidad de muestra que da buenas lecturas en el DLS y se la estandarizó para todas las muestras.

A continuación, se realizó una curva de estabilidad cinética de las nanopartículas para ello se utilizó el equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) y se tomaron mediciones cada 45 minutos de las nanopartículas, esto se repitió para un total de 10 mediciones, transcurriendo así un total de 405 minutos en total. Este proceso se realizó para obtener una curva de estabilidad cinética que nos permitió observar el cambio del tamaño de las nanopartículas a través del tiempo. Estas mediciones nos sirvieron para obtener los tamaños promedio de las nanopartículas sintetizadas a partir de extractos de plantas medicinales y el rango de variación del tamaño de estas.

## Capítulo VI: Resultados

### Determinación de la humedad

Todas las muestras se consiguieron frescas y para la determinación de la humedad se cortaron en pedazos pequeños, se realizó un pesaje inicial y un pesaje final después de completar el protocolo especificado anteriormente; los resultados del porcentaje de humedad de todas las muestras se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Resultados de los análisis del porcentaje de humedad en las muestras de las plantas a analizar.*

<b>Muestra</b>	<b>Peso inicial (gramos)</b>	<b>Peso final (gramos)</b>	<b>Porcentaje de humedad</b>
<b>hierba luisa</b>	0.62	0.25	59.06%
<b>llantén</b>	1.08	0.14	87.12%
<b>ruda</b>	1.00	0.31	69.12%
<b>santa maría</b>	1.01	0.32	68.45%
<b>toronjil</b>	0.22	0.12	46.06%

### Extracción de compuestos polifenólicos de plantas

Los resultados cualitativos de las extracciones mostraron diferentes colores e intensidades dependiendo del porcentaje de etanol utilizado en la extracción, por lo que confirmamos que si existía extracción de compuestos polifenólicos. Las características cualitativas de los extractos para los dos tipos de agitación se explican en la Tabla 7 y se presentan algunos resultados en la Figura 13; sin embargo, no se observaron diferencias cualitativas observables al comparar los tipos de agitación.



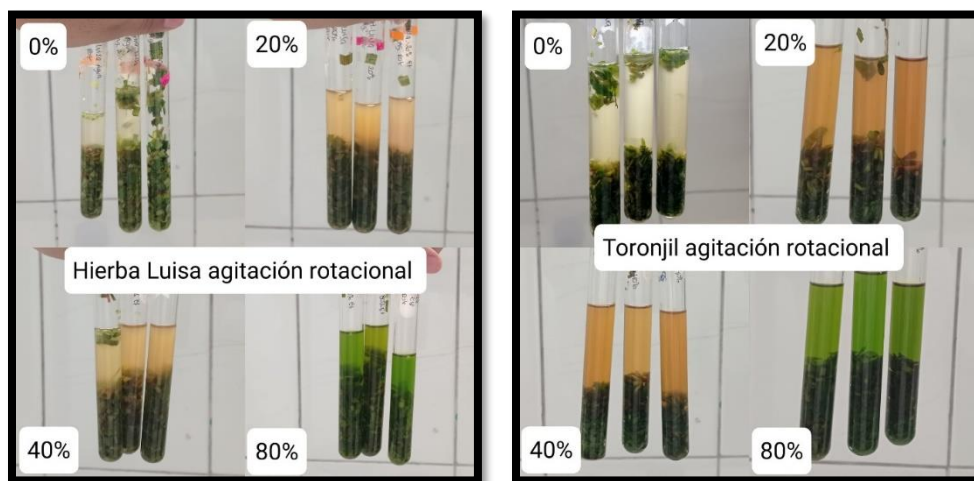
Tabla 7

*Observaciones cualitativas de los extractos en diferentes concentraciones de etanol y por los métodos de agitación orbital y rotacional.*

<b>Planta</b>	<b>Concen- tración</b>	<b>Observaciones agitación orbital</b>	<b>Observaciones agitación rotacional</b>
<b>Hierba luisa</b>	<b>0%</b>	Coloración blanca levemente opaca	Coloración blanca levemente opaca
	<b>20%</b>	Color amarillento levemente opaco	Color amarillo opaco
	<b>40%</b>	Color amarillo con un subtono café y menos opacas	Color amarillo-café menos opaco.
	<b>80%</b>	Color verde intenso	Color verde intenso no opaco
<b>Toronjil</b>	<b>0%</b>	Coloración café leve y transparente	Coloración levemente café
	<b>20%</b>	Color cobrizo y transparente	Color cobre no opaco
	<b>40%</b>	Color cobrizo similar al anterior	Color cobrizo un poco más intenso
	<b>80%</b>	Color verde intenso y transparente	Color verde intenso sin ser opaco
<b>Santa maría</b>	<b>0%</b>	Subtono muy leve de color café, las muestras a su vez fueron translucidas	Color café muy bajo y sin mostrarse opaco
	<b>20%</b>	Color amarillo sin turbidez	Color amarillo y no son opacas
	<b>40%</b>	Color amarillo más intenso que el anterior	Color amarillo más fuerte y no opaco
	<b>80%</b>	Color verde oscuro intenso, sigue sin ser opaco	Color verde oscuro y sin ser opaco
<b>Planta</b>	<b>Concen- tración</b>	<b>Observaciones agitación orbital</b>	<b>Observaciones agitación rotacional</b>
<b>Llantén</b>	<b>0%</b>	No se observa ningún color característico	No se observa ningún color característico
	<b>20%</b>	Tonalidad rojiza con dejes cafés y transparentes	Tonalidad café rojiza y no están opacos
	<b>40%</b>	Tonalidad café, pero menor extracto anterior y translucida	Tonalidad menos café que el anterior extracto y siguen sin ser opacos
	<b>80%</b>	Color verde oscura fuerte pero lo suficientemente translucido	Color verde fuerte pero no opaco
<b>Ruda</b>	<b>0%</b>	Leve tonalidad amarilla-café	Tonalidad amarilla y café leve
	<b>20%</b>	Extracto de color amarillo levemente más intenso	Extracto de color amarillo más intenso que el extracto anterior
	<b>40%</b>	Color verde claro y translucido	Color verde claro, no opaco
	<b>80%</b>	Color verde oscuro intenso	Color verde oscuro muy intenso

**Figura 13**

*Imagen referencial cualitativa de algunos de los extractos obtenidos*



Nota: Se observan los extractos de hierba luisa y toronjil a diferentes concentraciones de etanol por el método de agitación rotacional.

### **Medición de la concentración de compuestos fenólicos**

Se realizó la medición por triplicado de la concentración de compuestos polifenólicos utilizando la curva de calibración realizada con ácido gálico explicada en el capítulo de materiales y métodos.

### **Curva de calibración**

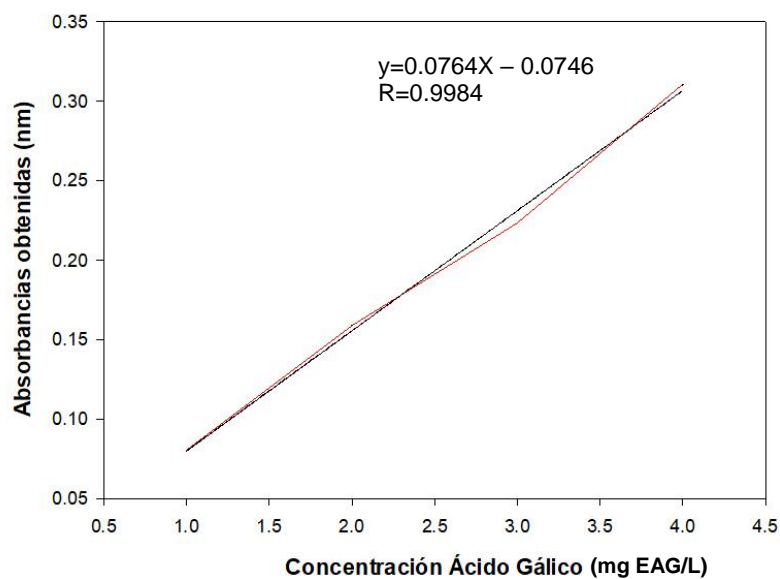
La curva de calibración obtenida a partir de ácido gálico, carbonato de sodio y reactivo de Folin-Ciocalteu se encuentra en la Figura 14 y posee un  $R=0.9984$ .

**Figura 14**

Curva de calibración obtenida a partir de ácido gálico, reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio.

Con una ecuación de la recta  $y=0.0764X - 0.0746$  y un  $R=0.9984$

Curva de Calibración para la Cuantificación de la Concentración de Polifenoles



Nota: La línea de color rojo muestra las absorbancias obtenidas experimentalmente y la línea de color negro muestra la regresión lineal de estas lecturas con la cual se obtiene la ecuación y la R utilizada en los análisis siguientes.

***Medias de las concentraciones obtenidas por agitación orbital de cada una de las muestras de plantas.***

Utilizando esta curva de calibración se realizaron las mediciones de la cantidad de polifenoles totales en las 5 muestras de plantas y se obtuvieron los siguientes resultados para la agitación orbital, todas las concentraciones se encuentran en mg EAG/L en la tabla 8.

**Tabla 8**

*Medias de las concentraciones obtenidas por agitación orbital con los diferentes porcentajes de etanol utilizados para las extracciones.*

<b>Planta</b>	<b>Concentración etanol</b>	<b>Concentración de compuestos polifenólicos (mg EAG/L)</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>Hierba luisa</b>	0%	2.83	0.02
	20%	2.09	0
	40%	2.94	0.02
	80%	2.38	0.01
<b>Llantén</b>	0%	1.12	0.02
	20%	1.31	0.01
	40%	1.77	0.02
	80%	1.45	0.05
<b>Ruda</b>	0%	2.21	0
	20%	3.09	0.01
	40%	4.32	0.02
	80%	4.05	0.01
<b>Santa maría</b>	0%	1.36	0.02
	20%	3.37	0.03
	40%	4.22	0.03
	80%	3.22	0.02
<b>Toronjil</b>	0%	2.49	0.01
	20%	4.31	0.02
	40%	5.66	0
	80%	1.43	0.01

Nota: Todas las concentraciones mostradas son el promedio de los datos por triplicado obtenidas, y por ello se muestran las desviaciones estándar.

*Medias de las concentraciones obtenidas por agitación rotacional de cada una de las muestras de plantas.*

Utilizando esta curva de calibración se realizaron las mediciones de la cantidad de polifenoles totales en las 5 muestras de plantas y se obtuvieron los siguientes resultados para la agitación rotacional, todas las concentraciones se encuentran en mg EAG/L en la Tabla 9.

**Tabla 9**

*Medias de las concentraciones obtenidas por agitación rotacional con los diferentes porcentajes de etanol utilizados para las extracciones.*

<b>Planta</b>	<b>Concentración etanol</b>	<b>Concentración de compuestos polifenólicos (mg EAG/L)</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>Hierba luisa</b>	0%	1.82	0.01
	20%	1.65	0
	40%	1.76	0.01
	80%	2.13	0.01
<b>Llantén</b>	0%	1.03	0.01
	20%	1.25	0
	40%	1.56	0.01
	80%	1.32	0.02
<b>Ruda</b>	0%	4.36	0.05
	20%	2.51	0.01
	40%	6.6	0.07
	80%	5.37	0.02
<b>Santa maría</b>	0%	2.76	0.02
	20%	2.33	0
	40%	4.17	0
	80%	5.34	0.03
<b>Toronjil</b>	0%	4.26	0
	20%	4.03	0.02
	40%	5.43	0.05
	80%	5.33	0

Nota: Todas las concentraciones mostradas son el promedio de los datos por triplicado obtenidas, y por ello se muestran las desviaciones estándar.

#### ***Análisis de los mejores extractos para cada planta.***

Una vez obtenidos los resultados de cada una de las plantas por triplicado y haber realizado los análisis estadísticos para obtener las medias de cada uno de ellos se obtuvieron los siguientes resultados. En los extractos de hierba luisa, llantén, ruda y toronjil; la concentración de etanol del 40% fue la con la que se obtuvo mayores concentraciones de compuestos polifenólicos para estas plantas

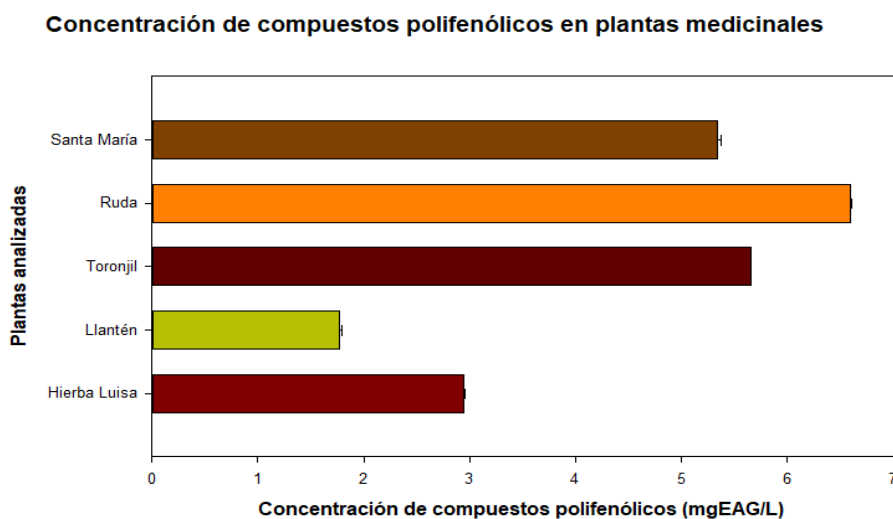
para estas plantas. Mientras que en el caso de la santa maría se obtuvieron mejores concentraciones de compuestos polifenólicos con una extracción del 80% de etanol. Por otro lado, al analizar los métodos de agitación y los resultados en concentración de polifenoles, se observa que tres de las cinco plantas analizadas: hierba luisa, llantén y toronjil; muestran las concentraciones de compuestos polifenólicos mayores al realizarse la extracción por agitación orbital. Por otro lado, la ruda y la santa maría presentan las mayores concentraciones de compuestos polifenólicos al realizarse la extracción por agitación rotacional.

Con estos resultados podemos observar que las mayores concentraciones de compuestos polifenólicos dependen directamente de la planta que se esté analizando y es importante previo a medir concentraciones de compuestos polifenólicos probar varios métodos de extracción para así asegurar que el método seleccionado es el mejor para la planta que se busca analizar.

Una vez obtenidas las concentraciones por triplicado de cada planta y la media de estas concentraciones se procedieron a realizar la comparación entre los extractos con mayor concentración de etanol de cada una de las plantas, el gráfico comparativo se observa en la Figura 15. Las plantas medicinales que presentaron mayor concentración de compuestos polifenólicos fueron santa maría, ruda y toronjil, estas presentaron cantidades mayores a 5 mg EAG/L de polifenoles. Mientras que llantén y hierba luisa presentaron concentraciones menores a 3 mg EAG/L. Para esta característica los 3 mejores extractos son los que presentan mayor concentración de polifenoles siendo santa maría, ruda y toronjil.

**Figura 15**

Comparación gráfica entre las concentraciones de compuestos polifenólicos en las plantas medicinales analizadas, según el extracto que presentó mayor concentración de estos compuestos.



Nota: Las concentraciones en el gráfico son las siguientes: hierba luisa 2.94 mg EAG/L, llantén 1.77 mg EAG/L, toronjil 5.66 mg EAG/L, ruda 6.60 mg EAG/L y santa maría 5.34 mg EAG/L.

Estos resultados se comparan en la Tabla 10 a continuación con la concentración de compuestos polifenólicos en otras plantas medicinales en las cuales se ha realizado el mismo análisis en otras investigaciones.

**Tabla 10**

Cuadro comparativo de la concentración de compuestos polifenólicos analizados durante este proyecto de integración curricular y otras plantas medicinales analizadas en otros proyectos e investigaciones anteriormente.

Planta	Concentración de compuestos polifenólicos	Fuente
<i>Hierba Luisa (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf)</i>	2.94 mg EAG/L	Este proyecto
<i>Llantén (Plantago major L.)</i>	1.77 mg EAG/L	Este proyecto
<i>Ruda (Ruta graveolens L.)</i>	5.66 mg EAG/L	Este proyecto
<i>Santa María (Tanacetum parthenium L. Sch.Bip.)</i>	6.6 mg EAG/L	Este proyecto
<i>Toronjil (Melissa officinalis L.)</i>	5.34 mg EAG/L	Este proyecto

Planta	Concentración de compuestos polifenólicos	Fuente
<i>Manzanilla (Matricaria chamomilla L.)</i>	2.54 mg EAG/L	(García Vieyra, Jaramillo Arellano, Guajardo García, Sánchez Carmona, & Rodríguez Guerrero, 2022)
<i>Lavanda (Lavandula angustifolia Mill.)</i>	2.21 mg EAG/L	(García Vieyra, Jaramillo Arellano, Guajardo García, Sánchez Carmona, & Rodríguez Guerrero, 2022)
<i>Buganvillas (Bougainvillea glabra Choisy)</i>	1.61 mg EAG/L	(García Vieyra, Jaramillo Arellano, Guajardo García, Sánchez Carmona, & Rodríguez Guerrero, 2022)
<i>Cola de caballo (Equisetum bogotense Kunth)</i>	11.76 mg EAG/L	(Hernández Moreno, Salazar, Hernández Rodríguez, & Pabón, 2022)
<i>Ortiga de árbol (Urera carasaca (Jacq.) Gaudich. ex. Griseb.)</i>	3.27 mg EAG/L	(Hernández Moreno, Salazar, Hernández Rodríguez, & Pabón, 2022)

#### **Análisis ANOVA para la concentración de compuestos polifenólicos**

Para la concentración de compuestos polifenólicos se utilizó el software de análisis estadístico “SigmaPlot”. Dentro de este se colocaron como variables: A) El tipo de planta medicinal, B) El tipo de agitación y C) El porcentaje de etanol que se utilizó para la extracción. Cada una de las medidas se insertó por triplicado haciendo que el análisis final fuera de 120 datos en total.

#### **Hipótesis a probar con el análisis ANOVA**

- ❖ Ho general: No hay diferencias entre las medias de concentración de polifenoles para los factores: Tipo de agitación, el tipo de planta y el porcentaje de etanol utilizado para la extracción.
- ❖ H alternativa general: Al menos un par de medias de concentración de polifenoles son significativamente distintas la una de la otra para los factores de: tipo de agitación, el tipo de planta y el porcentaje de etanol utilizado para la extracción.
- ❖ Ho1: No hay diferencia entre las medias de concentración de polifenoles para el factor de tipo de agitación.



- ❖ H alternativa 1: Al menos un par de medias de concentración de polifenoles son significativamente distintas para el factor de tipo de agitación.
- ❖ Ho2: No hay diferencia entre las medias de concentración de polifenoles para el factor de tipo de planta.
- ❖ H alternativa 2: Al menos un par de medias de concentración de polifenoles son significativamente distintas para el factor de tipo de planta.
- ❖ Ho3: No hay diferencia entre las medias de concentración de polifenoles para el factor de porcentaje de etanol utilizado para la extracción.
- ❖ H alternativa 3: Al menos un par de medias de concentración de polifenoles son significativamente distintas para el factor de porcentaje de etanol utilizado para la extracción.

*Datos obtenidos del análisis ANOVA con nivel de significancia de 0.05*

En el análisis ANOVA realizado con SigmaPlot se obtuvo la Tabla 11. En esta se obtienen valores de F y valores de p. El valor de F es un cociente de varianzas y muestra que tan dispersos se encuentran los datos entre ellos. Mientras que el valor p se encarga de medir la probabilidad de rechazar la hipótesis nula, mientras menor sea este valor con más certeza se puede descartar la hipótesis nula.

Por otro lado, en la Tabla 11 también se observan otros valores como el grado de libertad, la suma de cuadrados y la media cuadrática. El grado de libertad, es la cantidad de datos que podrían variar y esta se calcula restando uno a la cantidad de datos a analizarse. Por otro lado, la suma de cuadrados es otra medida de variación, pero en este caso se calcula con respecto a la media, se calcula sumando los cuadrados de las diferencias que se obtienen con respecto a la media. Finalmente, la media cuadrática se calcula elevando al cuadrado todos los datos para eliminar signos negativos y se obtiene una media aritmética para después volver a sacar la raíz cuadrada. Todos estos cálculos se observan resumidos tanto en la Tabla 11 y se vuelven a mencionar en tablas en otros análisis estadísticos.

**Tabla 11**

*Tabla obtenida del análisis de los datos de concentración de compuestos polifenólicos en el software*

*“SigmaPlot” para un nivel de significancia de 0.05*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>SS (Suma de Cuadrados)</b>	<b>MS (Media Cuadrática)</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Planta Medicinal</b>	4	140.71	35.18	57075.31	<0.001
<b>Tipo de Agitación</b>	1	6.68	6.68	10829.31	<0.001
<b>Porcentaje de Etanol</b>	3	37.54	12.51	20300.73	<0.001
<b>Planta vs. Agitación</b>	4	18.64	4.66	7560.37	<0.001
<b>Planta vs. Etanol</b>	12	31.69	2.63	4272.20	<0.001
<b>Agitación vs. Etanol</b>	3	14.96	4.99	8090.54	<0.001
<b>Planta vs. Agitación vs. Etanol</b>	12	20.45	1.70	2765.42	<0.001
<b>Residual</b>	80	0.049	0.000616		
<b>Total</b>	119	270.62	2.274		

Para los análisis de tipo ANOVA de tres vías es importante calcular los errores estándar debido a que al analizar tres variables es posible que se cometa errores al momento de descartar la hipótesis nula, los errores de este tipo se observan en la Tabla 12 para este análisis. En este caso los errores se muestran en decimales y mientras menores sean estos, quiere decir que menor error hay de descartar una hipótesis nula correcta.

**Tabla 12**

*Errores estándar de las medias de mínimos cuadrados en cada una de las comparaciones realizadas para un nivel de significancia de 0.05*

<b>Factor(es) analizados</b>	<b>Error Estándar de las medias de mínimos cuadrados</b>
<b>Tipo de Planta</b>	0.00507
<b>Tipo de Agitación</b>	0.00321
<b>Porcentaje de etanol</b>	0.00453
<b>Tipo de Planta vs. Tipo de Agitación</b>	0.00717
<b>Tipo de Planta vs. Porcentaje de Etanol</b>	0.0101
<b>Tipo de Agitación vs. Porcentaje de Etanol</b>	0.00641
<b>Tipo de Planta vs. Tipo de Agitación vs. Porcentaje de Etanol</b>	0.0143

*Interpretación de los datos obtenidos del análisis ANOVA para un nivel de significancia de 0.05*

Debido a que todos los valores  $p$  obtenidos del análisis fueron menores a 0.001, esto indicaría que se comprueba que existe una interacción estadísticamente significativa entre los tres factores de análisis (Tipo de planta, Tipo de agitación y Concentración de etanol), por lo que se rechaza la hipótesis nula general y las 3 hipótesis nulas específicas de cada factor. El análisis de factores con interacción de tres vías concluyó que el efecto de interacción que existe entre los factores del Tipo de Planta y el Tipo de agitación, depende del nivel de etanol que se esté utilizando para la extracción.

Por otro lado, se realizaron procedimientos de comparación múltiple por pares utilizando el método de Holm-Sidak utilizando el mismo programa, este método se encargó de realizar comparaciones por factores, es decir se hicieron ensayos para corroborar si existían o no diferencias significativas estadísticamente entre los diferentes factores analizándolos entre ellos.

Como resultado de este análisis se obtuvo que existía una diferencia estadísticamente significativa con un valor  $p < 0.001$  para casi todas las comparaciones por pares exceptuando los siguientes casos:

- ✓ Comparaciones por factor: Tipo de planta, dentro de la agitación orbital y con un porcentaje de etanol del 80%; se determinó que las diferencias de Llantén vs. Toronjil no son estadísticamente significativas debido a que el valor p fue de 0.623.
- ✓ Comparaciones por factor: Tipo de planta, dentro de la agitación rotacional y con un porcentaje de etanol del 80%; se determinó que las comparaciones: Ruda vs. Toronjil, Ruda vs. Santa María y Santa María vs. Toronjil no son estadísticamente significativas debido a que sus valores p fueron: 0.148, 0.265 y 0.623. Siendo la última comparación la que presenta mayor valor p, esto se debe a que los extractos de estas plantas tuvieron concentraciones de compuestos polifenólicos sumamente similares en estos factores de extracción.

#### *Datos obtenidos del análisis ANOVA con nivel de significancia de 0.01*

Las tablas de resultados y los errores de este análisis coincidieron con los obtenidos con un nivel de significancia del 0.05, esto se debe a que los valores de p obtenidos durante el análisis de nivel de significancia 0.05 siempre fueron menores a 0.001. Esto hace que los errores, y la interpretación de resultados se mantengan constantes. Puede que al no existir variación en los resultados de los dos análisis ANOVA con diferente nivel de significancia se considere innecesario un segundo análisis con un nivel de significancia más exacto; sin embargo, para métodos analíticos se necesitan análisis estadísticos más específicos, para aminorar la probabilidad de errores al descartar una u otra hipótesis.

#### **Medición de la capacidad antioxidante**

Para la medición de la capacidad antioxidante se procedió a tomar 6 medidas en total, la primera fue del DPPH sin la muestra y a continuación se procedió a tomar 5 medidas con la muestra en intervalos de 2 minutos; los promedios de estas mediciones se muestran en la Tabla 13. Esto se realizó solamente con el extracto con mayor cantidad de compuestos polifenólicos de cada planta, los cuales se

presentaron en la Figura 15. Esto se debe a que para la síntesis de nanopartículas se deben elegir los extractos con mejores características combinadas.

*Promedios de absorbancias obtenidas para los extractos de las plantas analizadas y su respectivo porcentaje de capacidad antioxidante.*

Los resultados de las mediciones de absorbancia promedio de cada uno de estos extractos se presentan en la Tabla 13, al igual que el porcentaje de capacidad antioxidante promedio obtenido mediante la fórmula explicada en metodología.

**Tabla 13**

*Promedios de absorbancias obtenidos para los extractos de las plantas analizadas y el porcentaje de capacidad antioxidante promedio de cada una de ellas.*

<b>Planta</b>	<b>Absorbancia Promedio</b>	<b>%Capacidad Antioxidante Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>Hierba luisa</b>	0.17	61%	0.03
<b>Llantén</b>	0.25	51%	0.01
<b>Ruda</b>	0.08	82%	0.03
<b>Santa maría</b>	0.17	63%	0
<b>Toronjil</b>	0.18	61%	0.01

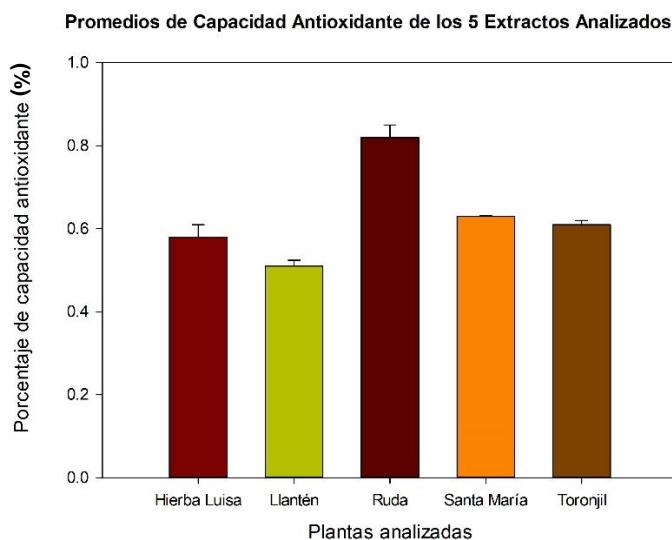
Nota: los extractos con mayor concentración de compuestos polifenólicos fueron los seleccionados. En el caso de hierba luisa fue por agitación orbital y con etanol al 40%. Para llantén fue por agitación orbital y con etanol al 40%. Para ruda fue por agitación rotacional y con etanol al 40%. Para la santa maría fue por agitación rotacional y con etanol al 80%. Finalmente, para toronjil fue por agitación orbital y con 40% etanol.

Los resultados de los análisis del porcentaje de capacidad antioxidante del mejor extracto de cada planta estudiada se muestran en la Figura 16, los cuales muestran que los extractos de ruda, toronjil y santa maría muestran los porcentajes más altos de capacidad antioxidante, siendo todos mayores al 60%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de la concentración de

compuestos polifenólicos, por lo que estos fueron los extractos que se seleccionaron para la posterior síntesis de nanopartículas.

### Figura 16

Comparación gráfica de los promedios de los porcentajes de capacidad antioxidante de los 5 extractos que fueron analizados.



Nota: La capacidad antioxidante de los extractos analizados son hierba luisa 58%, llantén 51%, toronjil 61%, ruda 82% y santa maría 63%.

Estos resultados se compararon con otros realizados previamente en otras investigaciones y proyectos de plantas medicinales. Estas comparaciones se observan en la Tabla 14, los estudios presentados muestran porcentajes obtenidos por el mismo método para evitar variaciones.

### Tabla 14

Cuadro comparativo del porcentaje de capacidad antioxidante analizados durante este proyecto de integración curricular y otras plantas medicinales analizadas en otros proyectos anteriormente.

Planta	Porcentaje de capacidad antioxidante	Fuente
<i>Hierba Luisa (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf)</i>	58%	Este proyecto
<i>Llantén (Plantago major L.)</i>	51%	Este proyecto
<i>Ruda (Ruta graveolens L.)</i>	82%	Este proyecto

Planta	Porcentaje de capacidad antioxidante	Fuente
<b>Santa María (<i>Tanacetum parthenium</i> L. Sch.Bip.)</b>	63%	Este proyecto
<b>Toronjil (<i>Melissa officinalis</i> L.)</b>	61%	Este proyecto
<b>Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)</b>	75.4%	(García Vieyra, Jaramillo Arellano, Guajardo García, Sánchez Carmona, & Rodríguez Guerrero, 2022)
<b>Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)</b>	78.1%	(García Vieyra, Jaramillo Arellano, Guajardo García, Sánchez Carmona, & Rodríguez Guerrero, 2022)
<b>Buganvilias (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy)</b>	80.2%	(García Vieyra, Jaramillo Arellano, Guajardo García, Sánchez Carmona, & Rodríguez Guerrero, 2022)
<b>Cola de caballo (<i>Equisetum bogotense</i> Kunth)</b>	46.41%	(Hernández Moreno, Salazar, Hernández Rodríguez, & Pabón, 2022)
<b>Ortiga de árbol (<i>Urera carasaca</i> (Jacq.) Gaudich. ex. Griseb.)</b>	51.59%	(Hernández Moreno, Salazar, Hernández Rodríguez, & Pabón, 2022)

#### Análisis ANOVA de la capacidad antioxidante

El análisis ANOVA que se realizó para la capacidad antioxidante, se analizó realizando 5 mediciones con el extracto en el lapso de 2 minutos entre cada medición. Los datos fueron colocados en el software SigmaPlot como se muestra en la Tabla 15 y las hipótesis de este análisis se presentan a continuación.

Hipótesis:

- ❖ Ho: No hay diferencia entre las medias de capacidad antioxidante para el factor de tipo de planta.
- ❖ H alternativa: Al menos un par de medias capacidad antioxidante son diferentes para el factor de tipo de planta.

**Tabla 15**

*Tabla de cómo se colocaron los datos para el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante*

<b>Mediciones</b>	<b>Hierba luisa</b>	<b>Llantén</b>	<b>Ruda</b>	<b>Santa maría</b>	<b>Toronjil</b>
<b>Medición 1</b>	62%	53%	86%	64%	62%
<b>Medición 2</b>	59%	52%	84%	64%	61%
<b>Medición 3</b>	57%	51%	82%	63%	61%
<b>Medición 4</b>	55%	50%	80%	62%	60%
<b>Medición 5</b>	54%	50%	79%	63%	60%

Nota: \*%: porcentaje de capacidad antioxidante

### ***Análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.05%***

Para este análisis se realizó un ANOVA de tipo Kruskal-Wallis, también conocido como prueba de H, por tipo de planta.

**Tabla 16**

*Tabla de los datos obtenidos durante el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante*

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Hierba luisa</b>	5	57.00	54.50
<b>Llantén</b>	5	51.00	50.00
<b>Ruda</b>	5	82.00	79.50
<b>Santa maría</b>	5	63.00	63.00
<b>Toronjil</b>	5	61.00	60.00

Nota: En este gráfico N es la cantidad de datos ingresado, en este caso fueron 5 mediciones. El 25% y el 75% muestras las distribuciones de los daros en estos porcentajes. De ellos se obtiene un valor H.

Se obtiene un valor H de 22.473 con 4 grados de libertad. (P = <0.001)

Además, se realizó un test de Turkey para obtener una comparación múltiple, los resultados de este test en particular se muestran en la Tabla 17.



Tabla 17

Resultados del test de Turkey

Comparaciones	Diferencia de rangos	q	P<0.05
ruda vs llantén	100.00	6.08	Si
ruda vs hierba luisa	70.50	4.28	Si
ruda vs toronjil	54.50	3.31	No
ruda vs santa maría	25.00	1.52	No probar
Comparaciones	Diferencia de rangos	q	P<0.05
santa maría vs llantén	75.00	4.56	SI
santa maría vs hierba luisa	45.50	2.77	No
santa maría vs toronjil	29.50	1.79	No probar
toronjil vs llantén	45.50	2.77	Si
toronjil vs hierba luisa	16.00	0.97	No probar
hierba Luisa vs llantén	29.50	1.79	No probar

Nota: La diferencia de rangos muestra las comparaciones realizadas entre las plantas. El valor q se obtiene a través de la Tabla de Turkey, y con este valor a su vez se obtiene el valor p.

**Interpretación de los resultados para el análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.05**

La Prueba de ANOVA de Kruskal-Wallis de un Factor mostró que las diferencias de los valores de las medianas entre los tipos de planta analizados son mayores a los esperados por error, por ende, se concluye que son estadísticamente significativos con un p menor a 0.001.

Por otro lado, la prueba de Turkey de múltiple comparación arrojó como resultado que los datos que se muestran como “no probar”, es decir ruda vs. santa maría, santa maría vs. toronjil, toronjil vs. hierba luisa y hierba luisa vs. llantén no tuvieron una diferencia significativa entre los dos factores analizados dentro de estas comparaciones, siendo el tipo de planta y el porcentaje de capacidad antioxidante. En este mismo cuadro podemos observar que las que sí tuvieron una diferencia significativa estadísticamente fueron la ruda vs. llantén, ruda vs. hierba luisa y santa maría vs. llantén; esto se debe a que ruda y santa maría fueron los dos extractos con mayor porcentaje de capacidad antioxidante mientras que la hierba Luisa y el llantén fueron los dos extractos con menor porcentaje.

### ***Análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.01***

Para este análisis se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de significancia menor que el anterior debido a que al estarse analizando metabolitos, las medidas de análisis suelen ser sumamente pequeñas y por ello es recomendable analizar niveles de significancia del 0.01. Los datos obtenidos del análisis ANOVA con un nivel de significancia de 0.01 se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18**

*Tabla de los datos obtenidos durante el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.01*

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desv. Estándar</b>	<b>Error Estándar</b>
<b>Hierba Luisa</b>	5	57.40	3.21	1.44
<b>Llantén</b>	5	51.20	1.3	0.58
<b>Ruda</b>	5	82.20	2.86	1.28
<b>Santa María</b>	5	63.40	0.55	0.25
<b>Toronjil</b>	5	60.80	0.84	0.37

Nota: En este caso N representa al número de mediciones analizadas. La mediana es el promedio de las mediciones. La desviación estándar es la variabilidad que existe en los datos obtenidos y el error estándar se encarga de estimar como varía el valor entre muestra y muestra.

En este tipo de análisis ANOVA se analizan a su vez las fuentes de variación, cuyos resultados se observan en la Tabla 19, la variación entre grupos es la variación que se da entre los 5 grupos analizados (hierba luisa, llantén, ruda, santa maría y toronjil), mientras que la fuente de variación residual es aquella que se da entre todos los datos. Como se explicó en el análisis anterior SS es la suma de cuadrados y MS es la media cuadrática. Ambas medidas fueron explicadas en significado y en manera de calcular anteriormente, al igual que el valor F y el valor p.

**Tabla 19**

*Tabla de las Fuentes de variación obtenidas por el análisis ANOVA de la capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.01*

Fuente de variación	Grados de Libertad	SS	MS	F	Valor p
Entre Grupos	4	2721.20	680.30	160.45	<0.001
Residual	20	84.80	4.24		
Total	24	2806.00			

A continuación, se realizó un análisis por el método de Holm-Sidak para una comparación de pares múltiples, es decir se realizó una comparación entre los diferentes pares de plantas como se observa en la Tabla 20.

**Tabla 20**

*Tabla de comparaciones por el factor: tipo de planta. Para un ANOVA con nivel de significancia de 0.01*

Comparación	Diferencia de Medias	T	P	P<0.010
ruda vs. llantén	31.00	23.8	<0.001	SI
ruda vs. hierba Luisa	24.80	19.04	<0.001	SI
ruda vs. toronjil	21.40	16.43	<0.001	SI
ruda vs. santa maría	18.80	14.44	<0.001	SI
santa maría vs. llantén	12.20	9.37	<0.001	SI
toronjil vs. llantén	9.60	7.37	<0.001	SI
hierba luisa vs. llantén	6.20	4.76	<0.001	SI
santa maría vs. hierba luisa	6.00	4.61	<0.001	SI
toronjil vs. hierba luisa	3.40	2.61	0.03	No
santa maría vs. toronjil	2.60	2	0.06	No

Nota: El valor T que se presenta la diferencia en relación a la variación de los datos analizados. El valor p es el presentado anteriormente, el cual representa que tan acertadamente se puede descartar la hipótesis nula.

***Interpretación de resultados para el análisis ANOVA de capacidad antioxidante para un nivel de significancia de 0.01***

Estos resultados muestran que al analizar la fuente de variación entre plantas se obtiene un valor de p menor a 0.001, por lo que se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que si existe diferencia estadísticamente significativa en la capacidad antioxidante entre el tipo de planta que se está

analizando. Por otro lado, al realizar la comparación por factor se observa que solamente hay dos comparaciones que se pueden considerar “iguales” siendo estas: toronjil vs. hierba luisa y santa maría vs. toronjil. Esto se relaciona directamente con que la capacidad antioxidante de toronjil está justamente intermedia entre la de santa maría y la de hierba luisa haciendo que este sea el tercer extracto con mayor porcentaje de capacidad antioxidante. Por ende, al compararlo con las dos muestras más cercanas (segunda y cuarta) puede parecer que no existe una diferencia significativa estadísticamente entre los porcentajes de capacidad antioxidante del extracto de toronjil con los extractos de hierba luisa y santa maría.

### **Análisis de las de nanopartículas de Cobre sintetizadas**

Previo a los análisis de estabilidad y caracterización de estas nanopartículas se hicieron análisis de la cantidad de muestra que usar para el DLS para obtener resultados óptimos. Los resultados de este análisis mostraron que entre 10ul y 60ul de muestra se obtenían lecturas similares, sin embargo, con más de 60ul presentaban lecturas dispares o erráticas en ciertas muestras. Por ello se estandarizó la medición en el DLS para todas las muestras de nanopartículas tanto de cobre como de yoduro de cobre, con 50ul de muestra de nanopartículas y 3 ml de agua destilada tipo 1.

### ***Nanopartículas con extracto de Ruda***

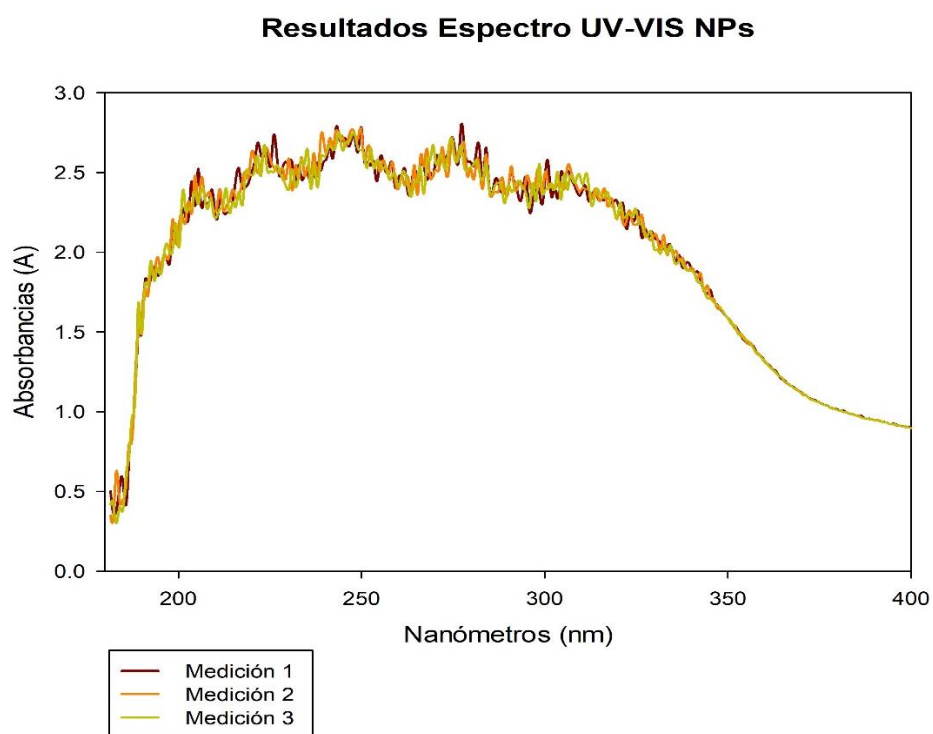
Las nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto de ruda tuvieron el cambio de color que muestra la síntesis correcta de nanopartículas después de colocar 0,8 ml del extracto de ruda seleccionado, en este caso fue la obtenida con etanol al 40% y agitación rotacional. El pH inicial de la solución fue de 3.6 y después se agregaron 9.4ml de NaOH para llegar a un pH final de 9,02.

A continuación, se realizó la lectura en el UV-Visible de las partículas obtenidas, mostrándose una curva con un pico entre 200-350nm el cual llegaba a su límite más bajo en alrededor de 500nm. Lo que indica que, si existió una síntesis de nanopartículas de cobre, esto se concluye debido a que existen

curvas obtenidas en investigaciones previas sobre nanopartículas de cobre que muestran curvas iguales a las obtenidas, sin embargo, se encuentran en su estado oxidado, esto también se puede concluir debido a las curvas observadas en bibliografía de investigaciones previas. La curva obtenida se muestra en la Figura 17.

### Figura 17

Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de NPs de cobre sintetizadas con extracto de ruda (*Ruta graveolens* L.)



Por otro lado, los resultados de la curva cinética de estabilidad, mostraron que las nanopartículas de ruda tenían un tamaño medio de aproximadamente 10 nm, aunque las medidas mostraron que las nanopartículas se encontraban en un rango entre 7.3-12.3 nm lo que muestra una pequeña variabilidad de tamaños; esto se puede observar con mayor claridad en la Tabla 21 y la Figura 18.

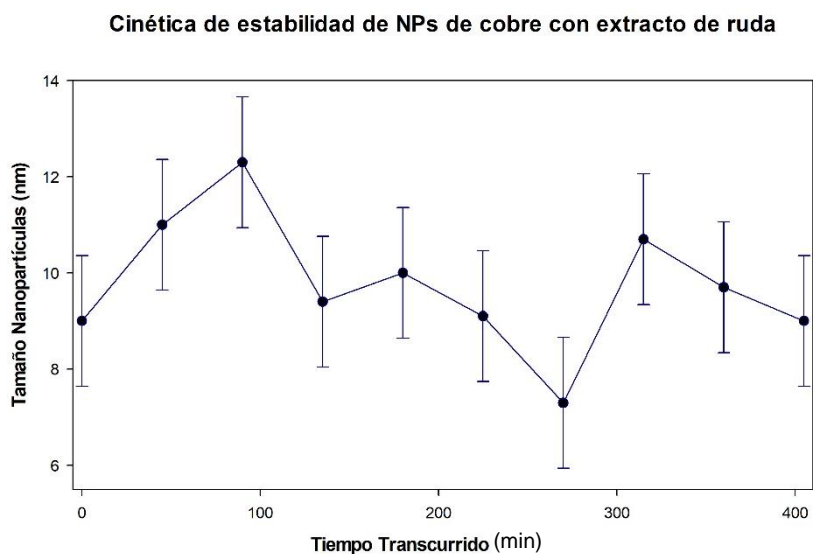
Tabla 21

Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las NPs de cobre sintetizadas con extracto de ruda

Tiempo (Min)	Medición 1 (nm)	Medición 2 (nm)	Medición 3 (nm)	Medición 4 (nm)	Promedio (nm)	Promedio General	Desv. Estad. General
0	9	9.2	9	8.8	9		
45	10.8	11.2	11.5	11	11		
90	11.9	12.8	12.5	12.1	12.3		
135	9.3	9.4	9.5	9.4	9.4		
180	10	10.5	9.8	9.7	10	9.75	1.36
225	9	9.2	9	8.9	9.1		
270	8	7.4	7	7	7.3		
315	10.4	10.6	11	10.7	10.7		
360	9.7	10	9.2	9.7	9.7		
405	9	9.1	9	9	9		

Figura 18

Curva de estabilidad cinética de las mediciones para las NPs de cobre sintetizadas con extracto de ruda.

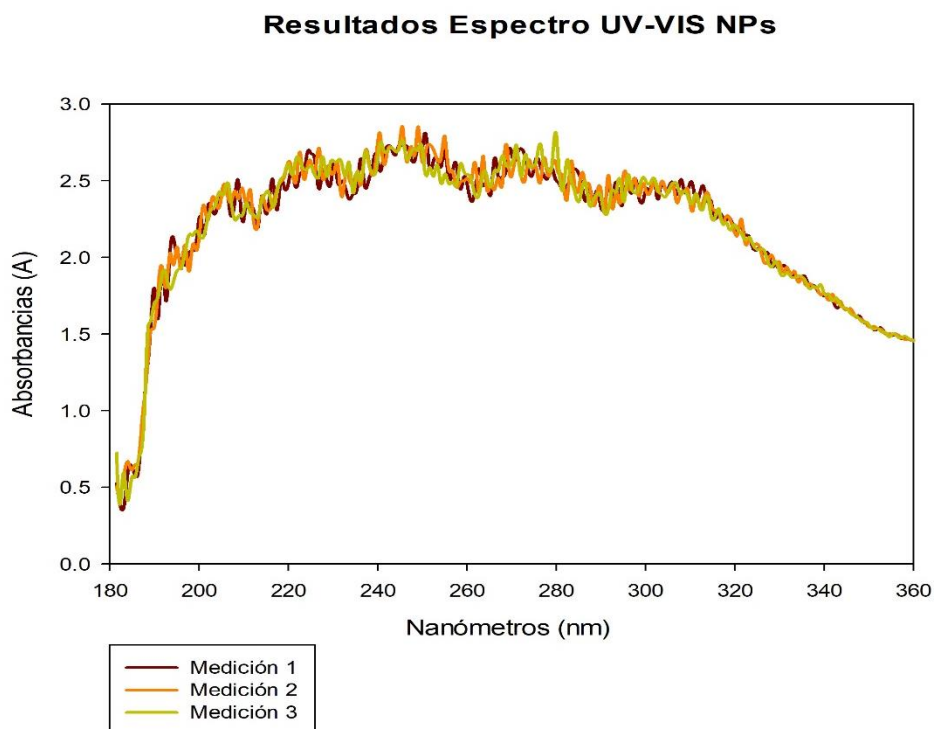


### ***Nanopartículas con extracto de Santa María***

Las nanopartículas sintetizadas con el extracto de santa maría, tuvieron el cambio de color con 0.8 ml del extracto seleccionado. El extracto seleccionado para la síntesis fue el obtenido con una concentración de etanol del 80% y por agitación rotacional. Al analizar el pH inicial de las nanopartículas fue de 4.09 y se agregaron 8.4ml de NaOH hasta alcanzar un pH final de 10.63. La curva obtenida en el UV-Visible se muestra en la Figura 19, en ella se puede observar una curva pronunciada entre 200 y 350 nm y después una curva menos pronunciada entre 350 y 500 nm después de la cual se llega a una línea constante. Esto resulta una curva similar a la obtenida en nanopartículas de cobre oxidadas.

#### **Figura 19**

*Curva obtenida en el UV-Visible de las NPs de cobre obtenidas a partir de extracto de Santa María (Tanacetum parthenium L. Sch.Bip.)*



Las mediciones de tamaños se pueden observar en la Tabla 22 y la curva de estabilidad cinética se puede observar en la Figura 20. Para las nanopartículas sintetizadas con el extracto de santa maría se obtuvo una media de 9.7nm y las mediciones oscilan entre 7.9nm y 13.1 nm. Esto muestra una variación de alrededor de 5nm sin embargo la mayoría de las mediciones sitúan al tamaño de las nanopartículas cercano a 9nm.

**Tabla 22**

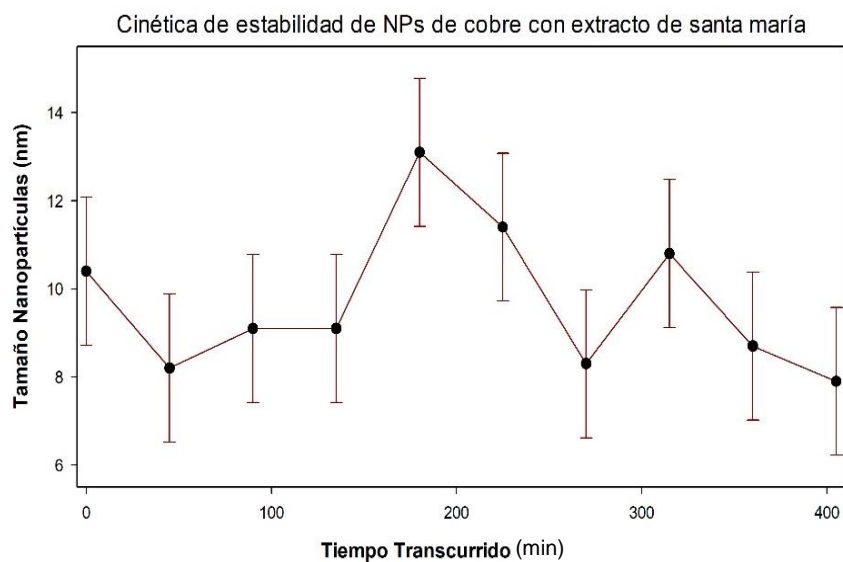
*Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las NPs de cobre sintetizadas con extracto de santa maría.*

<b>Tiempo (Min)</b>	<b>Medición 1 (nm)</b>	<b>Medición 2 (nm)</b>	<b>Medición 3 (nm)</b>	<b>Medición 4 (nm)</b>	<b>Promedio (nm)</b>	<b>Promedio general</b>	<b>Desv. Estand. general</b>
<b>0</b>	10	11	10.5	10.3	10.4		
<b>45</b>	8	8	8.3	8.5	8.2		
<b>90</b>	9	8.9	9.3	9.1	9.1		
<b>135</b>	8.8	9.2	9.1	9.3	9.1		
<b>180</b>	12.9	13	13.2	13.3	13.1	9.7	1.68
<b>225</b>	11.1	11.5	12	10.8	11.4		
<b>270</b>	8	8	8.5	8.7	8.3		
<b>315</b>	11	10.7	10.8	10.8	10.8		
<b>360</b>	8.5	8.9	8.9	8.5	8.7		
<b>405</b>	8	8	8	7.6	7.9		



**Figura 20**

*Curva de estabilidad cinética de las mediciones para las NPs de cobre sintetizadas con extracto de santa maría*

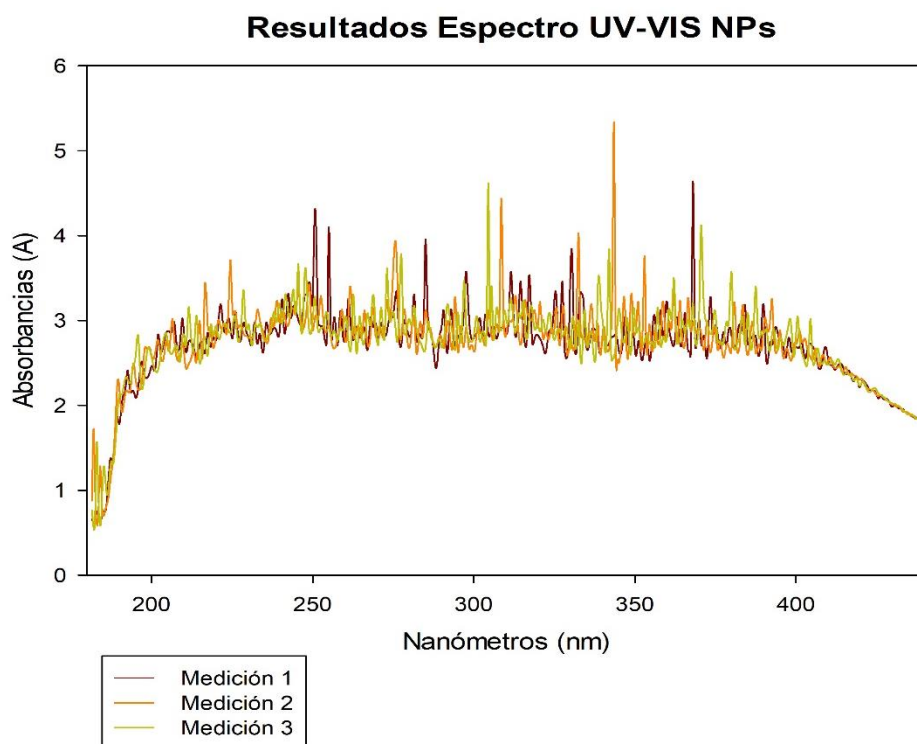


#### *Nanopartículas con extracto de Toronjil*

Las nanopartículas que se sintetizaron con el extracto de toronjil llegaron al cambio de color después de colocar 0,8ml del extracto obteniéndose un pH inicial de 3.35, a esta substancia se le agregó 8.4ml de NaOH y se alcanzó un pH final de 9.08; una vez alcanzado un pH dentro del rango se procedió a medir la curva en el espectro de UV-Visible y se obtuvo una curva que se muestra en la Figura 21, la cual tiene como característica ser una curva con varios picos entre 200-400nm y después a partir de los 450nm empieza a descender hasta que en los 650 nm aproximadamente se convierte en una línea recta. Esto al igual que las dos curvas anteriores muestra que si se realizó una síntesis de nanopartículas de cobre, sin embargo, el resultado fue nanopartículas oxidadas.

**Figura 21**

Curva obtenida en el UV-Visible de las NPs de cobre obtenidas a partir de extracto de Toronjil (*Melissa officinalis* L.)



Las mediciones del tamaño de nanopartícula se muestran en la Tabla 23 y al analizar la estabilidad y realizar la curva de estabilidad cinética de las nanopartículas sintetizadas con extracto de toronjil, la cual se observa en la Figura 22, se obtuvo un tamaño promedio de 9.38nm. A su vez se obtuvo un rango entre las 10 mediciones tomadas de entre 7.1nm y 12.1 nm. Es decir, al igual que en las otras dos nanopartículas sintetizadas con otros extractos existe una diferencia de alrededor de 5nm entre el rango superior y el inferior; 6 de las 10 mediciones muestran un tamaño de nanopartículas entre 9-10 nm.

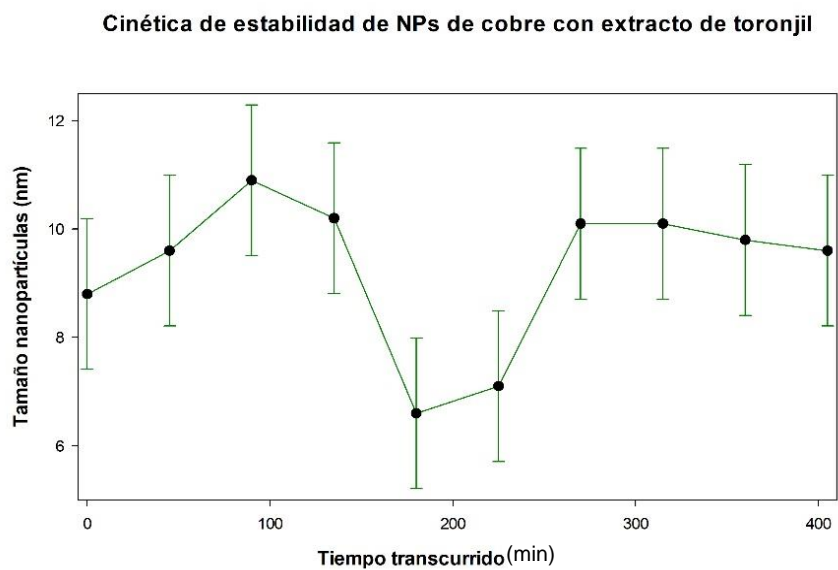
Tabla 23

Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las NPs de cobre sintetizadas con extracto de toronjil

TIEMPO (Min)	Medición 1 (nm)	Medición 2 (nm)	Medición 3 (nm)	Medición 4 (nm)	Medición 5 (nm)	Promedio general	Desv. Estand. General
0	10	10	9.5	10.5	10		
45	9.2	9.6	9.4	9.4	9.4		
90	12.3	12	11.9	12.3	12.1		
135	9.2	9.3	9.7	9.4	9.4		
180	10	9.8	9.7	9.7	9.8	9.38	1.48
225	10.5	10	10.1	10.2	10.2		
270	10	10	9.8	10.2	10		
315	7	7.1	7	7,2	7.1		
360	7.2	7.2	7.1	7.2	7.2		
405	8.6	8.5	8.7	8.6	8.6		

Figura 22

Curva de estabilidad cinética de las mediciones para las NPs de cobre sintetizadas con extracto de toronjil



### Síntesis de nanopartículas de Yoduro de Cobre

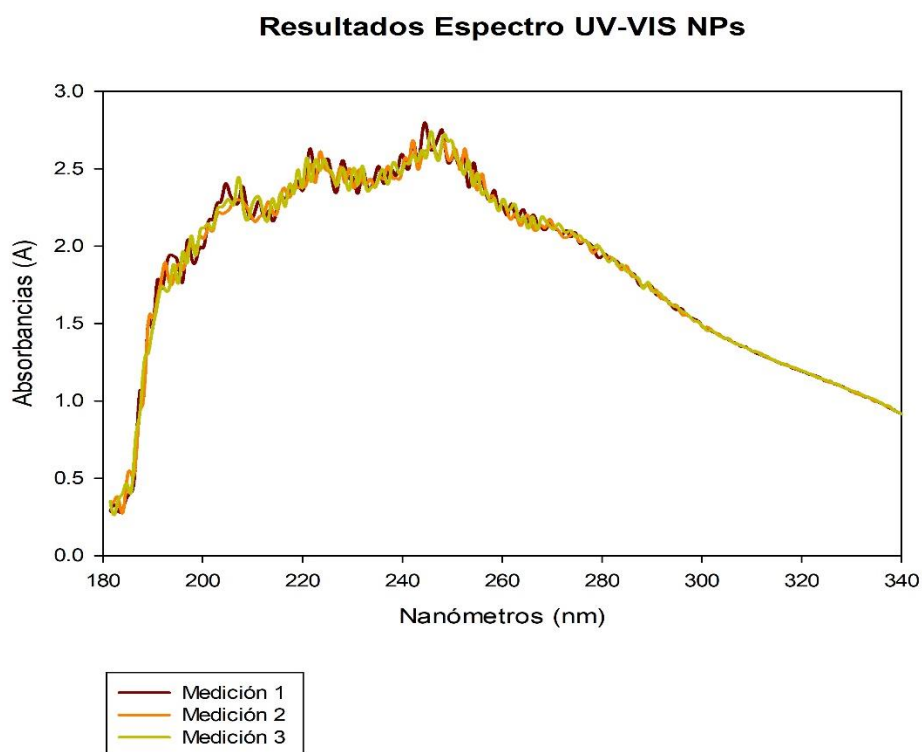
Como se explicó en el protocolo para esta síntesis se utilizaron las nanopartículas anteriores y se les añadió yoduro de potasio, para de esta manera obtener nanopartículas de yoduro de cobre.

### Nanopartículas con extracto de ruda

El pH inicial una vez se agregó el yoduro de potasio a las nanopartículas de cobre fue de 8.20, el cual luego se le agregó 0.2ml de NaOH para regular el pH hasta un valor de 9.06. A continuación, se analizaron las curvas en el espectro UV-Visible las cuales mostraron picos pronunciados que empezaban a decrecer entre 300-350 nm y alcanzaban una línea recta aproximadamente a partir de 500 nm, como se observa en la Figura 23.

### Figura 23

Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de NPs de yoduro de cobre sintetizadas a partir de NPs de cobre con extracto de ruda (*Ruta graveolens* L.)



Después de realizar el análisis de la curva en el UV-Visible se realizó el análisis en el DLS para obtener la curva cinética y poder observar la estabilidad de las nanopartículas a través del tiempo. El análisis del DLS se puede observar en la Tabla 24 y en la Figura 24; en estos se puede observar que las nanopartículas de yoduro de cobre hechas a partir de la síntesis previa con extracto de ruda tuvieron un tamaño aproximado de 8nm y tuvo un rango de tamaño de entre 6.9nm y 10.6nm, es decir la diferencia máxima de tamaño entre las mediciones fue de 3.7nm.

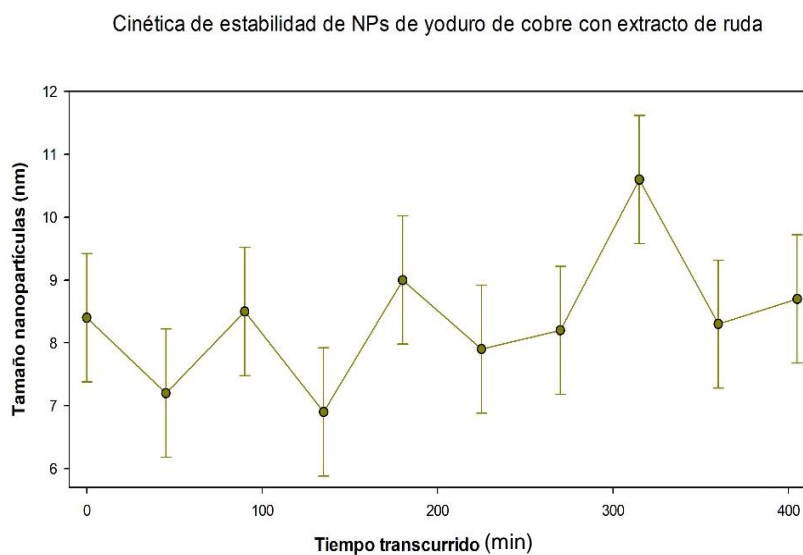
**Tabla 24**

*Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las NPs de yoduro de cobre sintetizadas con extracto de ruda*

Tiempo (Min)	Medición 1 (nm)	Medición 2 (nm)	Medición 3 (nm)	Medición 4 (nm)	Medición 5 (nm)	Promedio General	Desv. Estand. General
0	8.6	8.2	8.4	8.4	8.4		
45	7.2	7	7.4	7.3	7.2		
90	8	8	9	9	8.5		
135	7.2	7	6.8	6.9	6.9		
180	9	8.9	8.8	9.3	9		
225	7.6	7.9	8.2	8.1	7.9	8.37	1.02
270	8	8.3	8.5	8.1	8.2		
315	10.6	10.9	10.5	10.7	10.6		
360	8.2	8.3	8.3	8.4	8.3		
405	8.5	8,9	8.7	8.6	8.7		

**Figura 24**

*Curva de estabilidad cinética de las mediciones para las NPs de yoduro de cobre sintetizadas con extracto de ruda*

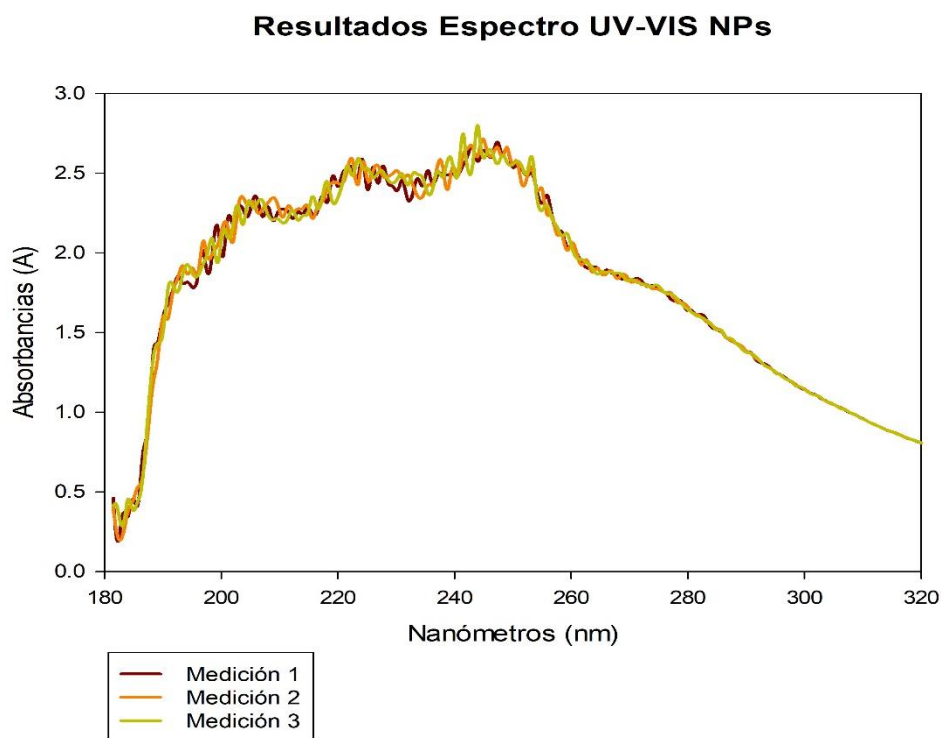


### ***Nanopartículas con extracto de santa maría***

Las nanopartículas de yoduro de cobre que se sintetizaron a partir del extracto de santa maría tuvieron un pH inicial de 7.98 al cual se le reguló con 0.2ml de NaOH hasta alcanzar un pH final de 9.98. Se procedió a analizar la muestra en el UV-Visible y se obtuvo la curva que se muestra abajo en esta se puede observar que la curva tiene un pico en aproximadamente 250nm y que después existe una protuberancia en aproximadamente 275nm antes de empezar el descenso completamente entre 300 y 350nm hasta alcanzar una línea recta estable a partir de 450nm, esto se puede observar en la Figura 25.

**Figura 25**

Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de NPs de yoduro de cobre sintetizadas a partir de NPs de cobre con extracto de Santa María (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.)



Las mediciones del tamaño de nanopartículas se muestra en la Tabla 25 y el análisis de estabilidad cinética en el DLS de las nanopartículas, que se observa en la Figura 26, mostraron que tenían un tamaño promedio de 8.6 nm. Además, el tamaño se encontró en un rango entre 6.4 y 10.1. Lo que muestra una diferencia máxima de 3.7 nm entre el mayor tamaño y el menor tamaño de medición. Las mediciones, la media de ellas y la curva cinética obtenida se pueden observar tanto en la tabla como en el gráfico a continuación.

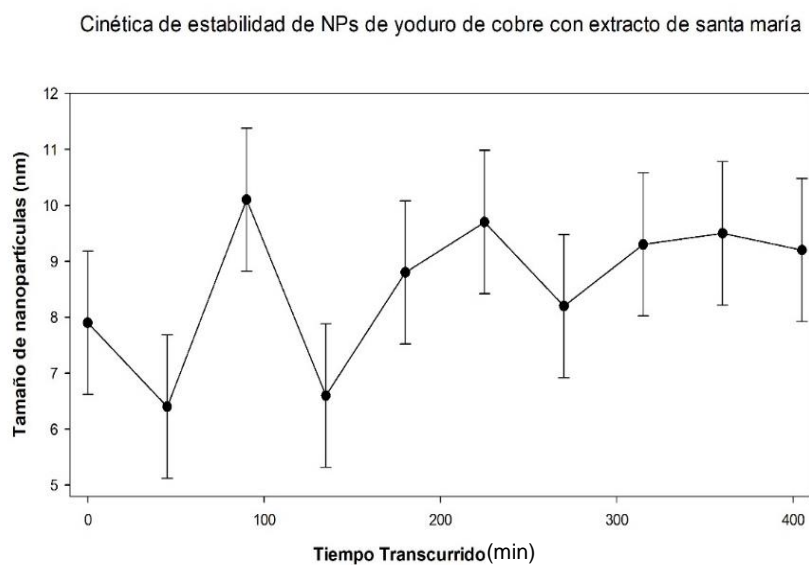
Tabla 25

Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las NPs de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las NPs de cobre a su vez sintetizadas con extracto de santa maría.

Tiempo (Min)	Medición 1 (nm)	Medición 2 (nm)	Medición 3 (nm)	Medición 4 (nm)	Medición 5 (nm)	Promedio General	Desv. Estand. General
0	7.8	7.9	7.9	8	7.9		
45	6	6.6	6.5	6.5	6.4		
90	10.4	10	9.8	10.1	10.1		
135	6	6	7	7.3	6.6		
180	8.8	8.8	8.7	8.9	8.8		
225	10	10.1	9.5	9.3	9.7	8.57	1.28
270	8	8.3	8.2	8.1	8.2		
315	9.5	9.1	9.3	9.3	9.3		
360	9.8	9.3	9.4	9.5	9.5		
405	8.9	9.3	9.2	9.3	9.2		

Figura 26

Curva de estabilidad cinética de las mediciones para las NPs de yoduro de cobre sintetizadas con extracto de santa maría.



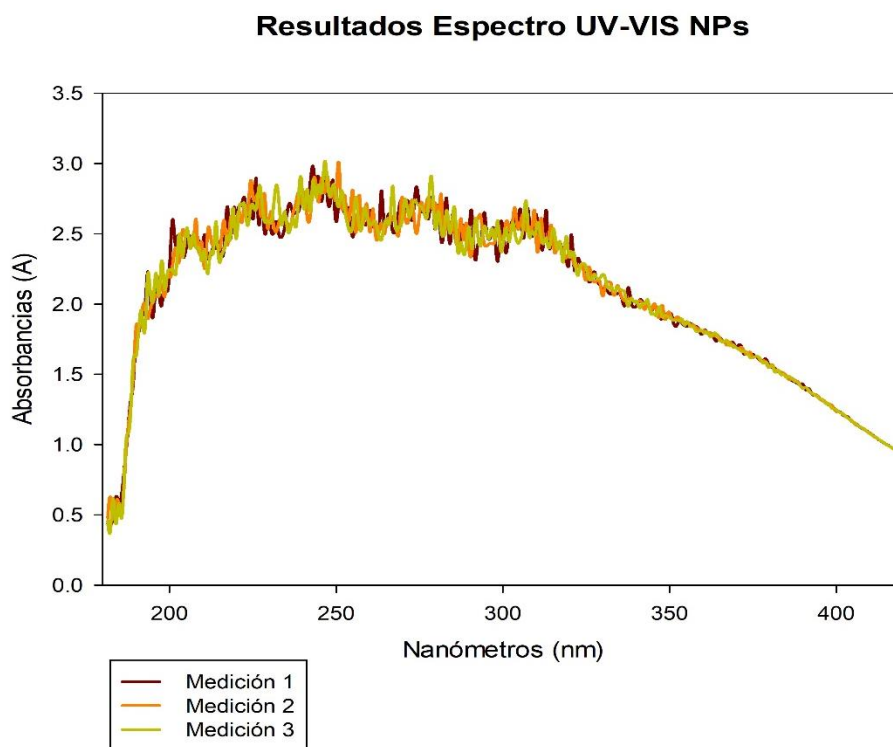


### ***Nanopartículas con extracto de toronjil***

Las nanopartículas obtenidas a partir de extracto de toronjil tuvo un pH inicial de 8.20 al cual se le añadieron 0.3 ml de la solución de NaOH hasta obtener un pH final de 9.23. Se analizó las nanopartículas de yoduro de cobre en el UV-Visible y se obtuvo la curva que se observa en la Figura 27, en la cual se puede observar varios picos entre 200 y 300 nm para después decrecer entre 350 y 600 nm hasta alcanzar una línea recta.

#### **Figura 27**

*Curva obtenida en el UV-Visible del análisis de NPs de yoduro de cobre sintetizadas a partir de NPs de cobre con extracto de toronjil (Melissa officinalis L.)*



Las mediciones del tamaño de las nanopartículas se observan en la Tabla 26 y la curva de estabilidad cinética se muestra en la Figura 28. El análisis de estas mediciones mostró que el tamaño promedio de las nanopartículas sintetizadas a partir de las nanopartículas de cobre con extracto de

toronjil fue de aproximadamente 9.28 nm. A su vez en las mediciones se observó un rango de 6.6 nm como la más pequeña y 10.9 nm como el más grande. Es decir, la mayor diferencia de mediciones es de 4.3 nm entre la mayor medición y la menor. Todas las mediciones se observan en la tabla de abajo y la curva cinética de las nanopartículas se observa en la gráfica.

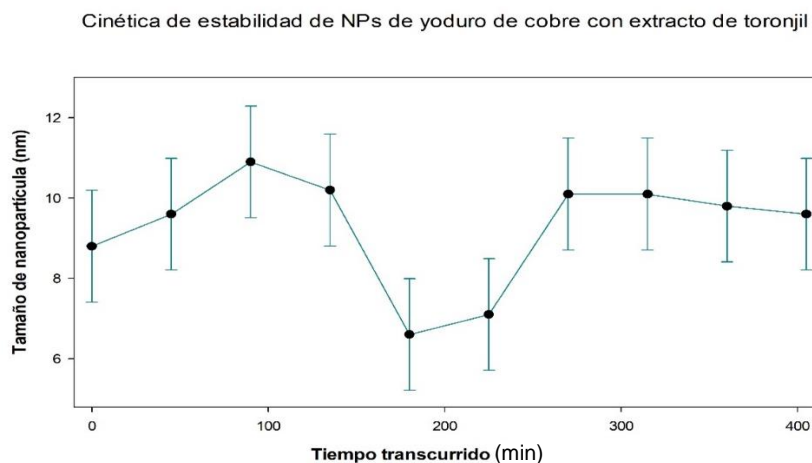
**Tabla 26**

*Mediciones en intervalos de 45 minutos para la elaboración de la curva cinética de estabilidad de las NPs de yoduro de cobre sintetizadas a partir de las NPs de cobre a su vez sintetizadas con extracto de toronjil.*

Tiempo (Min)	Medición 1 (nm)	Medición 2 (nm)	Medición 3 (nm)	Medición 4 (nm)	Medición 5 (nm)	Promedio general	Desv. Estand. General
0	8.7	8.7	9	8.8	8.8		
45	10	9.1	9.6	9.6	9.6		
90	11	10.5	11.2	11.1	10.9		
135	10.2	10.5	10	10.1	10.2		
180	6	7	6.5	6.7	6.6	9.28	1.39
225	7.5	7.1	6.8	6.9	7.1		
270	10.1	10.1	10.2	10	10.1		
315	10.2	10.1	10	10	10.1		
360	9.7	9.9	9.7	9.8	9.8		
405	9	10	9.6	9.7	9.6		

**Figura 28**

*Curva de estabilidad cinética de las mediciones para las NPs de yoduro de cobre sintetizadas con extracto de toronjil.*



## Capítulo V: Discusión

### Concentración de compuestos fenólicos

Estudios previos de plantas medicinales alrededor del mundo han concluido que los flavonoides y otros compuestos fenólicos son los responsables del uso de estas plantas como medicinal ancestral (Tungmunnithum, Thongboonyou, Pholboon, & Yangsabai, 2018). Los fitoquímicos de las plantas cada vez se están estudiando en mayor medida debido a que han demostrado poseer propiedades de interés como anticancerígenos, antibacteriales, protectores cardiacos y muchas más. Estas características son de interés en áreas como la agricultura, la alimentaria, la cosmética y la que mayor impacto tiene es la farmacéutica (Sytar, Hemmerich, Zivcak, Rauh, & Brestic, 2018).

Los resultados del análisis de la concentración de compuestos fenólicos realizados en esta investigación mostraron que todos los extractos tenían cierta concentración de compuestos fenólicos, incluso los extractos obtenidos con agua destilada. La concentración obtenida de llantén en agua destilada tipo 1 fue la menor siendo apenas 1.03 mg EAG/L mientras que la mayor concentración obtenida fue la de ruda en 40% de etanol obteniéndose una concentración de 6.6 mg EAG/L.

En este proyecto de integración curricular no fueron analizados los fitoquímicos específicos presentes en cada una de las plantas. Otros estudios si los han analizado, en el caso de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) un estudio realizado por (Unuigbe, Enahoro, Erharuyi, & Okeri, 2019) concluyó que esta planta posee carbohidratos, azúcares reductores, saponinas, taninos, flavonoides, otros compuestos fenólicos, proteínas y aceites esenciales. Otro estudio realizado por (Sousa, Figueirinha, Batista, & Pina, 2021) realizó una identificación de polifenoles en hierba luisa por HPLC-PDA, los resultados mostraron la existencia de taninos, ácidos fenólicos como cafeíco, ferúlico y p-cumárico; mientras que los dos flavonoides principales encontrados fueron los derivados de luteolina y apigenina. En hierba luisa los mayores resultados obtenidos fueron 11.76 mg EAG/L, 11.32 mg EAG/L y 9.44 mg

EAG/L, las cuales al compararse con las obtenidas por (Delgado & Dagmarali, 2021) las cuales son 8.28 mg EAG/L, 10.59 mg EAG/L y 10.59 mg EAG/L resultan bastante similares.

Otra de las plantas analizadas fue *Plantago major* L., conocida comúnmente como “llantén”, esta planta ha sido estudiada alrededor del mundo debido a que se puede encontrar en numerosos países. Un estudio realizado por (Kobeasy, Abdel-Fatah, El-Salam, & El-Ola, 2011) mostró que el llantén posee 17 de los 22 compuestos que se analizaron, estando entre los principales compuestos fenólicos los ácidos ferúlico, caféico y vanílico; además de que el principal flavonoide identificado fue la luteonina. Un estudio similar en llantén, realizado en Colombia (Galvez & Jácomo, 2019), mostró que la concentración de fenoles totales en llantén fue de aproximadamente 99 mg EAG/L, mientras que el resultado obtenido en esta investigación fue de 1.77 mg EAG/L, al comparar los resultados obtenidos por Galvez y Jácomo, parecen ser totalmente dispares, sin embargo esto se debe a la dilución con la cual se realizaron los análisis; una vez que se realiza un equivalente de las diluciones los resultados obtenidos son más cercanos. Otra característica importante al comparar los estudios realizados anteriormente en *Plantago major* L., es que generalmente al compararla con otras plantas suele ser la que posee menor concentración de compuestos polifenólicos, una característica que se repite a lo largo de este proyecto de integración curricular.

La tercera planta medicinal que se analizó fue *Ruta graveolens* conocida coloquialmente como “ruda” un estudio realizado por (Elasary, y otros, 2020) mostró que los compuestos fenólicos encontrados en ruda fueron cuatro ácidos fenólicos y dos flavonoides. En este estudio se determinó que los principales ácidos fenólicos que posee *Ruta graveolens* es el ácido clorogénico y el ácido p-cumarico. Además, se encontró cantidades altas de flavonoides como rutosida y quercentina. El estudio realizado por (Mokhtar, y otros, 2022) concluyó que la ruda posee una concentración alta de polifenoles por lo que es una de las plantas que puede tener aplicaciones importantes en el área farmacológica. Estos resultados al compararlos con los obtenidos durante este estudio muestran conclusiones similares; esto

se debe principalmente a que la ruda fue la planta medicinal con mayor cantidad de compuestos polifenólicos presentes entre las plantas analizadas. Esto está directamente ligado a los múltiples usos de la planta en medicina ancestral y a que el uso medicinal de esta abarca más de un continente. Los estudios citados previamente se realizaron en Asia o África; por lo que se puede intuir que los usos medicinales de la planta han sido adaptados de estos continentes.

*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip., conocida comúnmente como “santa maría” es una planta medicinal que se usa tradicionalmente para tratar dolores de cabeza y migrañas. El uso ancestral de esta planta ha hecho que en la actualidad estudios se interesen en los compuestos fenólicos que esta posee y en el mejor método de extracción de los mismos. El estudio realizado por (Zengin, y otros, 2020) comparó técnicas de extracción de compuestos polifenoles de santa maría, en todas se obtuvieron concentraciones de polifenoles mayores a 45 mg EAG/L de extracto. El análisis por cromatografía líquida de ultra alta presión y espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), realizado en este estudio mostró que los compuestos fenólicos presentes en *Tanacetum parthenium* fueron los derivados del ácido caféico. Estos resultados comparados con la mayor medición obtenida en este estudio la cual es 5.34mg EAG/L, esto se debe a que nuestro análisis se realizó con diluciones sumamente altas por lo que las concentraciones obtenidas parecen ser bajas a simple vista, pero en realidad se encuentran en un nivel prácticamente equivalente a las observadas en otros estudios.

La última planta medicinal analizada fue *Melissa officinalis* L., un estudio realizado por (Tulek, y otros, 2020) y otro realizado por (Zam, y otros, 2022) mostraron que los principales compuestos fenólicos que se encuentran en el toronjil son compuestos volátiles como: geranial y citronella; ácidos fenólicos, siendo el ácido rosmarico el de mayor concentración; además se encontraron flavonoides como la luteonina. En el estudio previamente realizado por (Medina, 2019), en la cual determinó en la cuantificación de fenoles totales que el toronjil posee cuando se analiza extracto seco es de 34.5 mg EAG/L; esto al compararlo con los resultados obtenidos en el desarrollo del proyecto de integración

curricular el cual fue de 5.66 mg EAG/L se observa que al analizar el extracto seco se obtienen mayores cantidades de compuestos polifenólicos que al utilizar muestras frescas para el análisis. A pesar de que se observa una diferencia dependiendo del estado del extracto, ambos extractos presentaron concentraciones altas de compuestos polifenólicos al compararlos con otros resultados obtenidos durante este proyecto de integración curricular como es el caso del llantén (*Plantago major* L.).

Los resultados analizados en este proyecto como todos los artículos y tesis citados anteriormente corroboran nuestros resultados que de las 5 plantas analizadas: hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), llantén (*Plantago major* L.), ruda (*Ruta graveolens* L.), santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y toronjil (*Melissa officinalis* L.), todas poseen compuestos fenólicos dentro de sus extractos, pero la ruda (*Ruta graveolens* L.), la santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y el toronjil (*Melissa officinalis* L.) poseen mayor cantidad de estos y por ello fueron seleccionadas para la síntesis de nanopartículas de cobre y de yoduro de cobre.

### **Capacidad antioxidante**

Todas las plantas medicinales analizadas presentaron un alto porcentaje de capacidad antioxidante, siendo el menor porcentaje 51% para la muestra de llantén. Estos resultados respaldan el uso en medicinal ancestral, debido a los efectos positivos en la salud de las personas que las consumen tanto de infusiones o extractos de estas plantas en cremas, fármacos, infusiones, etc. Ya se han discutido previamente las concentraciones de compuestos polifenólicos y los tipos de estos compuestos que se encuentran en cada una de las plantas: hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), llantén (*Plantago major* L.), ruda (*Ruta graveolens* L.), santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y toronjil (*Melissa officinalis* L.). Estas cantidades suelen estar directamente relacionadas con el porcentaje de capacidad antioxidante de cada uno de los extractos por lo que la mayoría de estudios citados anteriormente también presenta un análisis de la capacidad antioxidante, en su mayoría con el método de DPPH.

Los resultados obtenidos en las concentraciones de compuestos polifenólicos y los obtenidos en el porcentaje de capacidad antioxidante estuvieron relacionados, es decir los tres extractos con mayor concentración de compuestos polifenólicos coincidieron en ser los que obtuvieron mayor capacidad antioxidante. Es importante mencionar que el primer análisis se lo llevó a cabo con el extracto diluido 1:100 y el segundo análisis se lo hizo con el extracto puro.

Para la capacidad antioxidante, los resultados obtenidos para hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), fue de un 58% de capacidad antioxidante; el estudio realizado por (Sah, Sia, Kiat, Kwang, & Seng, 2012) mostró que la hierba luisa analizada tenía una capacidad antioxidante de alrededor de 62% lo que muestra una diferencia de apenas un 4%. Esto muestra que a pesar de que hay una diferencia de 10 años entre el análisis citado y el análisis realizado durante este proyecto de integración curricular los dos resultados mostraron un porcentaje sumamente similar, lo que sugiere que los metabolitos secundarios que se encontraron hace diez años son similares a los encontrados en el presente.

Otra de las plantas analizadas fue el llantén (*Plantago major* L.), los resultados que obtuvimos del análisis fue que esta planta tenía un 51% de capacidad antioxidante, sin embargo otros estudios que analizaron esta misma planta mostraron resultados muy variados, incluso (Rico, Sanchez, Trujillo, & Pérez, 2013) usaron muestras de llantén de España y obtuvieron un porcentaje de capacidad antioxidante del 90.9%; es decir existe una diferencia del 40% entre los resultados obtenidos en dos estudios. Al investigar la planta más a fondo *Plantago major* L. es una planta de origen europeo y asiático, que en la actualidad está distribuida en toda Europa, Norte de África, el Occidente de Asia, Norteamérica y América Latina hasta Ecuador. Esta es considerada una “mala hierba” debido a su facilidad para crecer y reproducirse, por ello se la encuentra en praderas, laderas y en los laterales de carreteras y caminos (Blanco, Saborio, & Garro, 2008). La facilidad de adaptación de *Plantago major* L. muestra que los metabolitos que esta posee son capaces de ayudarla a sobrevivir al estrés abiótico y

biótico que pueden presentarse en diferentes territorios, es esto también lo que puede contribuir a su tan variado porcentaje de capacidad antioxidante.

La tercera planta analizada fue ruda (*Ruta graveolens* L.), el análisis mostró que la capacidad antioxidante de esta planta fue del 82%, mientras que (Naveda, 2010) determinó que la ruda poseía un 70.60% de capacidad antioxidante. Los dos estudios fueron realizados con muestras de plantas obtenidas de Pichincha por lo que comparten características similares de terreno en la que han sido cultivadas. Sin embargo, hay una diferencia significativa de un poco más del 10% de actividad antioxidante, esto se puede dar debido al tiempo que ha transcurrido entre un estudio y el otro, doce años, o también puede ser un efecto de que los cambios presentes en la tierra de la provincia han sufrido alteraciones que han hecho que el porcentaje de antioxidantes en la planta aumente.

A continuación, se analizó la santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.), los resultados que se obtuvieron fue que esta planta posee una capacidad antioxidante del 63%. Un estudio realizado por (Hwan, y otros, 2019) que analizó 22 extractos de plantas de Perú, obtuvo que *Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip. tiene una capacidad antioxidante de 61.1% lo que demuestra que los resultados de esta planta son consistentes con los obtenidos durante este estudio. A diferencia de los otros estudios que se usaron para comparar los resultados de otras plantas este es mucho más cercano en fecha, aproximadamente realizado solamente dos años después; el tiempo de diferencia entre estudios podría estar directamente relacionado con la similitud de resultados. Ambos estudios confirmaron que *Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip. tiene una capacidad antioxidante alta, con más del 60% por lo que es una planta que sería buena candidata para síntesis verde de nanopartículas.

Finalmente, se analizó toronjil (*Melissa officinalis* L.) los análisis de esta planta mostraron que tenía un porcentaje de capacidad antioxidante del 61%. Un estudio anterior (Moaca, y otros, 2018) mostró que analizar diferentes concentraciones de *Melissa officinalis* L. obtenía diferentes porcentajes



de actividad antioxidante, en este caso una concentración de 6mg/ml mostró una capacidad antioxidante de aproximadamente un 70%. Otro estudio realizado con extractos a partir de agua (Koksal, Bursal, Dikici, & Tozoglu, 2011) mostraron que la capacidad antioxidante cuando se realizan extractos de este tipo es menor, 47.8% a los extractos a partir de etanol donde dependiendo del tratamiento de la muestra se pueden obtener una capacidad antioxidante entre 60%-90%.

Como pudimos observar y comparar con otros estudios las capacidades antioxidantes de las plantas estudiadas en la mayoría de casos tienden a variar o tener diferencias entre los estudios. Esto como ya se explicó anteriormente se debe a que los metabolitos secundarios no solo dependen de las rutas metabólicas de cada planta; sino también están relacionados con el estrés biótico y abiótico que la planta esté experimentando en esa época y momento preciso. Por ello, aunque se analicen las mismas plantas en diferentes años, meses o incluso días de diferencia puede existir cambios dentro de los metabolitos secundarios que la planta necesita en ese instante. Otro estudio (Pokorny, Yanishlieva, & Gordon, 2005) menciona que las diferencias en actividad antioxidante de las diferentes plantas depende directamente del solvente que se use al momento de realizar la extracción. En los diferentes estudios usados para comparar se usaron métodos de extracción con etanol esto debido a que con ello las variantes disminuían y la comparación sería más exacta; sin embargo, existían muchos otros estudios con solventes como acetona, butanol o metanol que también se consideran buenas alternativas para realizar extractos de plantas.

### **Nanopartículas de cobre**

Los extractos de frutas y plantas se han utilizado para la síntesis verde de nanopartículas en los últimos años. Ensayos previos como el de (Murgueitio, 2018) comprobó que se pueden sintetizar nanopartículas de hierro cero valente a partir de extractos de frutas como el capulí y el mortiño. Al igual que en este proyecto integrador, el proyecto de (Murgueitio, 2018) mostró que los extractos vegetales son excelentes agentes reductores y estabilizantes durante la síntesis verde de nanopartículas y que

además las nanopartículas sintetizadas con ellos pueden utilizarse para aplicaciones como la bioremediación de suelos.

Las nanopartículas de cobre son consideradas en la actualidad una alternativa menos costosa y aproximadamente igual de eficiente que las nanopartículas de oro y de plata. La síntesis química de las nanopartículas de cobre depende de la reacción inicial entre el sulfato de cobre con el boro hidruro de sodio y agua. El boro hidruro en este caso funciona como un reductor, lo cual en la síntesis verde de nanopartículas es cambiado y se usa los extractos de plantas como agentes reductores. A pesar de presentar una buena alternativa, la síntesis verde también presenta muchos desafíos en común con la síntesis química de nanopartículas. Uno de estos desafíos son las reacciones secundarias que ocurren a la vez las cuales tienen la tendencia a generar nanopartículas de cobre oxidadas debido a que este es el estado más estable del cobre (Markin & Markina, 2019).

El estudio realizado en el 2019 por Markin y Markina, presenta las diferentes curvas que se pueden obtener en el espectro UV-Visible con nanopartículas frescas, oxidadas y agregadas. Dentro de este estudio la curva presentada para las nanopartículas de cobre oxidadas es casi exactamente igual a la obtenida durante los análisis de las nanopartículas sintetizadas con los extractos vegetales seleccionados. Las curvas tanto de las nanopartículas sintetizadas en este estudio como las presentadas por Markin y Markina, mostraron un pico de absorbancia que decrecía en los 500nm.

A pesar de que en el pasado la hipótesis era que las nanopartículas de cobre oxidadas no tenían la misma actividad y tenían menos usos que las nanopartículas no oxidadas; en la actualidad estudios como el de (Salahuddin & Husen, 2020) muestran que tanto las nanopartículas de cobre y las nanopartículas de óxido de cobre son estables y han presentado buenos resultados en aplicaciones que van desde la degradación de tintes, antibacterial, antioxidante y anti fúngico; estas últimas tres aplicaciones se deben a que las nanopartículas de cobre y de óxido de cobre presentan citotoxicidad.

Otras aplicaciones en donde se están utilizando las nanopartículas de cobre oxidadas es en la agricultura, donde se ha observado que estas nanopartículas pueden tener efectos en la cantidad de clorofila, carotenoides, azúcares, antocianinas y otras moléculas. Todas las utilidades antes mencionadas son aplicables a las nanopartículas sintetizadas con química verde a partir de los extractos de plantas.

Las nanopartículas sintetizadas mostraron un tamaño de entre 9-10 nm el cual se mostró relativamente estable a través de las mediciones realizadas. Este tamaño concuerda con el obtenido en un estudio previo por (Rios, y otros, 2015) mostró que el tamaño promedio de las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas por la vía química a partir de acetato de cobre e hidróxido de sodio fue de 8 nm en promedio lo que muestra que la síntesis química tradicional y la síntesis verde obtiene nanopartículas de tamaños similares. Esto muestra que a través de la síntesis verde pueden obtenerse buenos resultados de nanopartículas, sin embargo, para obtener nanopartículas no oxidadas es necesario más estudio y realizar la síntesis en un ambiente estéril y con la menor presencia de oxígeno posible.

### **Nanopartículas de yoduro de cobre**

Las nanopartículas de yoduro de cobre se obtuvieron por síntesis verde utilizando nanopartículas de cobre sintetizadas previamente y adicionando una sal de yodo, en este caso yoduro de potasio. Los resultados obtenidos mostraron nanopartículas de tamaños en un rango promedio entre 8-9nm. Esto muestra una disminución de tamaño de aproximadamente 1 nanómetro entre las nanopartículas de cobre utilizadas para la síntesis de las nanopartículas de yoduro de cobre. Las curvas obtenidas el espectro UV-VIS se compararon con las de un estudio similar de síntesis con jugo de *Punica granatum* (Abass, Alaubydi, & Ulwali, 2020) estas curvas mostraron un pico entre 210 y 240nm, otro estudio (Archana, Rajagopal, Gayathri, & Aishwarya, 2021) de síntesis verde utilizando flores de *Hibiscus* mostró resultados similares en el espectro UV-DRS donde se mostró que la absorbancia decrecía alrededor de los 300nm, donde se convertía en una línea constante.

Los resultados expuestos anteriormente y los obtenidos durante este proyecto integrador muestran similitudes en las curvas obtenidas durante el análisis realizado por espectro UV-VIS. Las tres nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas durante este proyecto de integración curricular mostraron picos similares y después un decrecimiento en la curva alrededor de 300nm. Lo que confirma que se han sintetizado nanopartículas de yoduro de cobre. En los resultados obtenidos se mostró que existían una diferencia de hasta 4.3 nm entre los tamaños de nanopartículas, todos los estudios anteriormente citados también mostraron que podían existir variaciones en los tamaños de las nanopartículas.

### **Capítulo VI: Conclusiones**

Todas las plantas medicinales poseían capacidades antioxidantes altas de más del 50%, además, incluso las extracciones hechas a partir de solo agua destilada, es decir con una concentración de etanol del 0%, se obtuvo concentraciones de polifenoles medibles.

Las plantas con la mayor concentración de compuestos fenólicos también fueron las que tenían mayor porcentaje de capacidad antioxidante, por ello fueron las seleccionadas para la segunda parte de este proyecto: ruda (*Ruta graveolens* L.), santa maría (*Tanacetum parthenium* L. Sch.Bip.) y toronjil (*Melissa officinalis* L.).

Se sintetizaron nanopartículas de óxido de cobre, debido a que existió interacción con oxígeno durante la síntesis presente en el aire haciendo que el cobre reaccione formando nanopartículas oxidadas. Estas nanopartículas aún son capaces de ser utilizadas para aplicaciones como antibacteriano, anti fúngico, entre otras.

Las nanopartículas de yoduro de cobre sintetizadas a partir de estos extractos mostraron buena estabilidad y curvas prácticamente iguales a las reportadas en los otros estudios citados en este texto.

Se comprobó la hipótesis planteada para este proyecto de integración curricular, la cual es “Los extractos polifenólicos con alta concentración de fenoles, obtenidos de plantas de Ecuador, funcionan como agentes estabilizantes y reductores en la síntesis de nanopartículas.”.

### **Capítulo VII: Recomendaciones**

Es recomendable realizar otros análisis de las nanopartículas sintetizadas por este método con equipos como el microscopio electrónico (TEM) y el microscopio electrónico de barrido (SEM). Se recomienda seguir con el estudio de las nanopartículas sintetizadas con extractos de plantas medicinales de Ecuador y aplicar estas nanopartículas a diferentes áreas para ver su efectividad.

### **Capítulo VII: Bibliografía**

- Abass, N., Alaubydi, M., & Ulwali, R. (2020). PREPARATION, CHARACTERIZATION OF INORGANIC COPPER IODIDE NANOPARTICLES USING POMEGRANATE JUICE EXTRACT AND APPLICATIONS AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *Plant Archives*, 2333-2340.
- Alárcon , H., Tolmos, M., Villacrés, N., & Huarote, E. (2021). Química verde - Una alternativa eco-amigable en la obtención de nanopartículas de Ag<sup>0</sup>. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 87 No.3.
- Al-Hakkani, M. (2020). Biogenic copper nanoparticles and their applications: A review. *SN Applied Sciences*, article number 505.
- Alharbi, N., Alsubhi, N., & Felimban, A. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 109-124.

- Archana, K., Rajagopal, R., Gayathri, V., & Aishwarya, S. (2021). Application of green synthesised copper iodide particles on cotton fabric-protective face mask material against COVID-19 pandemic. *Journal of Materials Research and Technology*, 2102-2116.
- Badri, K., & Sakthivel, N. (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci*, 59-79.
- Blanco, B., Saborio, A., & Garro, G. (2008). Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor). *Tecnología en Marcha*, 17-24.
- Bottaso, N. (2019). Sistemas y prácticas de medicina ancestral para el desarrollo sostenible. *Etnobiología*, Vol. 17 Num 3.
- Butkovic, V., Klasinc, L., & Bors, W. (2004). Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2816-2820.
- Cadenas, G. (2021). *Síntesis de Nanopartículas Metálicas y Estudio de sus Aplicaciones*. Ciudad de México: Departamento de Síntesis de Polímeros del CIQA.
- Chand, K., Cao, D., Fouad, D., Shah, H., Dayo, A., Zhu, K., . . . Dong, S. (2020). Green synthesis, characterization and photocatalytic application of silver nanoparticles synthesized by various plant extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 8248-8261.
- Chang, R., Kenneth, G., Alvarez, R., & Ponce, S. (2013). *Química*. México D.F.: McGraw Hill.
- Delgado, G., & Dagmarali, A. (2021). *Cuantificación de polifenoles totales en extractos hidroalcohólicos de siete plantas medicinales de la región La Libertad*. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.

- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., & Liu, R. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Agricultural and Food Chemistry*, 3010-3014.
- Dieterich, W. (1985). Superionic Conductors. *Journal of Statistical Physics*, 583-596.
- El Tiempo. (11 de julio de 2018). *Ecuador - Mercados: plantas y sabiduría medicinales*. Obtenido de [https://www.biodiversidadla.org/Noticias/Ecuador\\_-\\_Mercados\\_plantas\\_y\\_sabiduria\\_medicinales](https://www.biodiversidadla.org/Noticias/Ecuador_-_Mercados_plantas_y_sabiduria_medicinales)
- Elasary, H., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., El-Ansary, D., Al-Mana, F., & Mahmoud, E. (2020). Polyphenol Content and Biological Activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. *Processes*, No. 531.
- El-Shafey, A. M. (2019). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. *Green Processing and Synthesis*.
- Feoktistova, L., & Clark, Y. (2018). El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Medisur versión online*, volumen 16 no. 4.
- Fernandez, A., Archana, K., & Rajagopal, R. (2020). Green synthesis, characterization, catalytic and antibacterial studies of copper iodide nanoparticles synthesized using *Brassica oleracea* var. capitata f. rubra extract. *Chemical Data Collections*, 100538.
- Fernández-Panchón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vitro. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 110-122.
- FLACSO Ecuador. (2015). *Etnohistoria de los pueblos y nacionalidades originarias de Ecuador*. Obtenido de <https://www.care.org.ec/wp-content/uploads/2016/02/Modulo-2.pdf>

- Freeman, B. L., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2010). Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *Journal of Food Science.*, 570-576.
- Galvez, S., & Jacobo, Y. (2019). "Efecto Gastroprotector de los Extractos Etanólicos de *Plantago Major* "Llantén" y de *Piper Aduncum* "Matico" Sobre la Mucosa Gástrica de Ratas Albinas con Gastritis Aguda Inducida, Arequipa-2019". Colombia: Universidad Católica de Santa María.
- García Vieyra, M. I., Jaramillo Arellano, J. E., Guajardo García, J. A., Sánchez Carmona, A., & Rodríguez Guerrero, K. L. (2022). Perfil Fitoquímico y capacidad antioxidante de tés de flores de plantas medicinales. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, Vol. 16.
- Garrido, M., Cosme, P., Rodriguez, A., & Espino Javier. (2020). Plant Phenolics. *Scholarly Community Encyclopedia*.
- Gil, E. S., & Couta, R. O. (2013). Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical 4 applications. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 542-558.
- Guzmán Duxtan, A., Rengifo, C., & Echevarría, J. (2020). Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPs Cu) por el método poliol asistido vía microondas (MW). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, Vol. 86 No.4.
- Harborne, J. B. (1973). *Biochemistry of phenolic compounds*. Springer Dordrecht.
- Hernández Moreno, L. V., Salazar, J. R., Hernández Rodríguez, P., & Pabón, L. (2022). Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles y flavonoides de plantas colombianas empleadas en infecciones urinarias. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.
- Hwan, S., Kim, H.-Y., Guillen, Y., Wang, Z., Zou, G., & Sung, S. (2019). Aldose Reductase, Protein Glycation Inhibitory and Antioxidant of Peruvian Medicinal Plants: The Case of *Tanacetum parthenium* L. and Its Constituents. *Molecules*, 24(10).



- Imran Din, M., & Rehan, R. (2017). Synthesis, Characterization, and Applications of Copper. *ANALYTICAL LETTERS*, 50-62.
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*.
- Jadoun, S., Arif, R., Kumari, N., & Kumar, R. (2020). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. *Environmental Chemistry Letters*.
- Jordá, A. (2020). *Compuestos fenólicos para superar situaciones de estrés abiótico*. Obtenido de <https://aefa-agronutrientes.org/compuestos-fenolicos-para-superar-situaciones-de-estres-abiotico>
- Kapoor, S., Joshi, R., & Mukherjee, T. (2002). Influence of I<sup>-</sup> Anions on the Formation and Stabilization of Copper Nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.*, 443--448.
- Kobeasy, M., Abdel-Fatah, O., El-Salam, S., & El-Ola, Z. (2011). Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 83-91.
- Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., & Tozoglu, F. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plant Research*, 217-222.
- Markin, A., & Markina, N. (2019). Experimenting with Plasmonic Copper Nanoparticles To Demonstrate Color Changes and Reactivity at the Nanoscale. *Journal of Chemical Education*, 1438-1442.
- Markina, N., Pozharov, M., & Markin, A. (2016). Synthesis of Copper(I) Oxide Particles with Variable Color: Demonstrating Size-Dependent Optical Properties for High School Students. *J. Chem. Educ.*, 704-707.
- Mazón, N., Castillo, R., Velásquez, J., & Barrera, J. (1997). Las plantas medicinales de la Sierra ecuatoriana: Biodiversidad y usos. *Boletines INIAP*, 1-5.

- Medina, Y. (2019). "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) EN RATONES (*Mus musculus*)". Riobamba: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Mejía, F., Salcedo, J., Vargas, S., Serna, J., & Torres, L. (2018). CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE TUBÉRCULOS ANDINOS (*Tropaeolum tuberosum* Y *Ullucus tuberosus*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 449-456.
- Moaca, E., Farcas, C., Ghitu, A., Coricovac, D., Popovici, R., Caraba, N., . . . Avram, S. (2018). A Comparative Study of *Melissa officinalis* Leaves and Stems Ethanolic Extracts in terms of Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12.
- Mokhtar, M., Youcefi, F., Keddari, S., Saimi, Y., Otsmane, S., & Cacciola, F. (2022). Phenolic Content and in Vitro Antioxidant, Anti-Inflammatory and antimicrobial Evaluation of Algerian *Ruta graveolens* L. *Chemistry & Biodiversity*, volumen 19. issue 9.
- Monar, P., Lagla, G., & López, S. (2019). *Pichincha - Plantas Medicinales de Mercados de Quito*. Obtenido de <https://fieldguides.fieldmuseum.org/es/gu%C3%ADas/gu%C3%ADa/851>
- Murgueitio, E. (2018). *Síntesis, caracterización y aplicación de nanopartículas de hierro, en la remoción de HTPs en suelos y aguas de la provincia de Francisco de Orellana – Ecuador*. Francisco de Orellana: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Naveda, G. F. (2010). *ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE RUDA (*Ruta graveolens*), CON ALTO CONTENIDO DE POLIFENOLES*. Quito: ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL .
- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, 135-143.

- Pájaro, N., & Olivero, J. (2011). QUÍMICA VERDE: UN NUEVO RETO. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, Vol. 21 No. 2.
- Pérez, E. (2014). *Síntesis, caracterización y aplicaciones tecnológicas de nanopartículas de yoduro de mercurio*. Uruguay: Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Química.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). *Antioxidantes de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Ranganna, S. (1977). *Manual of Analysis of Fruits and Vegetable Products*. Washington, D.C.: McGraw-Hill.
- Rico, M., Sanchez, I., Trujillo, C., & Pérez, N. (2013). Screening of the antioxidant properties of crude extracts of six selected plant species from the Canary Islands (Spain). *Journal of Applied Botany and Food Quality*.
- Rios, G., Giannini, C., Siliqi, D., Altamura, S., Sibillano, T., Solís, J., & Gomez, M. (2015). Estudio morfológico y estructural de nanopartículas de Cu O empleando técnicas de dispersión de luz y rayos X. *Rev. Soc. Quím. Perú [online]*, 254-262.
- Rodríguez-Hernández, D. (2019). Metabolitos secundarios como estrategia de supervivencia en plantas de hábitat de alta montaña. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 444-458.
- Ruiz, M. (2020). *Determinación de la capacidad antioxidante*. Colombia: Universidad Simón Bolívar.
- Ruiz, S., Venegas, E., Valdivieso, J., & Plasencia, J. (2018). Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante in vitro del zumo de "pur pur" *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (Passifloraceae). *Arnaldoa*, V. 25 N.3.

- Sah, S., Sia, C., Kiat, S., Kwang, Y., & Seng, H. (2012). ANTIOXIDANT CAPACITY AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF LEMONGRASS (CYMBOPOGON CITRATUS) LEAVE. *Annals. Food Science and Technology*, 150-155.
- Salahuddin, K., & Husen, A. (2020). Current status of plant metabolite-based fabrication of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review. *Biomaterials Research*, Article number 11.
- Salgado, D. (2018). *Aplicación de nanopartículas de Fe(0) sintetizadas con extracto de mora (Rubus glaucus) en suelos contaminados artificialmente con fenantreno para su remoción*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Santos-Espinoza, A., Gutiérrez-Miceli, F., Ruíz-Vadiviezo, V., & Montes-Molina, J. (2020). El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. *BioTecnología*, 46-57.
- Sebastián, V. (2018). Nanocristales, nuevos materiales con propiedades y aplicaciones únicas. *ISSN*, 306-314.
- Simić, A., Manohlović, D., Segan, D., & Todorovic, M. (2007). Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics. *PubMed*.
- Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D., & Yang, D.-C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 588-599.
- Sousa, R. w., Da Rocha, C., Cardoso, C. L., Silva, S. D., & Zanoni, B. M. (2004). Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 619-633.
- Sousa, R., Figueirinha, A., Batista, M. T., & Pina, M. E. (2021). Formulation Effects in the Antioxidant Activity of Extract from the Leaves of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Molecules*, Artículo 26.

- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., & Brestic, M. (2018). Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 631-641.
- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Classification of Phenolic Compounds in Plants. En *Polyphenols in Plants* (pág. Cap 16).
- Tulek, Z., Alasalvar, H., Basyigit, B., Berktaş, S., Salum, P., Erbay, Z., . . . Cam, M. (2020). Extraction optimization and microencapsulation of phenolic antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis* L.): Instant soluble tea production. *Journal of Food Processing and Preservation*, volume 45.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Antioxidant and Anti-aging Action of Plant Polyphenols*, n3: 93.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, no.3.
- Unuigbo, C., Enahoro, J., Erharuyi, O., & Okeri, H. (2019). Phytochemical analysis and Antioxidant Evaluation of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* DC.) Stapf Leaves. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 223-228.
- Valencia-Avilés, E., Ignacio Figueroa, I., Sosa Martínez, E., Bartolomé Camacho, M., Martínez Flores, H., & García Pérez, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*(16), 15-30.

- Vijayakumar, A., & Rajagopal, R. (2016). Green Synthesis and Characterisation of Copper (I) Iodide nanoparticles using kidney bean seed extract and its anti-bacterial activity. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 602-609.
- Wang, Z. (2000). Characterizing the structure and properties of individual wire-like nanoentities. *Advanced Materials*, 1295-1298.
- Waris, A., Din, M., Ali, A., Ali, M., Afridi, S., Baset, A., & Ullah, A. (2021). A comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Inorganic Chemistry Communications*, Volume 123.
- Yabuki, A., & Arrifin, N. (2010). Electrical conductivity of copper nanoparticle thin films annealed at low temperature. *Thin Solid Films*, 7033-7037.
- Yáñez Yunga, L. A. (2022). *Compuestos fenólicos en plantas del Ecuador, revisión de propiedades y beneficios medicinales*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/26414/1/UCE-FCQ-CQF-YANEZ%20LUIS.pdf>
- Zam, W., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., López, M. D., Schoebitz, M., Martorell, M., . . . Pezzani, R. (2022). An Updated Review on The Properties of *Melissa officinalis* L.: Not Exclusively Anti-anxiety. *Frontiers in Bioscience Scholar*, volume 16.
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, Vol. 5 No. 1.
- Zengin, G., Cvetanovic, A., Gasic, U., Stupar, A., Buluf, G., Senkardes, I., . . . Fawzi, M. (2020). Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. *Industrial Crops and Products*, volume 146.

