



**Síntesis y caracterización de nanocompositos de aceite esencial de eucalipto  
(*Eucalyptus globulus* Labill) con nanopartículas de plata bio-reducidas con extracto de  
romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Sangotuña Gonzalez, Danilo Javier

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

Msc. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo Ph.D.

25 de agosto de 2023

# Copyleaks

Plagiarism report

## PUIC Antiplagio Sangotuña Danilo.do...

### Scan details

Scan time:  
September 4th, 2023 at 20:27 UTC

Total Pages:  
25

Total Words:  
6246

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.4%	27
Minor Changes	0.4%	22
Paraphrased	1.1%	70
Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

### Plagiarism Results: (3)

2183

1.3%

[https://analesdequimica.es/index.php/analesquimica/articler/...](https://analesdequimica.es/index.php/analesquimica/articler/)

Investigación Química Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas Miguel Monge Resumen: Los mé...

TFG-memoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=...

0.3%

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/118065...>

TRABAJO FIN DE GRADO Grado en Ingeniería Química SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS A PARTIR DE EXTRACTOS DE RASPO DE UVA...

T-ESPEL-IPE-0122.pdf

0.3%

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/30922/1/t-e...>

DARWIN SANTIAGO PROAÑO CARRERA

1 Carátula Sistemas de nanopartículas a partir de biopolímeros Proaño Carrera, Darwin Santiago Departamento de Ciencias de la Energía ...



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 y caracterización de nanocompositos de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) con nanopartículas de plata bioreducidas con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**” fue realizado por el señor Sangotuña Gonzalez, Danilo Javier 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 analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de septiembre del 2023



Msc. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo Ph.D.

C. I. 1714479506



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Biotecnología**  
**Responsabilidad de Autoría**

Yo **Sangotuña Gonzalez Danilo Javier**, con cédula de ciudadanía n°1753489218, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Síntesis y caracterización de nanocompositos de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) con nanopartículas de plata bio-reducidas con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)** 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, 28 de agosto del 2023**

  
**Sangotuña Gonzalez Danilo Javier**

**C. I. 1753489218**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Biotecnología**  
**Autorización de Publicación**

Yo **Sangotuña Gonzalez Danilo Javier**, con cédula de ciudadanía n°1753489218, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Síntesis y caracterización de nanocompositos de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) con nanopartículas de plata bioreducidas con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 28 de agosto del 2023**

A handwritten signature in blue ink is positioned above a horizontal dotted line. The signature is cursive and appears to read 'Sangotuña Gonzalez Danilo Javier'.

**Sangotuña Gonzalez Danilo Javier**

**C. I. 1753489218**

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a mi madre Lucila Gonzalez, mi fuente de inspiración, ella es mi impulso y mis ganas de seguir adelante que, pese a los momentos difíciles que pudieron haber pasado, siempre se presenta con una sonrisa. Su fortaleza es mi mayor motivación para seguir esforzándome y conseguir mis metas.

A mis amigas Daniela, Alicia y Misshell por permitirme aprender de ellas y crecer no solo en conocimiento, sino también como persona.

Esta tesis es posible gracias a ustedes.

***Danilo Javier Sangotuña Gonzalez***

## **Agradecimientos**

Agradezco primero a mis padres Jaime y Lucila, por haberme apoyado en todo momento, sepan que su entrega y endereza al educarme han hecho que pueda tomar decisiones con sabiduría y no derrumbarme en los momentos difíciles.

A mis amigos Dani, Ali, Roger, Mishu, Leidy, Glenda, Giss y Yadii por formar parte de mi experiencia universitaria y permitirme compartir momentos que ahora forman parte de mis mejores años de vida.

Doy gracias a la universidad de las Fuerzas Armadas por forjar mi carácter dándome duras lecciones de vida y, permitiéndome formarme como un profesional en lo que tanto me apasiona.

Mi gratitud también a las técnicas de laboratorio Cari Stael y Geovi Arroyo por compartir su conocimiento de manera desinteresada, gracias por el apoyo y por crear un ambiente agradable en mi estancia en el laboratorio de materiales avanzados.

Agradezco a Gaby Ayala por haberme apoyado de forma incondicional cuando más lo necesité, estaré en deuda contigo para toda la vida.

Finalmente, agradezco a quien se haya tomado el tiempo de leer este pequeño apartado de mi tesis, espero sea de utilidad la información que encontró en ella y sea provechoso para su conocimiento.

***Danilo Javier Sangotuña Gonzalez***

## Índice de contenido

<b>Resumen</b> .....	14
<b>Abstract</b> .....	15
<b>Capítulo I: Introducción</b> .....	16
Planteamiento del problema .....	16
Justificación del problema.....	17
Objetivos de investigación: .....	18
Objetivo general: .....	18
Objetivos específicos:.....	18
Hipótesis:.....	18
<b>Capítulo II: Marco teórico</b> .....	19
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero).....	19
Extracto de Romero .....	20
Capacidad reductora del extracto de Romero.....	21
Aceites esenciales .....	21
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto) .....	22
Aceite esencial de eucalipto.....	23
Nanopartículas de plata (AgNPs) .....	25
Biosíntesis de nanopartículas metálicas.....	25
Reacciones bioquímicas (reducción del nitrato de plata).....	26
Tamaño y forma de nanopartículas biosintetizadas .....	28

Técnicas de caracterización de nanopartículas y nanocompositos .....	28
Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) .....	28
Dispersión de luz dinámica (DLS).....	29
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	29
Nanocomposito de plata.....	30
<b>Capítulo III: Metodología .....</b>	<b>31</b>
Tipo de investigación .....	31
Elaboración de extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).....	31
Recolección y preparación de la muestra .....	31
Maceración .....	31
Eliminación de etanol .....	31
Extracción de aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto).....	32
Recolección de muestra .....	32
Preparación de la muestra .....	32
Hidrodestilación por Arrastre de vapor.....	32
Síntesis de nanopartículas de plata con extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).....	34
Síntesis de Nanocompositos con aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. (eucalipto) .	34
Caracterización de nanopartículas y nanocompositos.....	35
Análisis estadístico .....	36
<b>Capítulo IV: Resultados.....</b>	<b>37</b>
Nanopartículas de plata (AgNPs) con extracto de romero .....	37

Caracterización de AgNPs empleando TEM.....	38
Nanocompositos de aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto).....	39
Estabilidad de nanocompositos de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill .....	41
Análisis estadístico .....	42
<b>Capítulo V: Discusión</b> .....	<b>44</b>
Obtención de Aceite esencial de <i>Eucalyptus officinalis</i> Labill (eucalipto).....	44
Caracterización de nanopartículas de plata bioreducidas con extracto de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	44
Caracterización de nanocompositos de aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill .....	45
<b>Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>47</b>
Conclusiones .....	47
Recomendaciones .....	48
<b>Capítulo VII: Referencias</b> .....	<b>49</b>
<b>Capítulo VIII: Apéndices</b> .....	<b>54</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía del <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).....	19
<b>Tabla 2.</b> Taxonomía del <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto).....	22
<b>Tabla 3.</b> Detalle de nomenclatura usada en los tubos de centrífuga Falcon.....	35
<b>Tabla 4.</b> Diámetros obtenidos empleando el software FIJI.....	39
<b>Tabla 5.</b> Tamaños de nanocompositos a diferentes concentraciones de aceite esencial y extracto.....	43

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.....	20
<b>Figura 2.</b> Morfología del <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto).....	23
<b>Figura 3.</b> Curva de absorción en el espectro ultravioleta del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto) .....	24
<b>Figura 4.</b> Etapas de biosíntesis de nanopartículas.....	26
<b>Figura 5.</b> El papel de los compuestos fenólicos en la biosíntesis de nanopartículas de plata ...	27
<b>Figura 6.</b> Equipo para extracción de aceites esenciales .....	33
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental, ensayos realizados.....	36
<b>Figura 8.</b> Distribución de tamaño de nanopartículas de plata con extracto de romero .....	37
<b>Figura 9.</b> Espectro de absorción UV-Vis de AgNPs con extracto de romero, réplicas de M1 y M2 .....	38
<b>Figura 10.</b> AgNPs observadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	39
<b>Figura 11.</b> Distribución de tamaño de nanocomposito de aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto) .....	40
<b>Figura 12.</b> Espectro de absorción UV-Vis de nanocompositos de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto), reproducibilidad del protocolo de elaboración de nanocompositos .....	41
<b>Figura 13.</b> Estabilidad de nanocompositos de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill (eucalipto), muestra M1CN1.....	42

### Listado de abreviaturas

**A.E.:** Aceite esencial

**AgNPs:** Nanopartículas de plata

**M:** Molar

**ml:** mililitro

**mg GAE/g:** miligramos de ácido gálico por gramo de extracto

**NC:** Nanocomposito

**nm:** Nanómetro

**rpm:** revoluciones por minuto

**UV-VIS:** ultravioleta-visible

## Resumen

La nanotecnología es una línea de investigación científica de gran relevancia, en virtud de sus potenciales aplicaciones, la búsqueda de nuevas tecnologías ha dirigido al desarrollo de nuevos productos como las nanopartículas y los nanocompositos que, dentro de sus características se encuentra; poseer una gran área superficial, tamaños muy reducidos de entre 1 a 100 nm y una notable actividad biológica en las que destacan sus efectos antibacteriano, antifúngico e insecticida. Existen muchas metodologías para la síntesis de nanopartículas de plata, se puede emplear métodos químicos, electroquímicos, irradiación ultravioleta, entre otros. Todas estas metodologías tienen como constante el uso de reactivos químicos que producen graves problemas de contaminación ambiental. Por ello, se investigan alternativas que brinden sostenibilidad, como el uso de agentes reductores de origen orgánico como extractos que, aparte de no producir residuos químicos, le dan a la nanopartícula propiedades únicas propias de sus constituyentes.

Se sintetizó y caracterizó en tamaño y distribución nanopartículas de plata bio-reducidas con extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y de estas, se elaboró nanocompositos recubiertos con aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. Se obtuvieron tamaños de nanopartículas de entre 3 a 20 nm, con una media de 10 nm, una distribución poco agrupada y estable. Por otro lado, los nanocompositos obtenidos cuentan con una amplia variabilidad en tamaños (20 a 600 nm) formando aglomerados micelares y de estabilidad variable, máximo de 20 días. De los ensayos realizados, se obtuvo que los protocolos propuestos son reproducibles, siendo las condiciones del ensayo M1CN1 (concentración de extracto y aceite esencial menores) el mejor resultado obtenido en tamaño y distribución concluyendo que el aumento en la concentración de extracto y aceite esencial disminuye la calidad y estabilidad de los nanomateriales.

*Palabras clave:* Nanomateriales, biosíntesis, tamaño y distribución

## Abstract

Nanotechnology is a line of scientific research of great relevance, by virtue of its potential applications, the search for new technologies has led to the development of new products such as nanoparticles and nanocomposites that, within their characteristics, are; Possessing a large superficial area, very small sizes between 1 and 100 nm and remarkable biological activity in which its antibacterial, antifungal and insecticidal effects stand out. There are many methodologies for the synthesis of silver nanoparticles, chemical and electrochemical methods, ultraviolet irradiation, among others, can be used. All these methodologies have as a constant the use of chemical reagents that produce serious problems of environmental contamination. For this reason, alternatives that provide sustainability are investigated, such as the use of reducing agents of organic origin as extracts that, apart from not producing chemical residues, give the nanoparticle unique properties of its constituents.

Bioreduced silver nanoparticles with *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract were synthesized and characterized in size and distribution, and from these, nanocomposites coated with *Eucalyptus globulus* Labill essential oil were prepared. Nanoparticle sizes between 3 and 20 nm were obtained, with a mean of 10 nm, a little clustered and stable distribution. On the other hand, the obtained nanocomposites have a wide variability in sizes (20 to 600 nm) forming micellar agglomerates and variable stability, maximum of 20 days. From the tests carried out, it was obtained that the proposed protocols are reproducible, being the conditions of the M1CN1 test (lower extract and essential oil concentration) the best result obtained in size and distribution, concluding that the increase in the concentration of the extract and essential oil decreases the quality and stability of the nanomaterial.

*Keywords:* Nanomaterials, biosynthesis, size and distribution

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento del problema

En la actualidad, la química verde usada para la elaboración de nanopartículas metálicas ha tomado una mayor importancia debido a su amplia gama de aplicaciones que se desarrollan en campos como el control de la contaminación ambiental farmacéutica, control fitosanitario, la tecnología alimentaria, entre otras (Ghaedi et al., 2015; Vanlalveni et al., 2021).

Es por ello que, y con el uso de la nanociencia, se han adaptado los nanomateriales para su desarrollo por medio de métodos biosintéticos como bacterias, hongos y extractos de plantas que posean propiedades de interés (Logeswari et al., 2015).

Tradicionalmente, los protocolos de síntesis de nanopartículas metálicas como la plata conllevan el uso de reactivos químicos como polivinilpirrolidona (PVP), Etilenglicol, ácido clorhídrico (HCl) entre otros productos químicos (Khodashenas y Ghorbanib, 2019). Pese que la síntesis química permite ajustar el tamaño y la morfología de las nanopartículas de manera que se pueda controlar la producción y estabilidad del nanomaterial, este tipo de protocolos son costosos y conllevan el uso de reactivos tóxicos y peligrosos (Khan et al., 2018).

## Justificación del problema

La química verde en el campo de la nanociencia ha ido creciendo con el pasar del tiempo, las alternativas ecológicas y amigables con el medio ambiente son características que se buscan en la invención de nuevos productos.

En el proceso de elaboración de nanocompositos son necesarios dos elementos importantes, las nanopartículas metálicas y una matriz que encapsule dichas nanopartículas como los aceites esenciales como el de *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto). Particularmente, las nanopartículas de plata han demostrado tener excelentes propiedades antibacterianas, antifúngicos e insecticidas (Khan et al., 2018).

Una de las mayores desventajas que poseen las nanopartículas elaboradas con química verde es su falta de estabilidad en el tiempo, esta problemática puede verse solventada con la formación de los nanocompositos. Estas nanoestructuras al ser aisladas con aceites esenciales como el de eucalipto adquieren, además de mayor estabilidad, las propiedades de dichos aceites esenciales (Gómez et al., 2011).

**Objetivos de investigación:****Objetivo general:**

- Sintetizar y caracterizar nanocompositos de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) con nanopartículas de plata bioreducidas con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

**Objetivos específicos:**

- Obtener extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) mediante los métodos de maceración y por arrastre de vapor respectivamente.
- Sintetizar nanopartículas de plata utilizando extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) obtenido por maceración para su posterior caracterización.
- Caracterizar nanopartículas de plata mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) para determinar su tamaño y distribución de partícula.
- Sintetizar nanocompositos utilizando las nanopartículas de plata con aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) mediante precipitación para su posterior caracterización.
- Caracterizar nanocompositos de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) y nanopartículas de plata mediante Dispersión de luz dinámica (DLS) y espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) para verificar el tamaño y la distribución del nanocomposito.

**Hipótesis:**

La concentración de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) como agente reductor de las nanopartículas de plata y, la concentración de aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) influyen en el tamaño de partícula de los nanocompositos.

## Capítulo II: Marco teórico

### ***Rosmarinus officinalis* L. (Romero)**

Es una especie de la familia *Lamiaceae* originaria de países de la región mediterránea (Habtemariam, 2016).

El romero es un arbusto ramificado de flor blanco azulada, con un metro de altura aproximadamente; posee hojas sésiles, lineares con bordes curvos, con nervadura central prominente y un olor característico (Habtemariam, 2016).

#### **Tabla 1.**

*Taxonomía del Rosmarinus officinalis L. (romero)*

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
<b>Dominio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliofita
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiáceas
<b>Género</b>	<i>Rosmarinus</i>
<b>Especie</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

*Nota.* Tomado de (Datiles y Acevedo, 2014)

**Figura 1.**

*Morfología de Rosmarinus Officinalis L.*



*Nota.* Tomado de Kohler's Medical Plants, 1887

Además de su uso en la gastronomía, Esta planta es muy utilizada en la medicina ancestral de muchas poblaciones indígenas, por ello, se han realizado un sin número de investigaciones en torno sus componentes bioactivos en las que destacan el tener excelentes propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas entre otras (Andrade et al., 2018).

**Extracto de Romero**

El extracto de una planta es una mezcla compleja que se obtiene para liberar los compuestos biológicamente activos empleando métodos de extracción como la maceración alcohólica, la hidrodestilación, la destilación entre otras (Andrade et al., 2018).

El extracto de romero se utiliza como un antioxidante natural para mejorar la vida útil de los alimentos evitando la contaminación microbiana (Habtemariam, 2016; Nieto et al., 2018).

La composición fitoquímica del extracto de romero principalmente presenta diterpenos pertenecientes a la clase abietano, teniendo como esqueleto básico el ácido carnósico el cual representa del 1.5 al 2.5% de de las hojas secas. Además del ácido carnósico, el extracto contiene ácido rosmarínico, epirosmanol, rosmanol, metilcarnosato, e isorosmanol (Nieto et al., 2018).

### **Capacidad reductora del extracto de Romero**

La capacidad reductora de una sustancia es una propiedad que permite la reducción de otra mediante la donación de electrones. En las plantas aromáticas como el romero, esta característica se encuentra ligada a la presencia de grupos hidroxilos de los compuestos de naturaleza fenólica (Arazo et al., 2015).

En el extracto de romero, la fuente principal de fenoles totales se encuentra dado por el ácido rosmarínico (185 mg GAE/g, miligramos de ácido gálico por gramo de extracto) lo cual se encuentra directamente relacionado al poder reductor que posee (Dorman et al., 2003).

### **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales producidos por plantas son mezclas complejas de compuestos volátiles como hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles, los cuales pueden ser obtenidos por medio de diversos métodos de destilación (Torrenegra et al., 2019).

Estas sustancias son extraídas de la planta por medio de pelos, cavidades y canales glandulares que la planta posee (Requejo, 2020).

La composición química del aceite esencial varía asiduamente mientras está en la planta, su concentración depende de múltiples factores intrínsecos del entorno como la radiación solar, el clima, la composición del suelo, el momento del día y la estación del año y de factores extrínsecos como el tipo de destilación y técnicas de obtención (Requejo, 2020).

El uso de aceites esenciales de origen natural hasta no hace mucho, estaba restringido al ámbito cosmético y la medicina tradicional, pero en los últimos años se ha extendido al campo clínico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alergias, artritis, entre otras (Zonfrillo et al., 2022).

### ***Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto)**

El eucalipto es un forestal autóctono de Australia y Tasmania, pertenece a la familia de las mirtáceas y al género *Eucalyptus* el cual cuenta con alrededor de 300 especies (Grieve, 2021).

**Tabla 2.**

*Taxonomía del Eucalyptus globulus Labill (eucalipto)*

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophita
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Mirtales
<b>Familia</b>	Mirtaceas
<b>Género</b>	<i>Eucalyptus</i>
<b>Especie</b>	<i>Eucalyptus globulus</i> L.

*Nota.* Tomado de (Renobales y Sallés, 2001)

Es un árbol perennifolio que puede alcanzar los 50 metros de altura. Tiene dos tipos de hojas: las juveniles o en ramas con una disposición opuesta y forma oval, y las adultas que presentan una disposición alterna, más o menos coriáceas, falciformes, pecioladas y colgantes.

Ambos tipos de hojas cuentan con glándulas secretoras de un aceite volátil y aromático en el mesófilo (Renobales y Sallés, 2001).

## Figura 2.

*Morfología del Eucalyptus globulus Labill (eucalipto)*



Nota: Tomado de (Renobales y Sallés, 2001)

Es una de las plantas más utilizadas por su extenso abanico de actividades biológicas atribuidas a la gran diversidad de constituyentes fitoquímicos de la planta (Balčiūnaitienė et al., 2022).

### **Aceite esencial de eucalipto**

El aceite esencial de la hoja de eucalipto es de color amarillo pálido y tiene un olor penetrante y agradable a alcanfor. El rendimiento del aceite esencial se encuentra entre el 1 y 3% (Shala y Gurrani, 2021).

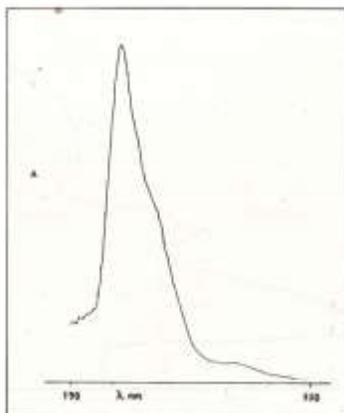
La composición fitoquímica del aceite esencial figura principalmente el eucaliptol o 1,8-cineol que constituye entre el 60 y 90% de los compuestos presentes dependiendo de los parámetros genéticos de la región, seguido por el  $\alpha$ -pineno y el limoneno con un 9 y 2%

respectivamente, además, cuenta con más de 40 compuestos presentes en concentraciones menores al 0.2% (Zonfrillo et al., 2022).

La espectrometría del aceite esencial nos puede dar una idea clara de los componentes que conforman el aceite por medio de la formación de crestas o picos a determinadas longitudes de onda, así, en los compuestos saturados la longitud de onda oscila entre 202 y 210 nm, del rango de 215 a 250 se encuentran mayoritariamente los compuestos insaturados y de 250 a 270 se encuentran los compuestos aromáticos (Lock, 1994). El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* muestra un claro pico en 219 a 220 donde se prevé la presencia de compuestos fenólicos no aromáticos (Figura 3).

### Figura 3.

*Curva de absorción en el espectro ultravioleta del aceite esencial de Eucalyptus globulus Labill (eucalipto)*



*Nota.* Tomado de: (Lock, 1994)

Las aplicaciones del aceite de eucalipto son la actividad antioxidante, antibacterial, antifúngica e insecticidas, además, estudios revelan que sus propiedades alelopáticas funcionan para mejorar la creciente resistencia a los herbicidas. Además de estas aplicaciones que se siguen estudiando, posee algunas otras que ya están muy bien fundamentadas como su uso para enjuagues bucales y supresores de la tos (Shala y Gurrani, 2021).

## **Nanopartículas de plata (AgNPs)**

En general, el precursor elegido y del método de síntesis determinan las propiedades químicas, físicas, mecánicas y antimicrobianas de las nanopartículas de plata (Balčiūnaitienė et al., 2022).

La mayoría de los métodos de síntesis química de nanopartículas de plata se basan en la reducción de sales metálicas de plata. El uso del nitrato de plata como precursor metálico es el más utilizado tanto para la síntesis química como para la biogénica (Khodashenas y Ghorbanib, 2019).

Por otro lado, lo que varía en gran medida entre un método de otro son los agentes reductores, por ejemplo, en las síntesis químicas se ha empleado ácido ascórbico, polioles, NaBH<sub>4</sub>, citrato de sodio, polietilenglicol, entre otros. De manera similar existe un buen número de agentes reductores de origen vegetal como B-Dglucosa, almidones, extractos de plantas y aceites esenciales (Monge, 2009).

En los últimos años, las nanopartículas de plata han atraído la atención debido a sus particulares propiedades fisicoquímicas vitales que incluyen una mayor conductividad, actividad catalítica (Ghaedi et al., 2015), además poseen actividad antibacteriana, antifúngica, entre otras (Vanlalveni et al., 2021).

## **Biosíntesis de nanopartículas metálicas**

Según (Barzinjy y Azeez, 2020), la síntesis de nanopartículas bio-reducidas con plantas se dividen en tres etapas: reducción, crecimiento y estabilización (Figura 4). La etapa de reducción es una de las fases de mayor importancia, ya que en esta sucede la separación de los iones metálicos de sus precursores salinos por medio de la interacción de los metabolitos con capacidades reductoras de la planta (por ejemplo, los compuestos fenólicos del romero).

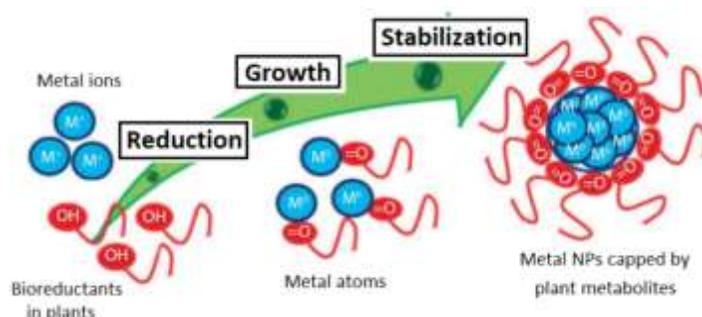
De esta manera, los iones metálicos adoptan estados de valencia cero produciendo, posteriormente la nucleación de los átomos metálicos reducidos (Espinoza et al., 2020).

En la segunda etapa se da el crecimiento de los átomos metálicos separados los cuales se fusionan formando las nanopartículas metálicas (Barzinjy y Azeez, 2020).

Por último, se da la etapa de estabilización de las nanopartículas en la cual adoptan su morfología más favorable y constante (Kim et al., 2010).

#### Figura 4.

##### *Etapas de biosíntesis de nanopartículas*



*Nota.* Tomado de (Barzinjy y Azeez, 2020)

La estabilidad de las nanopartículas dependerá de la fase de crecimiento y la nucleación generalizada que pueda ocurrir, dando paso a una mayor estabilidad con la fase de crecimiento o, por el contrario, se produzca la agregación de las nanopartículas volviéndolas inestables (Kim et al., 2010).

#### **Reacciones bioquímicas (reducción del nitrato de plata)**

En las síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas se dan muchas interacciones entre los metabolitos de estas con la sal precursora (nitrato de plata), por su parte, los metabolitos aportan con el agente reductor que reacciona con la sal metálica

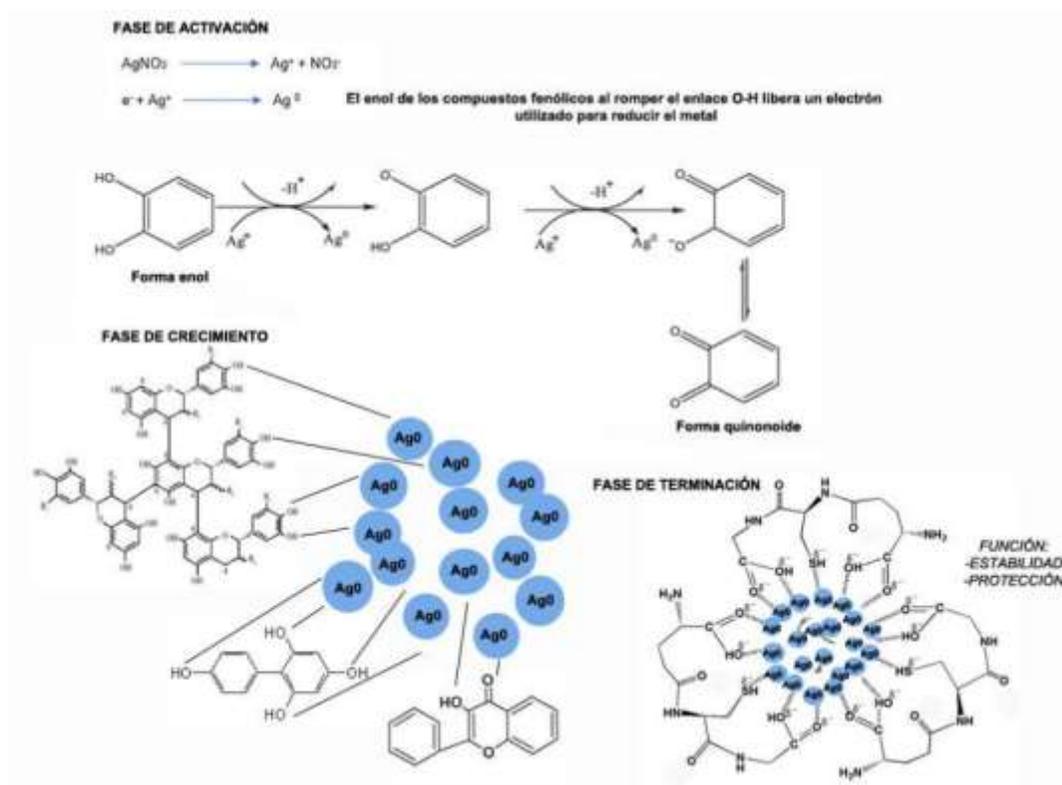
produciendo la transferencia de sus estados de oxidación monovalente a estados de valencia cero, es decir, reducción de la plata  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  (Barzinjy y Azeez, 2020).

Los principales agentes reductores presentes en un extracto de plantas suelen ser los compuestos de naturaleza fenólica, como ácidos fenólicos, estilbenos alcoholes fenólicos y flavonoides (Arazo et al., 2015).

En la (figura 4) se muestra como el enol de los compuestos fenólicos puede liberar los electrones al romper el enlace OH, de esta manera, deja un electrón libre el cual puede reducir los iones metálicos, en dicho caso, las formas enol se convierten en quinonoides estables produciéndose la nucleación de los átomos metálicos reducidos (Espinoza et al., 2020).

### Figura 5.

*El papel de los compuestos fenólicos en la biosíntesis de nanopartículas de plata*



*Nota.* Tomado de (Espinoza et al., 2020)

## **Tamaño y forma de nanopartículas biosintetizadas**

Los tamaños y formas de las nanopartículas son muy variadas y pueden determinar las propiedades que posean estas (Khodashenas y Ghorbanib, 2019).

La mayoría de las nanopartículas de plata optan por formas tridimensionales (esféricas, cúbicas, piramidales, entre otras), pero también pueden tomar formas de figuras planas como: triángulos, superficies redondas (Khodashenas y Ghorbanib, 2019).

Las características de las nanopartículas fruto de una biosíntesis pueden estar sujetas a varios factores que, en su combinación, afectan a la calidad de las nanopartículas.

Entre los factores más importantes se encuentran: la concentración de sal metálica, el pH de la solución de reacción, la concentración del extracto vegetal, además de otras circunstancias referentes a la reacción como el tiempo y la temperatura, influyen en gran medida sobre la calidad de las nanopartículas (Barzinjy y Azeez, 2020).

## **Técnicas de caracterización de nanopartículas y nanocompositos**

Debido a las dimensiones con las que se trabajan los nanomateriales (escalas entre 1 a 100nm) se torna complicado la tarea de caracterizar su naturaleza dinámica y diversas propiedades, y más si se pretende hacerla repetible y confiable (Quevedo et al., 2021).

Existen varios métodos disponibles para controlar y monitorear las propiedades relacionadas con la nanoescala de forma confiable como las siguientes:

### **Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)**

Es una técnica empleada para evaluar de manera simple, no invasiva y rápida el tamaño, la concentración y el estado de agregación de las nanopartículas (Vanlalveni et al., 2021).

Fundamentalmente, funciona midiendo la transmitancia de la radiación electromagnética de una muestra líquida en una longitud de onda entre 180 y 1100 nm (Quevedo et al., 2021).

### **Dispersión de luz dinámica (DLS)**

Es una técnica fisicoquímica utilizada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión tomando en cuenta la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo (Clementi et al., 2009).

Los equipos que usan esta tecnología poseen una luz láser que, al alcanzar las nanopartículas que hay en la suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles, los haces de luz que fueron dispersados por distintas partículas se chocan entre sí obteniéndose una intensidad de dispersión determinada (Moreno et al., 2014).

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

Esta técnica emplea la información que ofrece un haz electrónico coherente y a gran velocidad sobre una muestra sólida, traspasándola y obteniendo información, la cual es analizada por el equipo (Muñoz, 1991). La interferencia generada por un haz de electrones que inciden sobre la muestra provocando interacciones a atómicas con los elementos químicos de la muestra. Se analiza la muestra tomando en cuenta la zona y forma de hacer incidir los electrones con la muestra (Paraguay, 2020).

Los programas para analizar este tipo de imágenes como FIJI e ImageJ emplean el contraste de imágenes para resaltar las pequeñas partículas y, empleando la relación pixel-nm transforma los pixeles de la imagen por nanómetros. El principio para determinar el diámetro se lo conoce como diámetro de Feret, el cual consiste en trazas rectas tangenciales paralelas a dos puntos de borde de la nanopartícula y de esta manera se mide el diámetro.

## **Nanocomposito de plata**

El nanocomposito es un material sólido compuesto de varias fases donde al menos una posee dimensiones a escala nano, en su estructura cuenta con un material matriz que puede ser metálico, no metálico, inorgánico y polimérico, además cuenta con un material de refuerzo en fase dispersa que generalmente es una fibra orgánica o de vidrio la cual encapsula a la matriz permitiéndole adoptar las características de la matriz y añadir ventajas adicionales (Mikličanin et al., 2019) .

## Capítulo III: Metodología

### Tipo de investigación

La investigación que se desarrolló fue del tipo experimental cuantitativa. Para la elaboración y caracterización de las nanopartículas y nanocompositos se necesitó de condiciones y equipos especiales que fueron ensayadas de cero en el laboratorio de materiales avanzados.

Esta investigación responde a un proyecto planteado a futuro que tiene como fin la implementación de estos nanomateriales en posibles aplicaciones del sector agrícola (uso como pesticida orgánico). Este trabajo cumple con la fase inicial del proyecto mencionado.

### Elaboración de extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

#### Recolección y preparación de la muestra

Para la elaboración del extracto se tomó únicamente las hojas frescas *Rosmarinus officinalis* L. (romero) de arbustos del sector de Yaruquí, al noreste de Quito.

#### Maceración

El protocolo empleado consistió en pesar en un vaso de precipitación 25 g de hojas seleccionadas a las que se las lavó 3 veces con agua destilada y se secaron al ambiente. Para el solvente se preparó una solución de etanol (25 ml de agua en 75 ml de etanol al 96%) y se dejó reposar durante 7 días evitando la exposición a la luz.

#### Eliminación de etanol

El etanol interactúa negativamente con la síntesis de las nanopartículas de plata, por ello se extrajo el etanol haciendo uso de un rotavapor marca BUCHI a una presión controlada

por una bomba de vacío de la misma marca. El proceso se realizó por 20 min, con rotación, a 45°C y con una presión de 10 mbar.

Para eliminar las impurezas del extracto se purificó usando una centrifugadora marca HERMLE por 10 min a 6000 rpm. Del sobrenadante obtenido se recolectó 20 ml con una jeringa con un filtro de 0.45 µm de poro y se añadió agua destilada tipo 1 hasta alcanzar un volumen de 100 ml.

### **Extracción de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto)**

#### **Recolección de muestra**

Las hojas de eucalipto se tomaron de árboles ubicados en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE (Av. Gral. Rumiñahui S/N, Sangolquí 171103). Las condiciones que se tomaron en cuenta fueron: Hojas juveniles y yemas apicales de la parte inferior del árbol y, la recolección preferentemente se realizó en la mañana para evitar la deshidratación de las hojas.

#### **Preparación de la muestra**

Las hojas y yemas apicales de *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto) se seleccionaron eliminando el tallo y hojas dañadas, de lo cual se tomó 250 g del material vegetal y se lavó 3 veces con abundante agua destilada tipo 1.

#### **Hidrodestilación por Arrastre de vapor**

El arrastre de vapor vertical es una técnica que emplea el vapor de agua como medio de transporte para llevar el aceite esencial a un recolector que, por la baja densidad del aceite respecto del agua forman dos fases: en la parte inferior y en mayor proporción se encuentra el hidrolato, una suspensión coloidal que contiene componentes hidrosolubles, así como trazas de aceite esencial, y en la superior, el aceite esencial.

Como se muestra en la Figura 5, el equipo de destilación (alambique de vidrio) consta de un balón generador de vapor, un balón de destilación donde se deposita la muestra, un refrigerante en espiral para condensar el vapor de agua y un condensador para recolectar el aceite obtenido.

Una vez depositado el material vegetal en el balón de destilación se montó el equipo y se aplicó calor con una cocineta para alcanzar la ebullición evitando el contacto del material de vidrio.

El proceso de extracción se realizó durante 2 horas obteniéndose al final de 2 a 3 mL de aceite esencial por cada 250 g de material vegetal el cual fue recolectado en viales ámbar herméticos de 5 mL y se lo conservó a temperatura ambiente.

### **Figura 6.**

*Equipo para extracción de aceites esenciales*



*Nota.* Tomado por Danilo Sangotuña, Laboratorio de materiales avanzados-CENCINAT

### **Síntesis de nanopartículas de plata con extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)**

Previamente se prepararon soluciones de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.01 M e hidróxido de sodio (NaOH) 0.01 N.

Para la síntesis se utilizaron 2 mL de extracto a diferentes concentraciones: una solución 1:3 de extracto-agua y el extracto concentrado a las que se denominó M1 y M2 respectivamente.

A M1 y M2 se añadió 5 mL de  $\text{AgNO}_3$  y se ajustó a un pH de 10.5 utilizando NaOH, posterior a ello, se incubó por 3 horas a una temperatura de 40°C. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C.

### **Síntesis de Nanocompositos con aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto)**

En una celda de cuarzo se añadió 2 ml de agua destilada tipo 1, 100  $\mu\text{L}$  de AgNPs y 1.5 y 3  $\mu\text{L}$  de aceite esencial de eucalipto para NC1 Y NC2 respectivamente. La muestra se sometió a sonicación a intervalos de 30 segundos por una amplitud de 40% manteniendo la temperatura con un baño helado, posterior a ello, se depositó la muestra en tubos para centrifuga Eppendorf. Este procedimiento se realizó para M1 y M2.

Para conservar la muestra se añadió 1 ml de citrato de sodio  $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$  al 1%

El diseño experimental planteado es en base a los resultados obtenidos en la elaboración de nanocompositos, específicamente el diámetro de las nanopartículas, para lo cual se etiquetaron y se ensayaron 100 pruebas como se representa en la tabla 3.

**Tabla 3.**

*Detalle de nomenclatura usada en los tubos de centrifuga Falcon*

		[A.E. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill]										
		Réplicas	NC1					NC2				
			NC1.1	NC1.2	NC1.3	NC1.4	NC1.5	NC2.1	NC2.2	NC2.3	NC2.4	NC2.5
[Extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.]	M1	M1.1										
		M1.2										
		M1.3										
		M1.4										
		M1.5										
	M2	M2.1										
		M2.2										
		M2.3										
		M2.4										
		M2.5										

### **Caracterización de nanopartículas y nanocompositos**

La caracterización se realizó mediante espectroscopia UV-VIS usando un espectrofotómetro (Genesys 10 UV scanning) en un rango de absorción de 190 a 600 nm con un umbral de 1 nm para apreciar la presencia tanto del extracto como de la nanopartícula.

El tamaño y la distribución de la nanopartícula se determinó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica usando un equipo DLS 550 HORIBA. En el software del equipo se estableció la plata como la partícula refractaria y el agua como medio de dispersión.

Para la caracterización de M2 se realizó un lavado preliminar para eliminar el exceso de extracto ya que al presentar una concentración mayor de extracto producía ruido en las lecturas. Para el proceso de lavado se tomó 2 mL de AgNPs y se centrifugó en tubos eppendorf a 13000 rpm por 5 min. Se tomó 25  $\mu$ L del precipitado con una micropipeta y se resuspendió en agua hasta obtener 2 mL.

En cuanto a la Microscopía electrónica de transmisión, las muestras fueron enviadas a ser analizadas en el laboratorio de microscopía de la universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Una vez obtenidas las imágenes de los nanomateriales, se procedió a hacer el análisis de estas usando los softwares FIJI e ImageJ.

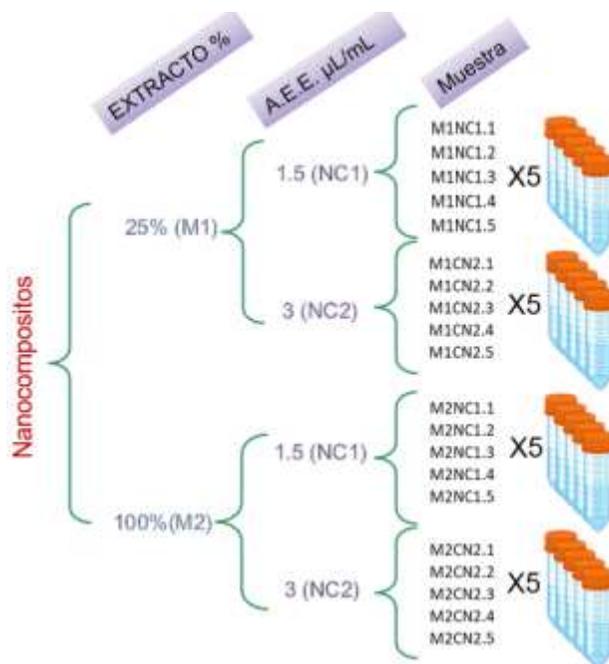
### Análisis estadístico

Por la naturaleza de los datos obtenidos en el laboratorio, se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) usando el test de rangos múltiples de Duncan con un grado de significancia de 0.05 para estimar si el tamaño de los nanocompositos respecto con concentraciones tanto del extracto como del aceite esencial diferentes son estadísticamente significativas.

Los resultados de los ensayos fueron analizados con el software InfoStat.

### Figura 7.

*Diseño experimental, ensayos realizados*



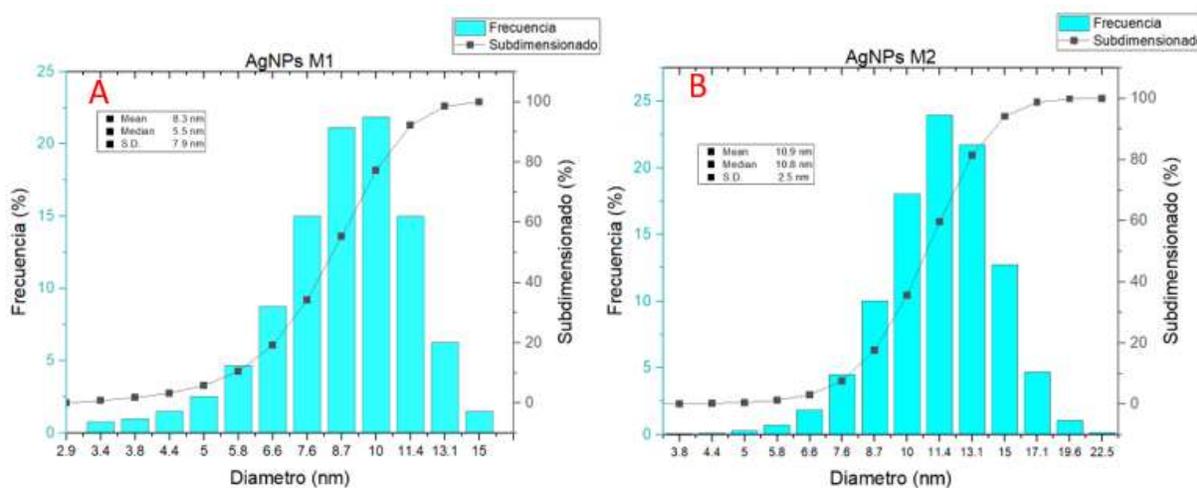
## Capítulo IV: Resultados

### Nanopartículas de plata (AgNPs) con extracto de romero

Las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L) como se puede apreciar en la (Figura 6) en el literal A, el tamaño oscila entre los 3.4 a 15 nm con un valor medio de 8.3 nm, resultado correspondiente a una solución de extracto-agua 1:3. En la parte B de manera similar, pero para el extracto concentrado se observa tamaños de 5 a 20 nm con una media de 10.9 nm. La distribución de las AgNPs en ambos casos no muestra agrupación ni tamaños por encima de los 20 nm.

#### Figura 8.

*Distribución de tamaño de nanopartículas de plata con extracto de romero*

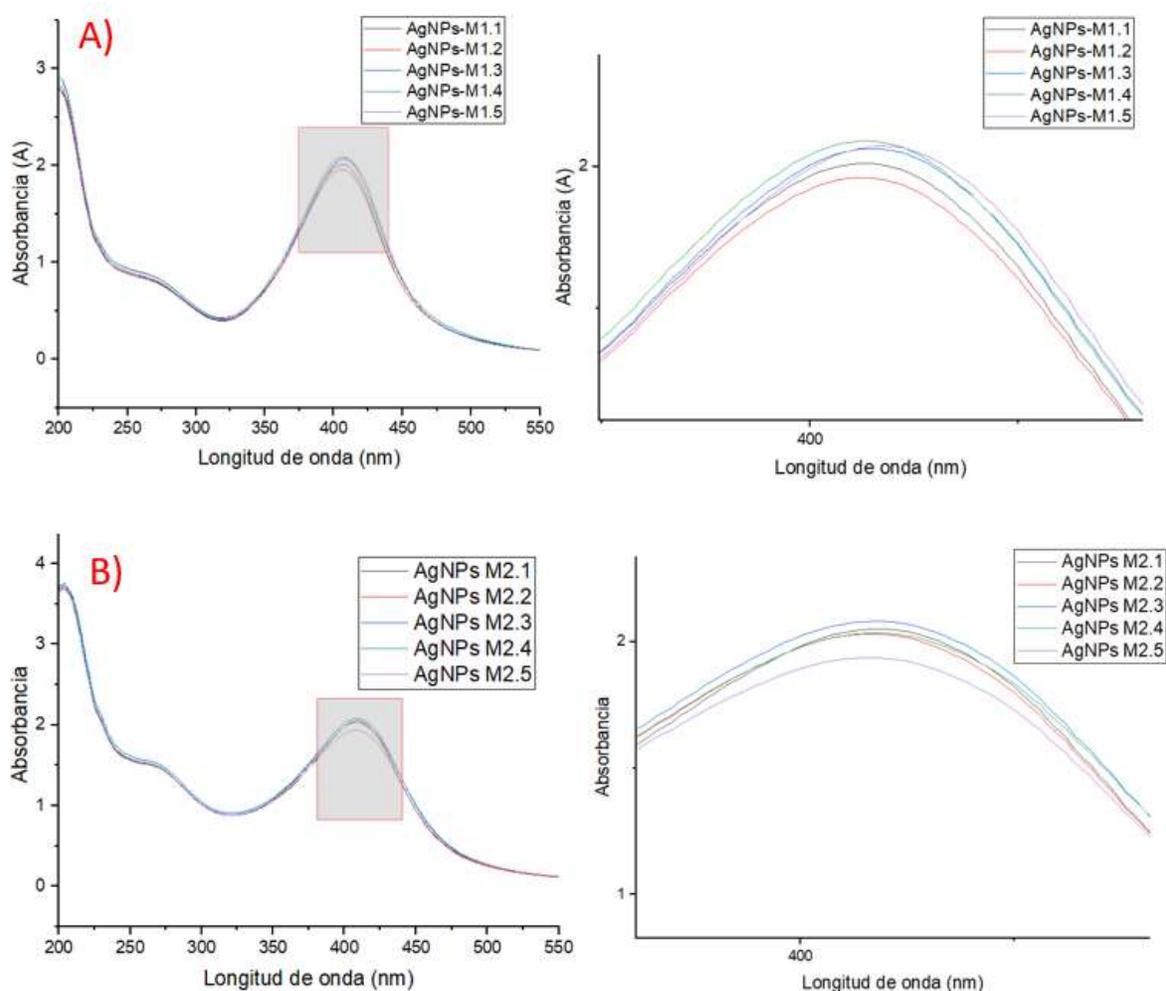


*Nota.* A) Solución 1:3 extracto. B) Extracto concentrado

En la (figura 7) se muestra la evaluación de la reproducibilidad del protocolo descrito para M1 y M2 resultado obtenido usando un espectrómetro UV-VIS (Genesys 10 scanning). La amplitud de la curva M1 es menor en correspondencia con la M2 mostrando mayor homogeneidad en las formas obtenidas. De igual manera se aprecia una mejor integración entre las curvas de M1 respecto de M2.

**Figura 9.**

*Espectro de absorción UV-Vis de AgNPs con extracto de romero, réplicas de M1 y M2*



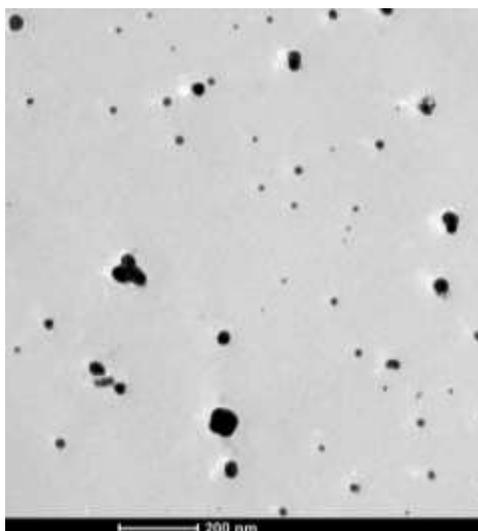
*Nota.* Reproducibilidad de AgNPs. A) M1, solución 1:3. B) M2, extracto concentrado

### **Caracterización de AgNPs empleando TEM**

La imagen obtenida de TEM (Figura 10) fue analizada en el software FIJI e ImageJ. Se obtuvieron 40 valores correspondientes a diámetros de nanopartículas (Tabla 4) donde el valor promedio fue de  $12.4 \pm 5.8$  nm, además, se analizó la variabilidad de los datos obtenidos respecto del valor promedio demostrando que los valores poseen una buena distribución sin mostrar sesgos (Apéndice A).

**Figura 10.**

*AgNPs observadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

**Tabla 4.**

*Diámetros obtenidos empleando el software FIJI.*

Diámetro				
14.32	13.6	11.18	7.81	11.18
18.03	19.85	19.7	14.42	17
6.4	11.4	21.02	7.28	21.1
10.3	6.71	8.06	20.81	13.34
3.61	2.83	19.42	10.3	18.38
9.49	8.94	11.4	14.14	3.61
17.26	2.24	10.82	13.04	17.8
22.02	18.44	4.47	2.24	13.04

### **Nanocompositos de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto)**

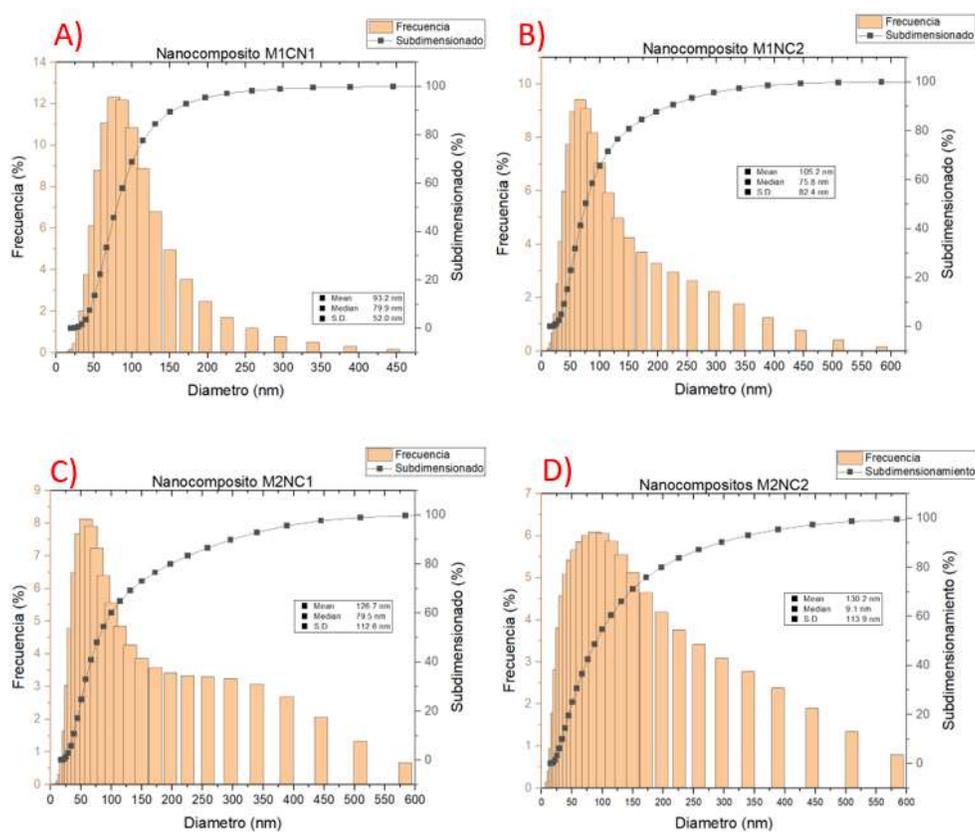
Una representación de los tamaños y la distribución de los nanocompositos se observan en la (figura 8). Para M1CN1 (A) los tamaños varían entre 20 a 450 nm, manteniendo una media de 92.2 nm, la distribución mayoritaria se encuentra en los diámetros de 75 nm con un

12.2%. En la parte B se representa la misma muestra, pero con mayor cantidad de aceite esencial dando tamaños de 25 a 600 nm, la frecuencia máxima de distribución se mantuvo en los 75 nm, pero disminuyó a 9.8%. Para las muestras con extracto de mayor concentración (C y D), se evidenció un incremento en el tamaño y disminución de la frecuencia, dando tamaños medios de 126.7 y 130.2 y frecuencias de 8.05 y 6.2% para C y D respectivamente.

Por otro lado, tomando el ensayo M2CN1 se analizó la reproducibilidad de los nanocompositos (Figura 9) y se evidenció una alta correspondencia entre las curvas obtenidas tanto de la cresta del aceite esencial como de la Ag cerovalente.

**Figura 11.**

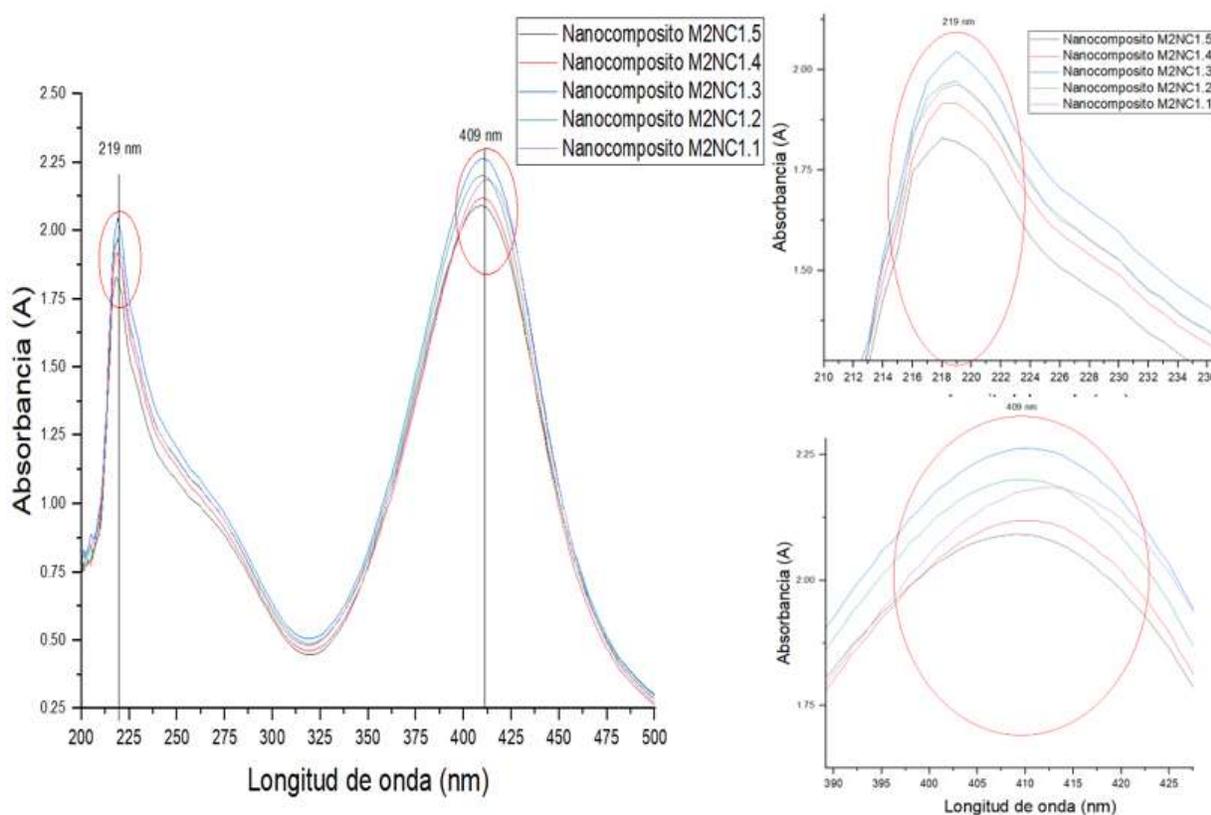
*Distribución de tamaño de nanocomposito de aceite esencial de Eucalyptus globulus Labill (eucalipto)*



*Nota.* A) Solución 1:3 extracto-agua, 1.5  $\mu$ L de A.E. eucalipto B) Solución 1:3 extracto-agua, 3  $\mu$ L de A.E. eucalipto C) Extracto concentrado, 1.5  $\mu$ L de A.E. eucalipto. D) Extracto concentrado, 3  $\mu$ L de A.E. eucalipto.

### Figura 12.

*Espectro de absorción UV-Vis de nanocompositos de Eucalyptus globulus Labill (eucalipto), reproducibilidad del protocolo de elaboración de nanocompositos*



*Nota.* 5 réplicas de nanocompositos. AgNPs M2 y 1.5  $\mu$ L de aceite esencial de Eucalipto

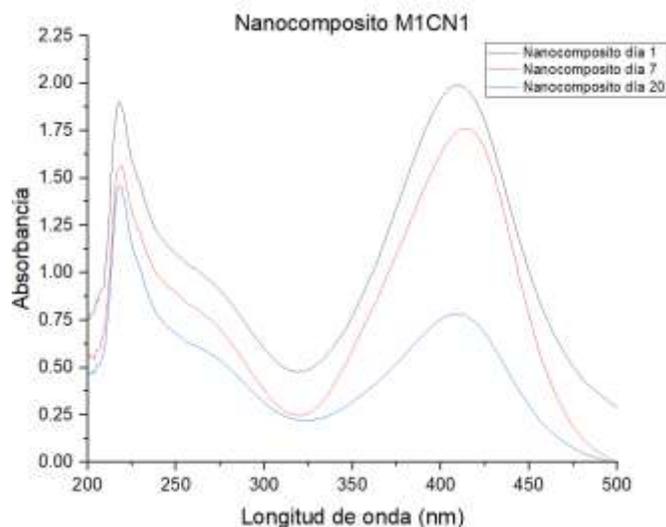
### Estabilidad de nanocompositos de *Eucalyptus globulus* Labill

Mediante el espectro de absorción UV-VIS se evaluó como punto final la estabilidad de los nanocompositos, los resultados obtenidos muestran una estabilidad de aproximadamente

una semana. Trascurrido este tiempo los nanocompositos tienden a degradarse con mayor velocidad reduciéndose a una cuarta parte en 20 días (Figura 10).

### Figura 13.

*Estabilidad de nanocompositos de Eucalyptus globulus Labill (eucalipto), muestra M1CN1*



### Análisis estadístico

Para determinar si existe correlación entre los tamaño de nanocomposito de la tabla 4 y las concentraciones diferentes de extracto y aceite esencial se realizó el análisis de ANOVA empleando el test de rangos multiples de Duncan, se hizo la comparación entre los promedios de las réplicas de cada nanocomposito y se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos propuestos, siendo el ensayo M1NC1 el que presentó mejores resultados con tamaños entre 105.8 a 109.2 nm. Por otro lado, el ensayo M2NC2 mostró ser el peor en cuestión de tamaños (129.7 a 135.7nm).

Además, se analizó el supuesto de homocedasticidad y normalidad del modelo graficamente (apéndices C y E) y, empleando la prueba de Shapiro Wilks y de Levene (apéndices D y F) se determinó que el modelo se ajusta a la naturaleza de los datos con un p-valor de 0.3534 y 0.4678.

**Tabla 5.**

*Tamaños de nanocompositos a diferentes concentraciones de aceite esencial y extracto.*

		A.E. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill										
		NC1					NC2					
Extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0.25%	M1.1	95.4	99.3	95.9	101.9	102.8	105.7	104.7	106.3	106.2	110.8
		M1.2	116.0	115.1	120.0	122.0	120.2	117.7	114.0	113.9	110.3	115.1
		M1.3	129.5	122.8	126.7	130.7	129.9	161.4	145.4	130.2	152.8	143.8
		M1.4	102.7	96.7	98.3	93.9	96.7	104.3	110.2	102.1	120.5	121.4
		M1.5	99.6	95.1	95.8	89.3	96.5	126.2	137.9	127.5	140.6	130.3
		Prom.	108.6	105.8	107.3	107.6	109.2	123.1	122.4	116.0	126.1	124.3
	100%	M2.1	112.4	110.7	100.3	106.9	110.1	135.5	131.3	143.4	125.4	139.7
		M2.2	111.8	116.3	115.7	124.3	118.2	143.7	134.8	134.8	137.9	141.8
		M2.3	119.9	121.1	129.1	136.6	133.6	138.1	128.2	138.3	128.8	127.8
		M2.4	115.9	114.4	122.8	115.1	119.4	125.1	131.4	132.2	131.4	122.2
		M2.5	113.6	108.9	110.0	109.1	110.2	129.9	140.8	129.7	125.2	143.6
		Prom.	114.7	114.3	115.6	118.4	118.3	134.5	133.3	135.7	129.7	135.0

*Nota.* Los datos representan a las medias de los tamaños obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) usando el equipo DLS 550 HORIBA.

## Capítulo V: Discusión

### Obtención de Aceite esencial de *Eucalyptus officinalis* Labill (eucalipto)

El aceite esencial de eucalipto es uno de los más estudiados y comercializados debido a sus características únicas tanto en el campo de la investigación como a nivel industrial. (Shala y Gurrani, 2021) en un artículo de revisión mencionan que el rendimiento del aceite esencial oscila entre 1 y 3%, valores que se corroboran en este estudio al obtenerse aproximadamente de 1.5% respecto a la materia orgánica empleada.

El análisis por espectroscopia UV-VIS mostró un pico agudo constante de aproximadamente 219 nm en los análisis de los nanocompositos con aceite esencial de eucalipto, esta cresta que está ausente en los análisis de nanopartículas de plata, puede representar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial.

En un estudio realizado por (Arun y Inderjeet, 2021) se muestra un pico similar (220 nm) mencionan que esta cresta indica la acumulación de metabolitos secundarios del tipo fenólicos. De igual manera, (Lock, 1994) menciona que a longitudes de onda entre 215 y 250 nm prevalece la presencia de compuestos insaturados, demostrando la ausencia de compuestos aromáticos.

### Caracterización de nanopartículas de plata bioreducidas con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Las nanopartículas obtenidas por dispersión de luz dinámica (DLS) tuvieron tamaños que oscilan entre las 5 y 20 nm, con una media de 10 nm aproximadamente. Este tamaño se encuentra dentro del rango estimado para síntesis verde de nanopartículas de plata que comprende el rango de entre 10 a 35 nm (Pardo et al., 2022; Vanlalveni et al., 2021; Ghaedi et al., 2015).

Además, los autores coinciden en que la forma de las nanopartículas empleando extractos como el de *Rosmarinus officinalis* L. es esférica en todos los casos revisados.

Respecto a la caracterización por medio de microscopía UV-VIS, se reportó absorbancias máximas por encima de 2, en longitudes de onda entre 409 y 412 nm, estas coinciden con las reportadas con (Pardo et al., 2022) en donde las absorbancias reportadas son superiores a 2 y aumentan con forme aumenta la concentración del extracto parecido a los datos reportados en este estudio.

### **Caracterización de nanocompositos de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill**

Los nanocompositos fueron sintetizados empleando concentraciones variables de aceite esencial, esta diferencia mostró aumentar el tamaño y la frecuencia con forme se aumenta la concentración del aceite esencial reportando tamaños fluctuantes y con un gran rango que van entre 20 y 600 nm, estos valores tan altos muestran la falta de estabilidad del nanomaterial como se observa en la (Figura 10).

Por otro lado, las medias de tamaño obtenidas por dispersión de luz dinámica (DLS) muestran valores entre 100 y 135 nm, lo que denota aglomeraciones de AgNPs con el aceite esencial. Estos rangos están dentro de los establecidos para un nanomaterial recubierto o de relleno esférico (20 a 300 nm) (Fu et al., 2019).

Dentro de las funciones que cumplen en la formación de los nanocompositos, como menciona (Miklićanin et al., 2019) estos cuentan con una fase dispersa dada por un material de refuerzo y una fase continua por una matriz que puede ser metálica, cerámica o polimérica. En este caso, el aceite esencial es el material de refuerzo y el material de matriz de tamaño nanométrico son las nanopartículas de plata.

El test de Duncan para definir el mejor tratamiento entre las medias de las réplicas, se ajustó de manera óptima ya que estos valores contaban con una alta similitud, (García et al.,

2001) menciona que Duncan es superior a los test de Dunnett y Tukey para la comparación de las medias de ensayos de laboratorio.

## Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones

### Conclusiones

- El rendimiento del aceite esencial de eucalipto varía dependiendo de las condiciones que se aplican en la destilación por arrastre de vapor, siendo este de aproximadamente un 1.5% de aceite esencial por cada 200 gramos de materia orgánica, este rendimiento es dado por el uso de hojas jóvenes de la planta.
- El tamaño y la estabilidad de las nanopartículas de plata se ve influenciada por el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), no solo por su concentración, si no también, por factores intrínsecos como la etapa de desarrollo, cambios genéticos propios de la región, entre otros y, extrínsecos relacionados con su entorno, temporada del año, humedad relativa, además de las condiciones del proceso de extracción.
- Los nanocompositos son materiales recubiertos por sustancias que por lo general presentan diferentes fases de agregación, el uso de aceite esencial cumple este objetivo promoviendo la formación de estructuras micerales, este efecto puede incrementar drásticamente su tamaño y estabilidad, por ello, es necesario el uso de estabilizantes como el citrato de sodio.
- El análisis estadístico muestra que el nanocomposito muestra diferencias significativas respecto de las medias de las réplicas ensayadas, dando como mejor tratamiento (menor tamaño e índice de agrupación) el ensayo M1NC1 el que cuenta con una menor concentración de extracto y aceite esencial, además se pudo observar que, a mayor concentración de estas, mayor es la inestabilidad del nanocomposito, pero dándose un aumento moderado en el tamaño.
- En la realización de las réplicas, es necesario depurar los datos obtenidos que se encuentran fuera del rango para una misma muestra, esto debido a la sensibilidad del equipo (DLS 550 HORIBA) a las vibraciones del entorno de trabajo.

## Recomendaciones

- En el extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es necesario realizar la eliminación completa del alcohol antes de la síntesis de la nanopartícula de plata ya que su presencia provoca la inestabilidad del nanomaterial por medio de mecanismos de oxidación.
- Se recomienda la estandarización de los métodos de extracción de romero y destilación por arrastre de vapor para el aceite esencial con el fin de evitar resultados erróneos debido a la variabilidad de las condiciones.
- Para determinar la forma y la distribución de manera más detallada, se recomienda el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).
- Es necesario ahondar en el estudio de la estabilidad de los nanocompositos enfocándose en el tipo y la concentración de los estabilizantes.

## Capítulo VII: Referencias

- Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., y Kisinza, W. (2021). Chemical composition of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* grown in Tanzania. *Scientific African* , 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00758>
- Andrade, J., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C., y Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *FUTURE SCIENCE OA*, 4(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- Arazo, M., Alarcón, A. B., Becerra, M. M., y Roche, L. D. (2015). Rendimiento y poder reductor de diferentes extractos de frutos de garcinia tinctoria (choisy) w. F. Wight. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25(1), 37-40.  
<https://www.revcitecal.iiiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/304/262>
- Arun, S., y Inderjeet, K. (2021).  $\gamma$ -product hydrosol of *Eucalyptus globulus* essential oil distillation as source of botanical insecticides: wealth from waste. *Notulae Scientia Biologicae* , 1(13). <https://doi.org/DOI:10.15835/nsb13110854>
- Balčiūnaitienė, A., Liaudanskas, M., Puzerytė, V., Viškelis, J., Janulis, V., Viškelis, P., . . . Jankauskaitė, V. (2022). *Eucalyptus globulus* and *Salvia officinalis* Extracts Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Application as an Antioxidant and Antimicrobial Agent. *Plants*, 11(8), 1085. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants11081085>
- Barzinjy, A. A., y Azeez, H. H. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Eucalyptus globulus* Labill. leaf extract and zinc nitrate hexahydrate salt. *SN Applied Sciences*, 2(991). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s42452-020-2813-1>

- Clementi, L., Gugliotta, L., y Vega, J. (2009). Estimación de distribuciones de tamaños de partícula por técnicas de dispersión de luz. Utilización de algoritmos genéticos para resolver el problema inverso. *Asociación Argentina de Materiales*, 6(1).  
[https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/26112/CONICET\\_Digital\\_Nro.5028251f-51ef-4d70-bf5d-532e60c63ed0\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/26112/CONICET_Digital_Nro.5028251f-51ef-4d70-bf5d-532e60c63ed0_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Datiles, M., y Acevedo, P. (2014). *Rosmarinus officinalis* (rosemary). *CABI Compendium*.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1079/cabicompendium.47678>
- Dorman, H., Peltoketo, A., Hiltunen, R., y Tikkanen, M. (2003). Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83(2), 255-262. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00088-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00088-8)
- Espinoza, A. S., Miceli, F. G., Valdiviezo, V. R., y Molina, J. M. (2020). El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. *Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez*, 2(2). <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2020/08/7-Santos-Espinoza-et-al-2020.pdf>
- Fu, S., Sun, Z., Huang, P., Li, Y., y Hu, N. (2019). Some basic aspects of polymer nanocomposites: A critical review. *Nano Materials Science*, 1(1), 2-30.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.006>
- García, J., Castillo, A., Ramírez, M., Rendón, G., y Larqué, M. (2001). A comparison of tukey, duncan, dunnett, hsu and bechhofer procedures for selection of means. *Agrociencia*.
- Ghaedi, M., Yousefinejad, M., Safarpour, M., Khafri, H. Z., y Purkait, M. (2015). *Rosmarinus officinalis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 167-172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.06.020>

- Grieve, M. (2021). *Eucalipto* . A Modern Herbal.
- Habtemariam, S. (2016). The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/2680409>
- Khan, M., Rafi, M., Farooq, S., Khan, S. T., Al-Warthan, A., Rafiq, M., . . . Tremel, W. (2018). Plant extracts as green reductants for the synthesis of silver nanoparticles: lessons from chemical synthesis. *Dalton Transactions*(35). <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C8DT01152D>
- Khodashenas, B., y Ghorbanib, H. (2019). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1823-1838. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>
- Kim, J., Rheem, Y., Yoo, B., Chong, Y., Bozhilov, K., Kim, D., . . . Myung, N. (2010). Peptide-mediated shape- and size-tunable synthesis of gold nanostructures. *Acta Biomaterialia*, 6, 2681-2689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.019>
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia universidad católica del Perú.
- Logeswari, P., Silambarasan, S., y Abraham, J. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(3), 311-317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.04.007>
- Miklićanin, E. O., Badnjević, A., Kazlagić, A., y Hajlovac, M. (2019). Nanocomposites: a brief review. *Health and Technology*, 10, 51-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12553-019-00380-x>

- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Universidad de La Rioja. Departamento de Química.*, 1(105), 33-41.
- Moreno, A. C., Pimentel, R. C., Martínez, E. S., y Fernandez, J. Y. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional*, 8(4).
- Muñoz, S. (1991). microscopia electronica de transmision y difraccion de electrones de polimeros. *ETSIB*, 9.
- Nieto, G., Ros, G., y Castillo, J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, 5(3), 98. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/medicines5030098>
- Paraguay, F. (2020). Electron microscopy techniques used in the study of nanoparticles. *Mundo Nano*, 13(25), 101-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69626>
- Pardo, L., Arias, J., y Molleda, P. (2022). Preparation of synthesized silver nanoparticles from extract of rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.) and its used as a perservative. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 35(1). <https://doi.org/http://doi.org/10.17163/lgr.n35.2022.04>.
- Quevedo, A., Guggenheim, E., Briffa, S., Adams, J., Lofts, S., Kwak, M., . . . Valsami, E. (2021). UV-Vis Spectroscopic Characterization of Nanomaterials in Aqueous Media. *JoVE Journal*. <https://doi.org/doi:10.3791/61764>
- Renobales, G., y Sallés, J. (2001). *Plantas de interés farmacéutico*. <https://www.ehu.eus/documents/1686888/3913390/26.+Eucalyptus+globulus.pdf>

Requejo, A. (2020). *Aceites esenciales en sinergia*. Exlibric.

[https://books.google.es/books?id=k1ApEAAAQBAJ&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.es/books?id=k1ApEAAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

Shala, A., y Gurrani, M. A. (2021). Phytochemical Properties and Diverse Beneficial Roles of *Eucalyptus globulus* Labill.: A Review. *Horticulturae*, 11(7), 450.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/horticulturae7110450>

Torrenegra, M., Granados, C., y León, G. (2019). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. *Revista Cubana de Farmacia*, 1(52). <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/266/207>

Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B., y Rokhum, S. L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. *Royal Society of Chemistry*, 11, 2804-2837.

<https://doi.org/10.1039/D0RA09941D>

Zonfrillo, M., Andreola, F., Krasnowska, E., Sferrazza, G., Pierimarchi, P., y Serafino, A. (2022). Essential Oil from *Eucalyptus globulus* (Labill.) Activates Complement Receptor-Mediated Phagocytosis and Stimulates Podosome Formation in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Molecules*, 27(11). [https://doi.org/doi:](https://doi.org/doi:10.3390/molecules27113488)

[10.3390/molecules27113488](https://doi.org/doi:10.3390/molecules27113488)

