



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA EN  
INGENIERIA Y TECNOLOGÍAS AVANZADAS**

---

---

PROGRAMA DE DOCTORADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**BIOSÍNTESIS CONTROLADA DE  
NANOMATERIALES FUNCIONALES  
MEDIANTE EXTRACTOS NATURALES PARA  
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN TECNOLOGÍA  
AVANZADA**

**PRESENTA:**

Francisco Bersain Moreno Luna

**ASESOR INTERNO:**

Dr. José Luis Herrera Pérez

**ASESOR EXTERNO:**

Dr. Odilón Vázquez Cuchillo





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 7 de Diciembre del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIITA en su sesión ordinaria No. 1 celebrada el día 21 del mes de enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Moreno  
Apellido paterno

Luna  
Apellido materno

Francisco Bersain  
Nombre (s)  
Con registro: 

B	1	5	0	6	8	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
"Biosíntesis controlada de nanomateriales funcionales mediante extractos naturales para aplicaciones biomédicas".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
En este trabajo se evaluarán las aplicaciones potenciales en el área de biomedicina de nanopartículas metálicas, funcionalizadas con moléculas orgánicas. Las nanopartículas serán bio-sintetizadas mediante extractos naturales a baja temperatura, con control de la composición química. Se caracterizarán química, estructural y ópticamente las nanopartículas obtenidas, buscando establecer las condiciones óptimas de síntesis. Se realizarán pruebas bio-médicas mediante ensayos In vitro para evaluar la capacidad inhibitoria de las nanopartículas sintetizadas en líneas celulares cancerígenas.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. José Luis Herrera Pérez y Dr. Odilón Vázquez Cuchillo

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Laboratorios de UPIITA-IPN, en Depto. de Física del CINVESTAV, en el Instituto Tecnológico de Puebla y en el Centro de Investigación Biomedica de Oriente (CIBIOR-IMSS) Metepec Puebla que cuentan con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

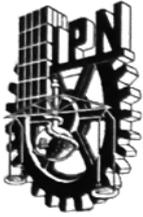
Dr. José Luis Herrera Pérez

Directores de Tesis

Dr. Odilón Vázquez Cuchillo

Aspirante  
Francisco Bersain Moreno Luna





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:  para examinar la tesis titulada:

por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	MORENO	Apellido Materno:	LUNA	Nombre (s):	FRANCISCO BERSAIN
-------------------	--------	-------------------	------	-------------	-------------------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **NO APROBAR**  la tesis, en virtud de los motivos siguientes:

*Cumpliendo con los objetivos planteados inicialmente*

Comisión Revisora de Tesis

Dr. José Luis Herrera Pérez

Director de Tesis  
13500-EF-18 Colegiado

Dr. José Luis Jiménez Pérez

14147-EG-19 Colegiado

Dr. José Francisco Sánchez Ramírez

12722-EE-17 Colegiado

Dr. Odilón Vázquez Cuchillo  
2° Director de Tesis  
Externo

Dra. Alejandra Tovar Corona  
Externo

Presidente del Colegio de Profesores

M. en C. Ramón Herrera Ávila

Nombre



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 7 del mes de Octubre del año 2019, el (la) que suscribe Francisco Bersain Moreno Luna alumno (a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada con número de registro B150682, adscrito a Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnología Avanzada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Luis Herrera Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado “Biosíntesis Controlada de Nanomateriales Funcionales Mediante Extractos Naturales Para Aplicaciones Biomédicas”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección bersainbers@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Francisco Bersain Moreno Luna

Nombre y firma

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'FB' or similar initials, written over a diagonal line that extends from the bottom right towards the center of the page.

## ABSTRACT

In this work we have explored the synthesis of metallic nanoparticles of gold, silver and copper through an environmentally friendly methodology, as an alternative to traditional nanotechnological synthesis methods (chemical and physical), with the primary purpose of reducing the costs of synthesis, increase the biocompatibility of the nanomaterials obtained, to avoid the use and generation of toxic substances, as well as decreasing the energy consumption in the process. Using a plant extract as reducing agent in minimum quantities and low temperatures (65 ° C) in addition to short reaction times, we synthesize nanoparticles of copper, silver and gold by changing the parameters used, trying to accelerate and control the nucleation processes and growth, using the UV-Vis spectrophotometry technique as initial follow-up, it allows us to observe the signal corresponding to the nanoparticles synthesized at different times and intensities, to subsequently perform a meticulous microstructural characterization using the XRD, MET and HRTEM techniques.

Likewise, we analyze some of the capacities and limits of the synthesized material, to achieve this we have carried out different tests with the nanoparticles that we obtained such as: the monitoring of its stability for several months, the impregnation in polymer, its dehydration until nanopowder and its subsequent resuspension; through these experiments we achieve a broader picture for future application. The extracts used from Agave were the reducers that we selected for the green synthesis process, based on their biological characteristics of being a renewable and highly cultivated resource in our country, in addition to being a genus of plants that are currently undergoing several scientific research due to the multiple pharmacological properties that they present thanks to the secondary metabolites found in their tissues. In this work we made a comparison through a differential synthesis by testing three different extracts from the same plant (ethanolic, aqueous and hexane) which presented a high reducing power of the precursor metal ions, acting at the same time as stabilizers of the nanoparticles formed, in addition to ensure the absence of toxic waste. In the final application, its activity was tested against cancer cell lines, using a lung cancer cell line, with a view to a future biomedical application in the fight against cancer tumors.

## RESUMEN

En este trabajo hemos explorado la síntesis de nanopartículas metálicas de oro, plata y cobre mediante una metodología amigable con el ambiente, como una alternativa a los métodos de síntesis nanotecnológicos tradicionales (físicos y químicos), con la finalidad primordial de reducir los costos de la síntesis, aumentar la biocompatibilidad de los nanomateriales obtenidos, evitar el uso y generación de sustancias tóxicas, así como disminuir el consumo de energía en el proceso. Utilizando como agente reductor un extracto de origen vegetal en mínimas cantidades y bajas temperaturas (65°C) además de tiempos cortos de reacción, sintetizamos nanopartículas de cobre, plata y oro variando los parámetros utilizados, tratando de optimizar y controlar los procesos de nucleación y crecimiento, empleando como seguimiento inicial la técnica de espectrofotometría UV-Vis, la cual nos permitió observar la señal correspondiente a las nanopartículas sintetizadas a diferentes tiempos e intensidades, para posteriormente realizar una caracterización microestructural meticulosa mediante las técnicas de XRD, MET Y HRTEM.

Así mismo analizamos algunas de las capacidades y límites del material sintetizado, para lo cual hemos realizado distintas pruebas con las nanopartículas que obtuvimos como fueron: el seguimiento de su estabilidad durante varios meses, la impregnación en polímero, su deshidratación hasta nanopolvo y su posterior resuspensión; a través de lo cual logramos un panorama más amplio para una futura aplicación. Los extractos utilizados a partir de Agave fueron los reductores que seleccionamos para el proceso de síntesis verde, basándonos en sus características biológicas de ser un recurso renovable y muy cultivado en nuestro país, además de ser un género de plantas que están siendo objeto de varias investigaciones actualmente por las múltiples propiedades farmacológicas que presentan gracias a los metabolitos secundarios que se encuentran en sus tejidos.

En este trabajo realizamos una comparación mediante una síntesis diferencial ensayando tres extractos distintos a partir de la misma planta (etanólico, acuoso y hexánico) los cuales presentaron un alto poder reductor de los iones metálicos precursores, actuando a la vez como estabilizantes de las nanopartículas formadas, además de asegurar la ausencia de residuos tóxicos. En la aplicación final se buscó su actividad contra líneas celulares cancerosas, utilizando una línea celular de cáncer de pulmón, con perspectiva a una futura aplicación biomédica en el combate a tumores cancerígenos.

## **Abreviaturas**

AuNP's: Nanopartículas de oro

CuNP's: Nanopartículas de cobre

AgNP's: Nanopartículas de plata

HRTEM: High Resolution Transmission Electron Microscopy

NP's: Nanopartículas

NPM: Nanopartícula metálica

RPS: Resonancia del plasmón superficial

TEM: Transmission electron microscopy

UV-vis: Ultravioleta/visible

XRD: X ray diffraction

## AGRADECIMIENTOS

---

Al **Dr. José Luis Herrera Pérez**, por su asesoría, apoyo constante y acompañamiento para llevar a buen puerto este trabajo de investigación doctoral.

Al **Dr. Odilón Vázquez Cuchillo**, por su supervisión, guía y consejos para el progreso de mi formación doctoral durante este proyecto de investigación.

Muy especialmente y con gran cariño agradezco a mi amiga la **Dra. Alejandra Tovar Corona**, responsable de darme el empujón para entrar al Doctorado y sin cuya asesoría y apoyo tanto material como humano no hubiera sido posible el desarrollo del presente trabajo doctoral.

Al **Instituto Politécnico Nacional**, en cuya **Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas** cursé este Programa de Doctorado, agradezco igualmente a toda la planta Académica por su apoyo durante los cursos curriculares.

A los **Doctores miembros de mi comité tutorial**, que con sus valiosas aportaciones y observaciones me ayudaron a mejorar y corregir el presente proyecto de investigación.

Al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)** y al **Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT) de la BUAP** por su colaboración para la caracterización de las muestras utilizadas en este proyecto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado.

## Productos Obtenidos del Trabajo de Tesis Doctoral

### A) Publicaciones:

- Tovar-Corona A., Vázquez-Cuchillo O., **Moreno-Luna F. B.**, Hernández-Tosca D. C. Sistema biotecnológico para reducción de cromo (VI) en aguas residuales. (2016) Tópicos de Investigación en Ciencias de la Tierra y Materiales, 3, 163-174. ISSN: 2395-8405 <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/aactm/n3/index.html>
- Tovar-Corona, Alejandra, **Moreno-Luna F. Bersain**, Vázquez-Cuchillo Odilón, Herrera Pérez J. Luis, Romero Blázquez M. Fernanda, (2016) Aplicación de extractos selectivos de *Agave potatorum* en la síntesis de bionanomateriales de Plata, Revista Latinoamericana de Química p. 214.
- Tovar-Corona, Alejandra, **Moreno-Luna F. Bersain**, Vázquez-Cuchillo Odilón, Vázquez-Bravo J. Jaime, López-Pérez Jerson (2016), Alta capacidad reductora del extracto acuoso de *Agave potatorum* en la obtención biogénica de Nanopartículas de oro, Revista Latinoamericana de Química p. 67.
- Enrique Rodríguez-Zitlalpopoca, **F. Bersain Moreno-Luna**, Yasmín P. Muñíz-Soperánez, Alejandra Tovar Corona (2017), Evaluación bactericida de Nanopartículas de Plata en *Listeria monocytogenes*, Revista CiBIyT, año 12, número 35, septiembre-diciembre 12 de 2017 ISSN: 1870-056X.
- **F. B. Moreno-Luna**; J. L. Herrera-Perez; A. Tovar-Corona; J. Santoyo-Salazar; E. Rubio-Rosas; O. Vázquez-Cuchillo (2019), Quick synthesis of gold nanoparticles at low temperature, by using *Agave potatorum* extracts, Materials Letters, ISSN: 0167-577X, Vol: 235, Page: 254-257, <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.09.122>

### B) Trabajos presentados en Congresos y Simposium Nacionales e Internacionales:

- Torres-Montiel R., Rodríguez-Zitlalpopoca E., Juárez-Figueroa J., Barrientos-Rojas G., **Moreno-Luna F.**, Tovar-Corona A. (2016), Disminución de la carga Bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* con Nanopartículas de Plata (Ag<sub>0</sub>) obtenidas a partir de *Agave sp.*, Food & Biotechnology International Congress.
- **F. B. Moreno-Luna**, J. L. Herrera-Pérez, A. Tovar-Corona, J. Santoyo-Salazar, L. R. Morales- Juárez, O. Vázquez-Cuchillo. (2016), Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles by using Selective extracts from *Agave potatorum*, XXV International Material Research Congress
- Tovar-Corona Alejandra, **Moreno-Luna F. Bersain**, Vázquez-Cuchillo Odilón, Herrera Pérez J. Luis, Romero Blázquez M. Fernanda. (2016) Aplicación de extractos selectivos de *Agave potatorum* en la síntesis de bionanomateriales de plata, 1er Congreso de Biotecnología y Química Aplicada UPMP
- **Moreno-Luna Francisco B.**, Tovar-Corona Alejandra, Herrera-Pérez José Luis, Vázquez-Cuchillo Odilón, Jaime Santoyo Salazar. (2016) Síntesis Biogénica de

Metales Nobles (Au y Ag) mediante uso de extractos vegetales, 1er Congreso de Biotecnología y Química Aplicada UPMP.

- Tovar-Corona Alejandra, **Moreno-Luna F. Bersain**, López-Pérez Jerson. (2016), Síntesis de bionanomateriales de Cobre (Cu) mediante extracto etanólico de *Agave potatorum* por métodos biotecnológicos, 1er Congreso de Biotecnología y Química Aplicada UPMP.
- **F. B. Moreno-Luna**, J. L. Herrera-Pérez, O. Vázquez-Cuchillo, A. Tovar-Corona, J. Santoyo-Salazar. (2016) Biosíntesis de nanopartículas de oro utilizando extractos selectivos de *Agave potatorum*, 10a Semana de la investigación UPIITA IPN.
- Enrique Rodríguez-Zitlalpopoca, **F. Bersain Moreno-Luna**, Jocelyn G. Barrientos-Rojas, Alejandra Tovar-Corona. (2017) Evaluación bactericida de nanopartículas de plata obtenidas a partir de *Agave potatorum*, 13ª Reunión Internacional en Investigación de Productos Naturales.
- Luz Mireya Gonzaga Velázquez, **F. Bersain Moreno Luna**, Enrique Rodríguez Zitlalpopoca, José Luis Herrera Pérez, Alejandra Tovar Corona. (2017) Antibacterianos Nanobiotecnológicos a partir de plata (Ag) a partir de *Agave potatorum*, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Gonzaga Velázquez Luz Mireya, **Moreno Luna Francisco B.**, Zaca Morán Orlando, Tovar Corona Alejandra. (2017) Síntesis biotecnológica de nanopartículas de plata mediante extracto etanólico de *Agave potatorum*, 2º Congreso de Biotecnología Diversa.
- Luis Carlos Hernández Márquez, **Francisco B. Moreno Luna**, José Luis Herrera Pérez, Alejandra Tovar Corona. (2017) Comparación de la síntesis de nanomateriales de Au mediante fracciones selectivas de un extracto de origen natural, 2º Congreso de Biotecnología Diversa.
- Muñoz-Soperanez Yazmín P., Rodríguez-Zitlalpopoca Enrique, **Moreno-Luna F. Bersain**, Tovar Corona Alejandra. (2017) Determinación de la actividad bactericida de Nanopartículas de plata, 2º Congreso de Biotecnología Diversa.
- O. Zaca Moran, O. Secundino-Sánchez, N. Sánchez González, J. Aguila-López, **F. B. Moreno Luna**, J. L. Herrera-Pérez, J. Díaz-Reyes, J. F. Sánchez-Ramírez. (2018) Modelo y Experimento del Efecto de la Distancia de Electrohilado Sobre el Diámetro de las Nanofibras de Polivinilpirrolidona.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	13-19
<b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES</b>	
2.1. Características de las nanopartículas (NP's)	20
2.2. Clasificación de la síntesis de nanopartículas según la naturaleza del método de síntesis utilizado	21
A) Síntesis de nanopartículas mediante métodos físicos	21
B) Síntesis de nanopartículas mediante métodos químicos	22
C) Síntesis de nanopartículas mediante métodos biológicos	22
C.1. Uso de bacterias para la síntesis de nanopartículas	23
C.2. Uso de hongos para la síntesis de nanopartículas	24
C.3. Uso de plantas para la síntesis de nanopartículas	25
2.3. Uso de la nanotecnología en biomedicina	26
2.3.1. Transporte de fármacos mediante nanopartículas	26
2.3.2. Marcado celular mediante nanopartículas	27
2.3.3. Biosensores mediante nanopartículas	27
2.3.4. Nanopartículas metálicas con actividad anticancerígena	28
2.4. Síntesis de nanopartículas a partir de metabolitos presentes en extractos vegetales	29
2.4.1. Relevancia de los extractos de <i>Agave sp.</i> para la síntesis de NP's	35
2.4.1.1. Clasificación taxonómica del género <i>Agave sp.</i>	36
2.4.1.2. Características generales del género <i>Agave</i>	36
2.4.1.3. Compuestos con potencial reductor presentes en el género <i>Agave</i>	37
2.4.1.4. Características <i>Agave potatorum</i>	39
<b>CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN</b>	41
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	42
3.1. Hipótesis	42
3.2. Objetivo general	42
3.3. Objetivos particulares	42
<b>CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA</b>	43
4.1. Extractos vegetales reductores	43
4.2. Síntesis biogénica de nanopartículas de plata	44
4.3. Síntesis biogénica de nanopartículas de cobre	43
4.4. Síntesis biogénica de nanopartículas de oro	44

4.5. Caracterización de las nanopartículas sintetizadas	46
4.6. Ensayos de actividad citotóxica en cultivos celulares	46
4.7. Pruebas químicas para los extractos de <i>Agave potatorum</i>	46
4.8. Pruebas para evaluación de estabilidad de las AuNP's sintetizadas	47
4.9. Elaboración de nanopolvo a partir de las AuNP's sintetizadas	47
4.10. Soporte de las AuNP's sintetizadas en poliacrilamida	47

## **CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

5.1. Elaboración de los extractos de Agave	48
5.2. Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas de plata	51
5.3. Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas de cobre	54
5.4. Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas de oro	58
a) <i>Extracto acuoso Fx1</i>	
b) <i>Extracto etanólico Fx2</i>	
c) <i>Extracto hexánico Fx3</i>	
5.5. Monitoreo de la estabilidad de las AuNP's	75
5.6. Elaboración de nanopolvo	81
5.7. Soporte de las AuNP's en polímero	84
5.8. Determinación de los principales compuestos presentes en los extractos de <i>A. potatorum</i>	87
5.9. Ensayos de actividad citotóxica	90

## **CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**

## **7. REFERENCIAS**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Algunas bacterias que sintetizan NP's y características de la partícula sintetizada.	Pág. 24
Tabla 2	Algunos hongos que sintetizan NP's y características de la partícula sintetizada	Pág. 25
Tabla 3	Algunos extractos de plantas que sintetizan NP's y características de la partícula sintetizada	Pág. 26
Tabla 4	Algunos extractos de plantas utilizados para sintetizar NP's y tamaños de la partícula sintetizada	Pág. 31
Tabla 5	Algunas especies de agaves en las que se ha estudiado la presencia de compuestos fenólicos	Pág. 38
Tabla 6	Terpenos presentes en especies de agaves mezcaleros	Pág. 39

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Desarrollo y evolución del cáncer en lo general.
- Figura 2 Estructura general de algunos terpenos
- Figura 3 Estructura general de algunos polifenoles
- Figura 4 Mecanismo posible para la síntesis biológica de NP's mediante extractos vegetales.
- Figura 5 Planta adulta de *Agave potatorum* de 10 años de edad utilizada para este estudio
- Figura 6 Metodología general del procedimiento de obtención de extractos
- Figura 7 Hojas fragmentadas de *Agave potatorum* para su pesaje y procesamiento
- Figura 8 Molienda de hojas de *Agave potatorum*
- Figura 9 Extracto acuoso Fx1 de *Agave potatorum* y bagazo sobrante para su secado
- Figura 10 Soporte del extracto Fx2 en sílica gel y su elución mediante hexano
- Figura 11 Resumen general del procedimiento de obtención de extractos
- Figura 12 Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis de AgNP's Fx1
- Figura 13 Micrografía TEM de muestra AgNP's sintetizadas Fx1
- Figura 14 Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis de CuNP's Fx1
- Figura 15 Micrografías TEM de muestra CuNP's sintetizadas Fx1
- Figura 16 Comparación efecto Tyndall evidenciando el haz de láser y la presencia de partículas coloidales
- Figura 17 Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis AuNP's Fx1
- Figura 18 Control UV-Vis de la síntesis AuNP's Fx1
- Figura 19 Caracterización microestructural de las AuNP's sintetizadas Fx1
- Figura 20 Patrón XRD correspondiente a AuNP's sintetizadas Fx1

- Figura 21 Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis AuNP's Fx2
- Figura 22 Control UV-Vis de la síntesis AuNP's Fx2
- Figura 23 Caracterización microestructural de las AuNP's sintetizadas Fx2
- Figura 24 Patrón XRD correspondiente a AuNP's sintetizadas Fx2
- Figura 25 Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis AuNP's Fx3
- Figura 26 Caracterización microestructural de las AuNP's sintetizadas Fx3
- Figura 27 Patrón XRD correspondiente a AuNP's sintetizadas Fx3
- Figura 28 Seguimiento UV-Vis de la estabilidad de las AuNP's Fx1
- Figura 29 Seguimiento UV-Vis de la estabilidad de las AuNP's sintetizadas durante 180 días
- Figura 30 Comparación por triplicado del efecto de almacenamiento de las AuNP's Fx1 y AuNP's Fx2 sintetizadas
- Figura 31 Proceso de resuspensión de AuNP's Fx1
- Figura 32 Proceso de elaboración de nanopolvo a partir de las AuNP's sintetizadas mediante extracto Fx1 y Fx2
- Figura 33 Análisis UV-Vis de los nanopolvos resuspendidos en H<sub>2</sub>O tridestilada a partir de las AuNP's sintetizadas mediante las fracciones Fx1 y Fx2
- Figura 34 Soporte en polímero de poliacrilamida las AuNP's sintetizadas mediante las fracciones Fx1 y Fx2 después de su desecación.
- Figura 35 Lectura UV-Vis del sobrenadante analizado a partir de las muestras acuosas en contacto con los gránulos de poliacrilamida impregnados con las AuNP's sintetizadas mediante las fracciones Fx1 y Fx2 desde 60 hasta 420 minutos.
- Figura 36 Principales componentes fenólicos presentes en los extractos Fx1, Fx2 y Fx3 de *A. potatorum* utilizados.
- Figura 37 Otros grupos de compuestos presentes en los extractos Fx1, Fx2 y Fx3 de *A. potatorum* utilizados.
- Figura 38 Ensayo MTT para determinar actividad citotóxica de AuNP's Fx1.
- Figura 39 Resumen general de las síntesis efectuadas mediante los extractos de *A. potatorum*.

# CAPÍTULO 1.

---

## INTRODUCCIÓN

En fechas recientes la nanotecnología ha avanzado de manera importante hacia la fabricación de nuevos materiales con las propiedades especiales que le confiere a la materia la escala nanométrica. Gracias a su minúsculo tamaño y a su gran superficie de contacto las nanopartículas presentan propiedades interesantes y permiten su rearrreglo para conformar nanoestructuras de distinta morfología como: nanoesferas, nanotubos, nanodiamantes, nanoestrellas, entre otras [1].

Las nanopartículas inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción para diversos propósitos, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas singulares [2-4], estas propiedades les son conferidas manipulando su tamaño y forma, así como la funcionalización de su superficie. Una de las ramas importantes de la nanotecnología se dirige a la síntesis de nanopartículas metálicas para su aplicación en distintas áreas [1-3], en particular la síntesis de NP's a partir de metales nobles como el oro, ha adquirido recientemente gran relevancia debido a las aplicaciones que presentan estas partículas metálicas en múltiples áreas como son la medicina, óptica, electrónica y remediación ambiental [4-10]. Sin embargo, los métodos de síntesis fisicoquímicos rutinarios presentan muchas veces el inconveniente de requerir altas cantidades de energía (presión, electricidad, temperatura) lo que dificulta su escalamiento industrial, además de utilizar y/o generar ciertas sustancias tóxicas en el proceso que son difícilmente removibles en su totalidad [11,12], lo cual impacta de manera importante tanto al ambiente como a su potencial aplicación dentro de sistemas biológicos.

## INTRODUCCIÓN

Es por ello que en últimas fechas se han venido desarrollando nuevos métodos de síntesis de nanopartículas metálicas utilizando procedimientos biotecnológicos, mediante el uso de microorganismos [13-15] y plantas para la síntesis de NP's [16-19]. Con base en esta perspectiva ecoamigable y biocompatible este trabajo explora la síntesis biogénica de nanopartículas de cobre, plata y oro (CuNP's, AgNP's y AuNP's) desde una metodología de química verde, empleando extractos selectivos obtenidos a partir de biomasa de *Agave potatorum*, la cual es una planta mexicana xerófila. Es importante mencionar que dentro el género *Agave* se han identificado diversos compuestos que son importantes para hacer más eficiente la síntesis de bionanomateriales, entre ellos: sapogeninas, fructanos, compuestos fenólicos y terpenoides [20-25], los cuales presentan también importantes propiedades farmacológicas como por ejemplo actividad antiinflamatoria, analgésica, ulceroprotectiva y gastroprotectora entre otras [26-28].

Como se mencionó anteriormente, una línea de investigación muy importante para la aplicación nanotecnológica se encuentra en el área de medicina, mediante el diseño de nanomateriales o nanodispositivos precisos y eficientes a nivel molecular que solo ataquen objetivos específicos, dejando intactas las células sanas de los tejidos adyacentes. Con este fin se busca diseñar este tipo de dispositivos, los cuales puedan interactuar con moléculas receptoras presentes en la superficie de membranas y por lo tanto ejercer su función a una escala de nivel celular (10 a 100  $\mu\text{m}$ ), por ello es necesario que las estructuras y tamaño de estos dispositivos sean desarrollados y manipulados de forma meticulosa, para lo cual resulta indispensable el uso de tecnologías microscópicas como lo es la nanotecnología.

Dentro de las enfermedades que afectan al ser humano, uno de los retos más grandes que tenemos como una patología que afecta la salud y la calidad de vida de millones de personas actualmente es el cáncer, enfermedad que surge por diversos factores

## INTRODUCCIÓN

ambientales y genéticos que ocasionan cambios celulares dañinos con la consecuente proliferación celular desmedida de estas células malignas, lo cual se traduce en la pérdida de la funcionalidad de órganos y tejidos y la muerte del paciente cuando no es detectado en sus primeras fases. Tanto por la progresión de la enfermedad, como sus características de diseminación, así como el elevado costo y agresividad de sus tratamientos, el cáncer ocasiona terribles impactos económicos y físicos en los pacientes que lo padecen, muchas veces prácticamente devastando la calidad de vida de los mismos y sus familias.

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, con más de 10 millones de casos cada año [29], existiendo sólo en 2012 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer [30]. Las estimaciones señalan que los nuevos casos van a aumentar un 70% en los próximos 20 años; siendo más frecuentes en el hombre el cáncer en de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; mientras que en la mujer los tipos de cáncer más comunes son los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago [31]:

1. pulmonar (1,59 millones de defunciones);
2. hepático (745 000 defunciones);
3. gástrico (723 000 defunciones);
4. colorrectal (694 000) defunciones;
5. mamario (521 000 defunciones);
6. cáncer de esófago (400 000 defunciones).

El cáncer como tal puede afectar cualquier tejido del organismo y puede migrar desde el sitio de inicio a nuevas zonas u órganos, proceso conocido como metástasis; la invasión de nuevos tejidos y proliferación de las células cancerosas son la principal causa de la

## INTRODUCCIÓN

muerte de los pacientes (Fig. 1). En la actualidad las nuevas tecnologías han dado lugar a una comprensión más completa de cáncer a niveles genéticos, moleculares y celulares que proporcionan nuevos objetivos y estrategias de tratamiento [32].

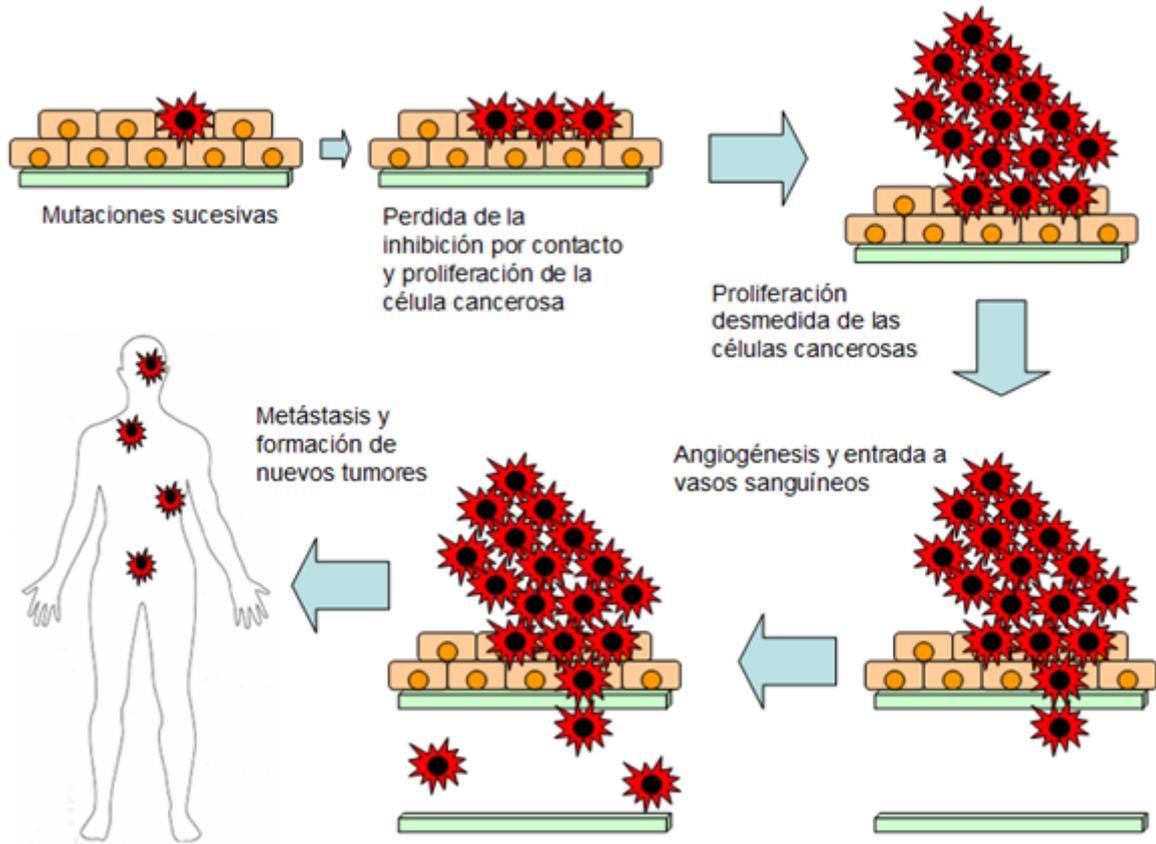


Figura 1. Desarrollo y evolución del cáncer en lo general

Sin embargo, estos avances no se han traducido efectivamente en éxito. Por ejemplo, la eficacia de muchos medicamentos contra el cáncer está limitada debido a la imposibilidad de llegar al sitio dañado en concentraciones suficientes para ejercer el efecto farmacológico sin causar lesiones irreversibles no deseadas a las células y tejidos sanos adyacentes [33].

Por esto, con el fin de mejorar las terapias actuales, la medicina tiene una gran ventana de oportunidad en la nanotecnología, mediante la cual se han logrado sintetizar diversos

## INTRODUCCIÓN

nanomateriales utilizando una amplia variedad de métodos, siendo uno de los más rutinarios la síntesis mediante reducción química, pero en muchos de los casos manipulando sustancias tóxicas como agentes reductores, entre ellos el sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS), hidroxilamina, borohidruro de sodio, por citar algunos ejemplos, utilizando en ocasiones en el proceso agentes estabilizantes no biodegradables por lo cual varios de estos procedimientos de síntesis son potencialmente dañinos al ambiente y a los sistemas biológicos, sin mencionar también que algunos métodos de síntesis requieren altas cantidades de energía en el proceso, dificultando así su escalamiento industrial.

Es por ello que el desarrollo de procedimientos para la síntesis de NP's más "amigables" con el medio ambiente y la salud humana es otra oportunidad que debe aprovecharse integrando la llamada "química verde" junto con la nanociencia para crear una "nanociencia verde" [34, 35] que nos proporcione el uso sustentable e inocuo de estas partículas nanométricas, siendo prioritario el desarrollo de tecnologías más ecológicas para la síntesis y ensamblaje de nanopartículas, mediante nuevos métodos de síntesis.

Estudios recientes sobre esta síntesis de nanopartículas están siendo actualmente desarrollados con la finalidad de evitar la manipulación o generación de sustancias tóxicas en la síntesis de estos materiales nanométricos. Esta aproximación se aborda desde tres puntos principales:

1. La selección del medio o solvente no tóxico biocompatible.
2. La selección de agentes reductores inocuos al ambiente.
3. La selección de sustancias no tóxicas para estabilizar las NP's.

## INTRODUCCIÓN

Con este fin se han hecho estudios utilizando distintos entes biológicos, desde microorganismos (bacterias, hongos, algas) así como extractos vegetales (plantas xerófitas, mesófitas e hidrófitas) [36]. Se sabe que, a pesar de su simplicidad, los microorganismos han desarrollado estrategias altamente especializadas para poder coexistir con diversos minerales y metales en los distintos ambientes donde se han desarrollado a lo largo de millones de años de evolución. Para el caso de bacterias, se han empleado especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aureginosa*, entre otros, mediante las cuales se han logrado sintetizar nanopartículas de oro, plata, paladio y selenio [37-39]; del mismo modo microorganismos de tipo eucariótico como algas y hongos, han sido también utilizados favorablemente para sintetizar nanopartículas de antimonio, oro y plata [40-42]. En esta vertiente, dentro de los géneros fúngicos más importantes podemos mencionar *Penicillium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, entre otros [43,44].

La otra gran rama de la “química verde” que se ha desarrollado con resultados prometedores es la síntesis de nanopartículas mediante el uso de extractos vegetales, generando mayores rendimientos en menor tiempo, además de que los extractos contienen múltiples metabolitos secundarios que intervienen en los mecanismos de reducción metálica. Mediante esta técnica, usando plantas o sus extractos se han sintetizado nanopartículas de plata, oro, níquel, cobalto, zinc y cobre, por un lado, disminuyendo los tiempos de síntesis y por otro llevando a cabo la reacción a bajas temperaturas, lo cual tiene importantes implicaciones tanto en su impacto ambiental como en ahorro de energía. Entre las plantas que más se han estudiado para esta “síntesis verde” podemos mencionar *Brassica juncea* (mostaza), *Medicago sativa* (alfalfa), *Helianthus annuus* (girasol), *Bryophyllum sp.* (kalanchoe), *Magnolia kobus*, *Mentha piperita* (menta), *Azadirachta indica* (neem) entre otras [45-48].

## INTRODUCCIÓN

Siguiendo esta técnica de síntesis mediante extractos vegetales y tomando en cuenta que en nuestro país existen varios géneros botánicos sobresalientes, uno de los cuales es el género *Agave*, del cual cabe señalar que no existe a la fecha reporte alguno de su uso en la síntesis nanotecnológica, decidimos explorar sus capacidades para esta finalidad. Gran parte de las especies del género *Agave* son endémicas de México, existiendo más de 200 especies reportadas y varias de ellas con diversos usos tradicionales y ancestrales [49, 50], así como de gran importancia económica en la elaboración de bebidas alcohólicas (mezcal, pulque, tequila, sotol, etc.), lo cual proporciona una amplia cantidad de biomasa disponible como subproducto. El género *Agave* comprende plantas de naturaleza xerófitas, resistentes a múltiples plagas y enfermedades, así como a condiciones ambientales adversas. Fitoquímicamente se sabe que algunos de los compuestos presentes en varias especies de agave son los terpenos y flavonas, los cuales se han identificado como algunos de los compuestos responsables de la formación de nanopartículas mediante extractos vegetales de otras especies de plantas, hablando más específicamente estos compuestos han sido identificados en especies de agave como son: *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. duranguensis*, *A. karwinsky* y *A. victoria-reginae* [51, 52]. Por todas estas características este género vegetal resulta interesante para su aplicación en el proceso de síntesis verde de nanopartículas.

## CAPÍTULO 2.

---

### ANTECEDENTES

#### 2.1. Características de las Nanopartículas (NP's)

Las nanopartículas son de gran interés en múltiples campos de la ciencia y la tecnología, por sus diversas aplicaciones en áreas como la catálisis, electrónica, fotónica, magnetismo y biología molecular, esto debido a que su minúsculo tamaño y diseño dirigido les confieren propiedades únicas y precisas, lo cual es en gran medida gracias a la amplia área superficial que poseen en sus estructuras. Frecuentemente son consideradas como átomos artificiales debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas [53-56], las investigaciones y el avance en la manipulación de los procesos de síntesis han permitido dirigir la formación de estas estructuras para aprovechar sus propiedades y “programar” así su forma para cumplir funciones específicas en diversas disciplinas. El ensamblado modular de estos átomos permite potencializar sus propiedades únicas de acuerdo con diferentes necesidades tecnológicas. Muchas de estas propiedades pueden controlarse, cambiando la forma, el tamaño o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula en cuestión, sin que exista la necesidad de llevar a cabo cambios en la composición del material en sí mismo. La técnica que se ha empleado ampliamente para la síntesis de nanopartículas es la química húmeda, la cual ha proporcionado NP's de alta calidad a partir de metales como plata, oro y óxido de hierro [57-60]. Uno de los elementos clave en el proceso de la formación de las NP's es lograr manipular adecuadamente las condiciones de síntesis para así controlar la morfología y las propiedades de las estructuras nanométricas creadas según la aplicación que se requiera, por otro lado, otro de los factores clave es lograr la estabilización de las NP's, para que se mantengan según

el diseño creado en sus características de forma y tamaño durante el tiempo adecuado o en su almacenamiento.

### **2.2. Clasificación de la síntesis de nanopartículas según la naturaleza del método de síntesis utilizado**

Existen diferentes métodos que se han empleado tradicionalmente para la síntesis de NP's, mediante los métodos de "*Abajo hacia arriba*" cuando se parte de la agregación de átomos y de "*Arriba hacia abajo*" cuando se parte de la disgregación de sólidos hasta moléculas muy pequeñas [61, 62], sin embargo dentro de estos métodos existe otra clasificación, que nos permite agrupar los métodos de síntesis de NP's en tres categorías, métodos físicos, métodos químicos, métodos físico-químicos y recientemente los métodos biológicos.

#### A) Síntesis de nanopartículas mediante métodos físicos

Entre los métodos físicos más utilizados para la síntesis de NP's se encuentran las siguientes metodologías:

- Molienda mecánica, la cual se basa en molinos ultraeficientes los cuales parten de un material en bulto (macroscópico) el cual lo van disgregando hasta formar nanopolvos ultrafinos los cuales contienen el mismo material del que se partió pero en dimensionalidad reducida [63],
- Ablación láser, la cual es una técnica donde se generan nanopartículas a partir de un material vaporizado mediante un láser que genera nucleación y crecimiento de la especie en cuestión en un entorno gaseoso, el enfriamiento extremadamente veloz del vapor generado permite la síntesis de nanopartículas del alta pureza y rango cuántico ( $< 10$  nm) [64].

## ANTECEDENTES

- Síntesis sonoquímica, el cual es un método que genera interacciones de alta energía con temperaturas y presiones localizadas muy altas, la técnica sonoquímica se origina principalmente de cavitaciones acústicas: la formación, crecimiento y colapso implosivo de burbujas en líquidos, de esta forma cuando las soluciones son sometidas a irradiación ultrasónica potente, las burbujas colapsan implosivamente por los campos acústicos, las condiciones extremas en estos “puntos calientes” han sido determinadas experimentalmente, con temperaturas itinerantes de ~5000 K, presiones > 1800 atm y rangos de enfriamiento de 1010 K/s. Los productos generados son en algunos casos nanopartículas amorfas y en otros casos nanopartículas cristalinas [65]

### B) Síntesis de nanopartículas mediante métodos químicos

La síntesis de NP's mediante métodos químicos es ampliamente utilizada debido a que se trata de técnicas más simples y eficientes, en general se basan en la reducción química empleando agentes reductores orgánicos e inorgánicos y la especie que se pretende reducir. Entre estas técnicas tenemos las anteriormente mencionadas en los métodos de “Abajo hacia arriba” como son: Método coloidal, método de síntesis solvotermal, método de reducción fotoquímica y radioquímica, método electroquímico y método de sol-gel. El control de la forma y tamaño de las NP's se logra manipulando las concentraciones del agente reductor, el medio o solvente y el precursor metálico [63].

### C) Síntesis de nanopartículas mediante métodos biológicos

Algunos de los problemas con los métodos físicos y químicos para la síntesis de NP's son entre otros:

## ANTECEDENTES

- Equipos costosos en algunos métodos
- Costos prohibitivos para su escalamiento industrial
- Emplean agentes tóxicos para los humanos y el ambiente

Por ello existe una creciente necesidad de métodos alternativos para la síntesis de NP's mediante métodos que sean compatibles con la ecología y el ambiente (química verde), lo cual ha conducido a nuevas metodologías empleando plantas y microorganismos para la síntesis de NP's.

### *C.1. Uso de bacterias para la síntesis biológica de NP's:*

La habilidad de las bacterias para interactuar con diferentes compuestos y metales se ha estudiado desde hace tiempo, entendiéndose como una capacidad que han desarrollado los microorganismos para evitar la toxicidad de iones metálicos en su entorno, existiendo incluso bacterias como *Magnetospirillum* que mediante inclusiones de metales en su citoplasma puede desplazarse por magnetotaxis [66]; se ha demostrado que varios géneros bacterianos son capaces de producir intra y extracelularmente NP's de oro, plata, cadmio, hierro, magnetita y zinc [67].

Los mecanismos que llevan a cabo las bacterias para la síntesis de NP's son sistemas de transporte, alteración de la solubilidad y alteración de la toxicidad vía reducción u oxidación, bioacumulación, acomplejamiento extracelular, bioabsorción y precipitación de metales [67]. Entre algunos de los géneros y especies bacterianas más importantes que se han utilizado son: *Aeromonas sp.*, *Klebsiella pneumonia*, *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas stutzeri*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Rhodococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Rhodopseudomonas capsulate*, *Desulfovibrio desulfuricans* [68-72] entre otras.

## ANTECEDENTES

Bacteria	NP	Tamaño (nm)	Forma de la NP
<i>Rhodococcus</i>	Au	5-15	esférica
<i>Escherichia coli</i>	Au Cd/Te	20-30 2.0-3.2	triángulos, hexágonos esférica
<i>Rhodopseudomonas capsulate</i>	Au	10-20	esférica
<i>Bacillus cereus</i>	Ag	4-5	esférica
<i>Enterobacter sp.</i>	Hg	2-5	esférica
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pd	50	esférica

Tabla 1. Algunas bacterias que sintetizan NP's y características de la partícula sintetizada [68-72].

### *C.2. Uso de hongos para la síntesis biológica de NP's:*

Estudios recientes han demostrado que mediante distintos géneros de hongos se pueden producir NP's de dimensiones bien definidas, entre las cuales tenemos NP's de plata, plomo, cadmio y oro. Debido a que se trata de células eucarióticas y por tanto presentan un metabolismo más complejo que las bacterias (procariotas), los hongos tienen una gran cantidad de enzimas y proteínas disponibles lo cual contribuye a la producción de mayores rendimientos de NP's. El rango de tamaño y velocidad de formación de las NP's se ha logrado controlar mediante el ajuste de las condiciones del medio de cultivo: pH, temperatura, concentración del metal y tiempo de exposición. Dentro de los géneros y especies más representativos que se han estudiado para la síntesis de NP's podemos mencionar *Verticillium sp.*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichothecium sp.*, *Trichoderma sp.*, entre otras [73-77].

## ANTECEDENTES

Hongo	NP	Tamaño (nm)	Forma de la NP
<i>Trichoderma</i>	Ag	5-40	esférica
<i>Aspergillus flavus</i>	Ag	8.92±1.61	esférica
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ag	5-25	esférica
<i>Verticillium sp.</i>	Ag	25±8	esférica
<i>Fusarium oxysporum</i>	Au, Au/Ag	32, 20-50	esférica
<i>Neurospora crassa</i>	Pd	50	esférica

Tabla 2. Algunos hongos que sintetizan NP's y características de la partícula sintetizada [73-77].

### *C.3. Uso de plantas para la síntesis biológica de NP's:*

La síntesis de NP's mediante el uso de plantas o sus extractos presenta ventajas importantes con respecto a la síntesis mediante el uso de microorganismos, entre estas ventajas tenemos que la metodología es sencilla, la velocidad de síntesis es elevada, es un método económico, presentan una gran cantidad de metabolitos secundarios que potencian la reducción, es una síntesis compatible con el ambiente y potencialmente escalable a procesos industriales. NP's de cobre, zinc, plata, cobalto, níquel, paladio y platino, han logrado ser sintetizadas mediante el uso de extractos de diversas plantas, en estos extractos se han identificado varios compuestos fitoquímicos responsables de los procesos de reducción de los iones metálicos, entre estos compuestos se encuentran los terpenoides, flavonas, cetonas, aldehídos, amidas y ácidos carboxílicos, detectados mediante estudios de espectroscopia infrarroja.

Según su adaptación a las condiciones de sequía o disponibilidad de agua, las plantas se clasifican en xerófitas (ambientes secos), mesófitas (ambientes con humedad media) e hidrófilas (ambientes con humedad elevada), para el caso de las plantas xerófitas, se ha encontrado que contienen emodina, una antraquinona que puede ser responsable de la formación de nanopartículas; con respecto a las plantas mesófitas, se han encontrado

## ANTECEDENTES

presentes tres tipos de benzoquinonas las cuales llevan a cabo un papel importante en la síntesis de NP's; por último en las plantas hidrófitas se han identificado compuestos como catecol y protocatecaldehído que son las sustancias que intervienen en la síntesis de NP's. El tamaño de las nanopartículas sintetizadas usando plantas xerófitas, mesófitas e hidrófitas se encuentran en el rango de 2-5 nm [78-81].

Planta	NP	Tamaño (nm)	Forma de la NP
<i>Medicago sativa</i>	Au y Ag Ti/Ni (bimetálica) Zn	20-40 2-6 2-5.6	Esférica y triangular Principalmente esférica Esférica
<i>Avena sativa</i>	Au	25-85	Esférica
<i>Azadirachta indica</i>	Ag, Au y Au/Ag (bimetálica)	50-100	Esférica
<i>Aloe vera</i>	Ag	15-15.6	Esférica
<i>Emblica officinalis</i>	Au y Ag	15-25 y 10-20	Principalmente esférica
<i>Cinnamomum camphora</i>	Au y Ag	55-85	Principalmente esférica
<i>Capsicum annum</i>	Ag	16-40	Principalmente esférica
<i>Tamarindus indica (hoja)</i>	Au	20-40	Principalmente esférica

Tabla 3. Algunos extractos de plantas que han sido utilizados para la síntesis de NP's y características de la partícula sintetizada [78-81].

### 2.3. Uso de la nanotecnología en biomedicina

Las aplicaciones de las nanopartículas están adquiriendo actualmente un gran interés especialmente en el área biológica, en particular dentro de la rama de la medicina, ya que nanopartículas y nanomateriales de distintos tipos son objeto de estudios tanto para el diagnóstico así como para el combate de enfermedades, mediante su aplicación para técnicas de marcaje celular, transporte de fármacos, monitoreo e hipertermia por citar algunos ejemplos.

### 2.3.1 Transporte de fármacos mediante NP's

Existen actualmente avances con NP's de oro para el transporte de fármacos aprovechando las propiedades biocompatibles de este metal noble además de sus propiedades de funcionalización [82, 83].

Estudios recientes han demostrado la capacidad de las NP's de oro de liberar fármacos de manera controlada mediante energía infrarroja, además observándose que las NP's de diferente forma responden a distintas longitudes de onda en el espectro infrarrojo [82].

### 2.3.2. Marcado celular mediante NP's

Los estudios donde se requiere de marcar células específicas aprovechan las propiedades de las NP's para absorber electrones y aprovechar así esta característica como agentes de contraste que generen imágenes en TEM, en este caso las NP's de oro presentan una fuerte absorción de electrones [83, 84]. Otra de las características interesantes de las NP's es la de su tamaño, ya que comparten rangos de tamaño con proteínas y biopolímeros que pueden ser marcados para su seguimiento en procesos celulares [85].

### 2.3.3. Biosensores mediante NP's

Las NP's tienen el potencial de ser utilizadas mediante su bioconjugación con polímeros biológicos y su soporte en biomateriales con el fin de desarrollar biosensores electrónicos u ópticos. En particular se ha visto que metales como el oro y la plata exhiben bandas de absorbancia de plasmón en la región visible que depende del tamaño de cada NP, además sus propiedades ópticas pueden cambiar al ser enlazadas a ciertas biomoléculas permitiendo la detección y cuantificación del algún analito de interés [86].

### 2.3.4. Nanopartículas metálicas con actividad anticancerígena

El desarrollo de dispositivos de una estructura precisa en escala nanométrica es una importante área de investigación que en el caso de la medicina tiene gran potencial como un mecanismo eficiente de transporte y depósito o anclaje en las células tumorales que se desean combatir. Estas nanoestructuras funcionan como una herramienta innovadora para el diagnóstico y tratamiento del cáncer mediante nuevos agentes para imagenología o nanodispositivos capaces de traspasar las barreras biológicas hasta el sitio de acción requerido para depositar algún agente farmacológico directamente en las células cancerosas y tejidos malignos, evitando o controlando la metástasis y eliminando las células malignas en el proceso. La investigación nanotecnológica actualmente genera herramientas importantes para diagnosticar y tratar enfermedades que causan un gran número de muertes anualmente como lo es el cáncer. Con este fin se han utilizado nanopartículas (NP's), en particular de metales nobles como oro y plata por su versatilidad en aplicaciones como ensayos de diagnóstico [87,88], ablación termal y amplificación de radioterapia [89-92], así también como transportadores de fármacos y terapia génica [93-96]. Otra aplicación que se estudia con estas NP's es su función como nanotransportadores no tóxicos de fármacos [97-99].

Existe también el uso reciente de NP's dentro de la terapia génica bloqueando ciertos genes "silenciándolos"; se ha demostrado que AuNP's unidas a oligodeoxinucleótidos de una sola cadena pueden proveer regulación génica eficiente sin efectos tóxicos a las concentraciones manipuladas [100].

Existen también diferentes tipos de nanopartículas metálicas que se han utilizado para convertir energía en calor mediante estimulación magnética o infrarroja [101].

Nanopartículas de hierro y oro se han probado favorablemente para combatir cáncer cerebral, cuello y próstata [102]. Las propiedades de superficie y funcionalidad de las

## ANTECEDENTES

AuNP's se han aprovechado para el transporte de fármacos en la superficie de ciertas células tumorales [103].

Sin embargo, para poder utilizar las NP's el principal reto es desarrollar un sistema, capaz de circular en la sangre sin ser detectados por el sistema inmune, reconocer el objetivo deseado, dirigirse a las células cancerosas blanco y realizar la dispersión focalizada del fármaco [103] o mediante estrategias génicas de silenciamiento de genes disminuyendo los daños celulares al mínimo. Además, para su uso médico las NP's deben ser sintetizadas a partir de una técnica sencilla que permita funcionalizar su superficie, con diversos anticuerpos, péptidos, y/o ADN/ARN para atacar específicamente a ciertos blancos celulares [104-106].

Como se ha comentado también actualmente existe el inconveniente de que los métodos de síntesis de NP's involucran la mayoría de las veces el uso de sustancias altamente tóxicas, disminuyendo la posibilidad de aplicación en las áreas biológicas. Ante esta necesidad, se han venido desarrollando una serie de técnicas agrupadas bajo el concepto de nanotecnología verde, proponiendo para la obtención de nanopartículas (NP's), el uso de materias primas naturales que no generen subproductos tóxicos, y la biosíntesis, representa una opción viable para tal fin, al ser más fácilmente escalables a un menor costo en comparación a las rutas químicas.

### **2.4. Síntesis de nanopartículas a partir de metabolitos presentes en extractos vegetales**

Como se ha comentado con anterioridad, existe una creciente necesidad de contar con métodos de síntesis de NP's que sean inocuos con el ambiente, así como de uso seguro en animales y humanos, es por ello que la "química verde" surge como una alternativa para que en conjunto con la nanotecnología den paso a una "nanotecnología verde" [107]

## ANTECEDENTES

que permita el diseño y manipulación de NP's "bioseguras" en sistemas biológicos, el ambiente y además que en su proceso no generen o empleen sustancias o residuos tóxicos de difícil disposición. Uno de los métodos que se está estudiando actualmente para la síntesis de nanopartículas es la síntesis mediante métodos biológicos, esto se logra mediante el uso tanto microorganismos como plantas, de ambas posibilidades se ha observado que la síntesis de NP's a partir de extractos vegetales presentan grandes ventajas sobre la síntesis de NP's utilizando microorganismos, como: velocidad elevada de síntesis, una amplia cantidad de metabolitos disponibles para realizar la reducción, obtención y manejo sencillo de los extractos vegetales, solventes y compuestos amigables con el ambiente y muy baja o nula toxicidad de los extractos vegetales y por tanto en el proceso de biosíntesis. De seis años a la fecha, múltiples extractos vegetales se han probado para la síntesis de nanopartículas metálicas, con resultados variables tanto por el metal utilizado, como en la morfología y tamaño de las nanopartículas generadas, diferencias ocasionadas por los múltiples metabolitos presentes en los distintos extractos vegetales que han sido empleados, incluso existiendo variaciones al utilizar distintas partes de una misma planta, ya que esto impacta en las concentraciones de los metabolitos presentes. Debido a estas características y la gran cantidad de compuestos químicos presentes en muchas especies de plantas, el potencial que tiene este tipo de síntesis para ser explotada y mejorada es muy extenso. Algunos ejemplos de este tipo de síntesis se enlistan en la tabla 4.

## ANTECEDENTES

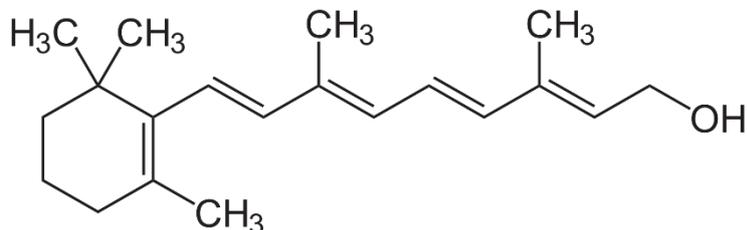
Planta	Nombre común	Nanopartícula	Tamaño (nm)	Autor
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Au y Ag Ti/Ni (bimetálica) Zn	20-40 2-6 2-5.6	Torresday <i>et al.</i> , 2002 Schabes-Retchkiman <i>et al.</i> , 2006
<i>Avena sativa</i>	Avena	Au	25-85	Armendariz <i>et al.</i> , 2004
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	Ag, Au y Au/Ag (bimetálica)	50-100	Ripathi <i>et al.</i> , 2009
<i>Emblica officinalis</i>	Amalaki	Au y Ag	15-25 y 10-20	Ankamwar <i>et al.</i> , 2005
<i>Cinnamomum camphora</i>	Alcanfor	Au y Ag	55-85	Huang <i>et al.</i> , 2007
<i>Capsicum annum</i>	Chile	Ag	16-40	Shikuo <i>et al.</i> , 2007
<i>Tamarindus indica (hoja)</i>	Tamarindo	Au	20-40	Shanker <i>et al.</i> , 2004
<i>Pelargonium graveolens</i>	Geranio	Ag	16–40 nm	Shankar <i>et al.</i> , 2003
<i>Aloe vera</i>		Ag y Au	15.2 ± 4.2 nm	Chandran <i>et al.</i> , 2006
<i>Coriandrum sativum</i>	Cilantro	Au	6.75–57.91 nm	Badrinarayanan <i>et al.</i> , 2008
<i>Carica papaya</i>	Papaya	Ag	60–80 nm	Mude <i>et al.</i> , 2009
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Escobilla	Ag	52–80 nm	Parashar <i>et al.</i> , 2009
<i>Sesuvium portulacastrum</i>	Verdolaga costera	Ag	5–20 nm	Philip, 2002

Tabla 4. Algunos extractos de plantas utilizados para sintetizar NP's y tamaños de la partícula sintetizada.

Dentro de la composición de estos extractos vegetales se ha identificado que los metabolitos responsables de la reducción de iones metálicos en la sal precursora con la consecuente formación de las NP's son los terpenoides, cetonas, aldehídos, amidas, polifenoles, azúcares, alcaloides, proteínas, ácidos carboxílicos y/o benzoquinonas [108]. Los terpenoides son un grupo de polímeros orgánicos sintetizados en las plantas a partir de unidades isoprenicas de 5 carbonos, estos compuestos poseen una alta capacidad antioxidante (Fig. 2).

## Terpenos

### Retinol (diterpenoide)



### Humulona (Sesquiterpenoide)

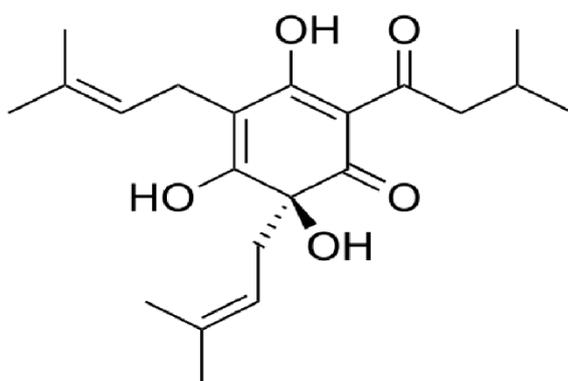


Figura 2. Estructura general de algunos terpenos

Por otra parte los flavonoides comprenden un grupo amplio de compuestos polifenólicos que tienen como característica poseer dos anillos aromáticos unidos por medio de tres átomos de carbono (Fig. 3), se pueden dividir en; flavonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanoles, flavanonas y flavonoles; estos compuestos poseen una actividad antioxidante principalmente debido a los grupos hidroxilos presentes en su estructura; este grupo de compuestos contienen varios grupos funcionales que son los responsables de la formación de las NP's,

## Polifenoles

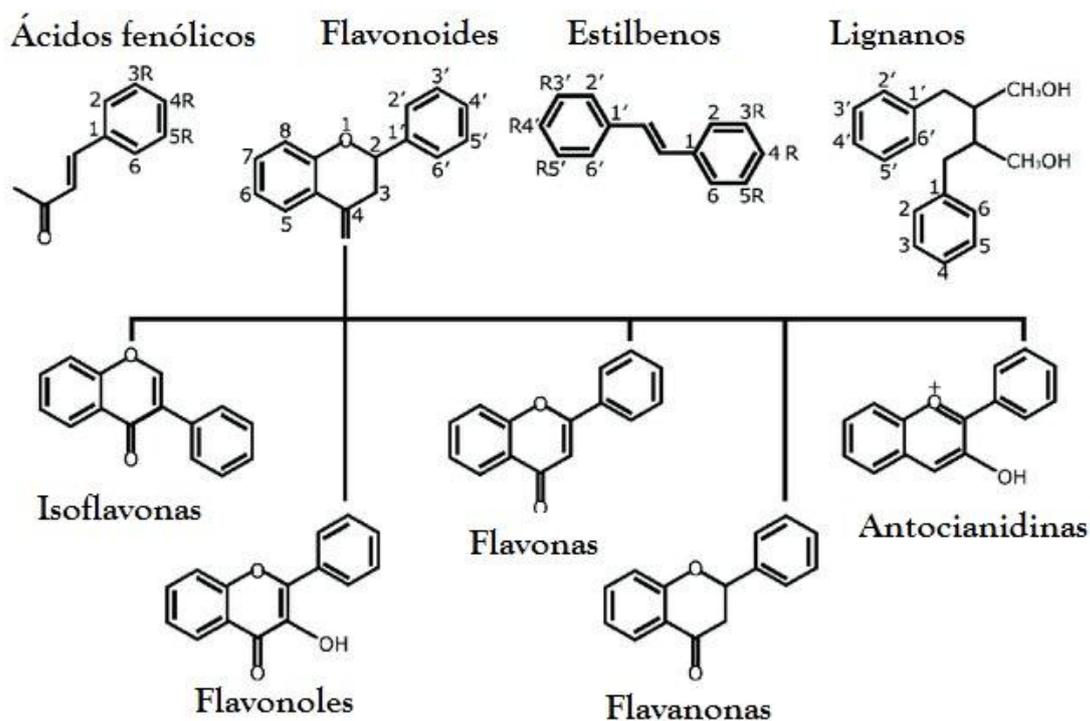


Figura 3. Estructura general de algunos polifenoles

Se ha postulado que los cambios tautoméricos de la forma enólica a la forma cetónica liberan un átomo reactivo de hidrogeno que puede reducir los iones metálicos a su forma de NP's. También existen investigaciones que apuntan que los azucres presentes en los extractos vegetales pueden inducir la formación de NP's; se sabe que la glucosa puede actuar como un agente reductor. Múltiples estudios también han señalado que las NP's se encuentran frecuentemente asociadas a proteínas en los extractos vegetales, dentro de las proteínas se ha observado que distintos aminoácidos tienen diferentes capacidades para actuar como agentes reductores. Se dice que en general existen tres fases para la síntesis de NP's mediante el uso de extractos vegetales [109] (Fig. 6):

- A) La fase inicial donde ocurre la reducción de los iones metálicos y la subsecuente nucleación de los átomos metálicos, se puede decir que es una fase de

## ANTECEDENTES

“activación”.

- B) La fase intermedia o de “crecimiento” donde las nanopartículas metálicas cercanas empiezan a agregarse espontáneamente para formar estructuras de tamaños mayores (proceso de maduración de Ostwald), donde se forman diminutos conglomerados de partículas contribuyendo a la estabilidad termodinámica de las mismas.
- C) La fase terminal o de “finalización” donde queda determinada la forma definitiva de las nanopartículas en esta etapa las NP's adquieren la conformación energética más estable. La duración de esta fase determinará el crecimiento de la formación de nanoestructuras, para formar nanotubos, nanoprismas, nanohexahedros entre otras estructuras [110]. La estabilidad proporciona a las NP's en esta fase dependerá de los metabolitos presentes en el extracto y de la habilidad que tengan para estabilizar la formación e las NP's.

Existen otros factores que determinan la síntesis de NP's en extractos de plantas como por ejemplo el pH del medio, el tiempo de reacción la temperatura utilizada, y la concentración y potencial electroquímico del ion metálico en cuestión.

## ANTECEDENTES

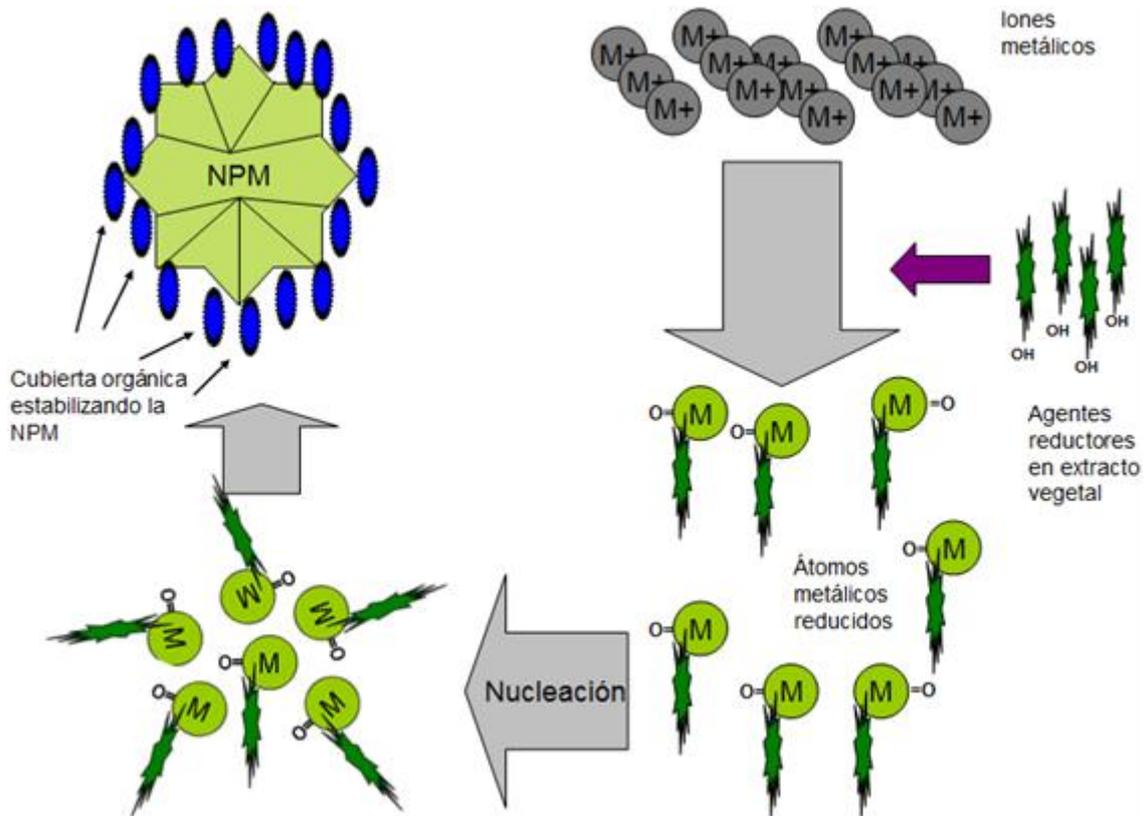


Figura 4. Mecanismo posible para la síntesis biológica de NP's mediante extractos vegetales (NPM nanopartícula metálica)

### 2.4.1. Relevancia de los extractos de *Agave sp.* para la síntesis de NP's.

Dentro de la gran biodiversidad vegetal que tenemos en México, uno de los géneros de plantas más importantes es el género *Agave*, utilizado tradicionalmente para la elaboración de varios tipos de bebidas alcohólicas como el pulque, mezcal, bacanora, sotol, tequila, entre otras. La palabra *Agave* significa “noble” y el género que representa engloba aproximadamente 200 especies, de las cuales el 75 % se encuentran en México [49], siendo muchas de naturaleza endémica, por lo que se considera a nuestro país como su el centro de origen.

### *2.4.1.1. Clasificación taxonómica del género Agave*

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida (Monocotiledóneas)

**Subclase:** Liliidae

**Orden:** Liliales

**Familia:** Agavaceae

**Género:** Agave

**Subgénero:** Agave

**Sección:** Rigidae

### *2.4.1.2. Características generales del género Agave*

Se trata básicamente de plantas de tipo herbáceo y tejidos suculentos por lo cual son resistentes a las condiciones xéricas. Sus hojas se encuentran dispuestas en forma de roseta, generalmente con espinas en los márgenes o “dientes” y una espina terminal. Su inflorescencia emerge del centro de la roseta y puede ser en forma de espiga o ramificada, cuyas flores crecen en estructuras denominadas umbelas emergiendo de los pedúnculos laterales [49-50].

Los agaves son plantas suculentas que utilizan dentro de sus bioprocesos el metabolismo ácido en crasuláceas (CAM) el cual es una adaptación de las plantas xerófitas para cerrar sus estomas de día evitando así la evapotranspiración y pérdida de agua y abriendo sus estomas por la noche para absorber el CO<sub>2</sub> que requieren [111].

## ANTECEDENTES

Reproducción: Su forma de propagación puede ser asexual (hijuelos) como sexual (semillas).

Distribución: Se distribuye en el continente americano, creciendo en zonas que oscilan desde los 40 grados latitud norte hasta los 20 grados latitud sur. Desde el norte se encuentra distribuido en zonas áridas y semiáridas de Estados Unidos y México, posteriormente su distribución baja de latitud a lo largo de las islas del Caribe y en Sudamérica se encuentra distribuido en Venezuela y Colombia.

Usos: Los principales usos que tiene el género Agave son para la elaboración de bebidas mediante fermentación alcohólica, la obtención de fibras textiles y la obtención de compuestos de tipo esteroidal. Tradicionalmente se ha empleado desde hace muchos años con fines medicinales.

### 2.4.1.3. *Compuestos con potencial reductor presentes en el género Agave*

Se ha determinado en diversos estudios que existe una gran variedad de compuestos presentes en las plantas pertenecientes al género Agave, muchos de estos compuestos exhibiendo además un importante potencial de reductor. Dentro de estas investigaciones se han identificado por ejemplo terpenos en *A. tequilana* weber *var. azul* [112], *A. salmiana* y *A. angustifolia* [113]. Así mismo, resultados del análisis fitoquímico de extractos acuosos de *A. sisalina* demostraron la presencia de alcaloides flavonoides, taninos, saponinas y glucósidos cardíacos [114]. Otras investigaciones han demostrado la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en *A. attenuata* [115]. De esta forma tenemos que en varias especies de agaves se han descrito compuestos fenólicos como vemos a continuación:

## ANTECEDENTES

Especie de agave	Tejido analizado	Compuesto determinado	Autor
<i>Agave americana</i>	Flores	Compuestos fenólicos (3-O- glucósido de kaempferol)	Subramanian y Nair 1970
	Hojas	Compuestos fenólicos (Flavanonas complejas)	Parmer <i>et al.</i> 1992
<i>Agave sisalana</i>	Hojas	Compuestos fenólicos (flavanona, flavonoles, homoisoflavonoides)	Chen <i>et al.</i> 2009
	Hojas	Compuestos fenólicos (homoisoflavonoides)	Botura <i>et al.</i> 2013
<i>Agave barbadensis</i>	Rizoma	Compuestos fenólicos (homoisoflavonoides)	Tinto <i>et al.</i> 2005
<i>Agave durangensis</i>	Hojas adultas y juveniles, polen	Compuestos fenólicos (flavonoles)	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> 2009
<i>Agave asperrima</i>	Hojas adultas	Compuestos fenólicos (flavonoles)	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> 2009
<i>Agave victoriae-reginae complex</i>	Hojas adultas	Compuestos fenólicos (flavonoles, ácidos fenólicos, flavonas, dihidroflavonoides)	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> 2013
<i>Agave lechuguilla</i>	Hojas adultas	Compuestos fenólicos (flavonoles)	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> 2013
<i>Agave striata</i>	Hojas adultas	Compuestos fenólicos (flavonoles, flavonas, dihidroflavonoides, ácidos fenólicos)	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> 2013
<i>Agave shrevei</i>	Hojas juveniles	Compuestos fenólicos (flavonoles)	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> 2009
<i>Agave tequilana</i>	Hojas adultas y tallo	Compuestos fenólicos (homoisoflavanonas)	Morales-Serna <i>et al.</i> 2010

Tabla 5. Algunas especies de agaves en las que se ha estudiado la presencia de compuestos fenólicos.

De la misma manera se han realizado diferentes investigaciones que han reportado la presencia de compuestos del grupo de los terpenos identificados en varias especies del género *Agave*, entre las cuales podemos mencionar: *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. karwinski*, *A. cupreata* y *A. duranguensis*.

## ANTECEDENTES

Especie de agave	Tejido analizado	Compuesto determinado
<i>Agave salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	Hojas	Compuestos terpénicos (Isotujol, Linalol, Pinocarveol, Terpinen-4-ol, $\alpha$ -Terpineol, Mirtenol, Nerol, Carvona, Geraniol, Eugenol, Cadineno, Cubenol, $\alpha$ –Bisabolol, Farnesol)
<i>Agave angustifolia</i>	Hojas	Compuestos terpénicos (Isotujol, Linalol, Mentol, Terpinen-4-ol, $\alpha$ -Terpineol, Nerol, Carvona, Geraniol, Eugenol, Cubenol, $\alpha$ –Bisabolol, Farnesol)
<i>Agave karwinsky</i>	Hojas	Compuestos terpénicos (Isotujol, p-Cimeno, Linalol, Mentol, Terpinen-4-ol, $\alpha$ -Terpineol, Nerol, Isogeraniol, Carvona, Geraniol, Eugenol, Cubenol, $\alpha$ –Bisabolol, Farnesol)
<i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassiispina</i>	Hojas	Compuestos terpénicos (Isotujol, Linalol, Pinocarveol, Mentol, Terpinen-4-ol, $\alpha$ -Terpineol, Nerol, Isogeraniol, Carvona, Geraniol, Eugenol, Cubenol, $\alpha$ –Bisabolol, Farnesol)
<i>Agave cupreata</i>	Hojas	Compuestos terpénicos (Linalol, Pinocarveol, Mentol, Terpinen-4-ol, $\alpha$ -Terpineol, Nerol, Carvona, Geraniol, Mirtanol, Eugenol, Cadineno, $\alpha$ –Bisabolol, Farnesol)
<i>Agave duranguensis</i>	Hojas	Compuestos terpénicos (Linalol, $\alpha$ -Felandreno, $\alpha$ -Terpineno, m-Cimeno, $\beta$ -Felandreno, Verbenol, Mentol, Terpinen-4-ol, $\alpha$ -Terpineol, Mirtenol, Boneol, Piperitol, Isogeraniol, Citral, Nerol, Carvona, Geraniol, Mirtanol, Eugenol, Cadineno, $\alpha$ –Bisabolol, Farnesol)

Tabla 6. Terpenos presentes en especies de agaves mezcaleros (Santos *et al.* 2008)

### 2.4.1.4. Características *Agave potatorum*

Dentro del género *Agave* existe una especie denominada *Agave potatorum*, esta especie fue descrita en 1832 por Zuccarini, quien recopiló la información sobre su forma de crecimiento, medidas y morfología. Gentry (1982) reunió bajo *Agave potatorum* a un número altamente variable de plantas que crecen en los estados de Oaxaca y Puebla, aplicando un concepto amplio para la especie [116].

Las plantas de *Agave potatorum* desarrollan una roseta muy proporcionada de hasta 80 cm de altura. Las hojas presentan una coloración azulada-grisácea con una serosidad sobre su superficie, con dimensiones de hasta 35 por 15 cm de ancho. Los bordes dentados de las hojas son ondulados y presentan espinas de color marrón rojizo. Sus inflorescencias crecen hasta 3,5 m de altura, produciendo pequeños bulbillos. Las plantas adultas pueden llegar a 50 cm de diámetro [116].

## ANTECEDENTES

Nombre científico: *Agave potatorum* Zucc.

Nombre común: Maguey de Mezcal, Maguey Mezcalero, Tobala

Familia: Asparagaceae

Orden: Asparagales

Subclase o clase: Liliidae

Época de floración: Septiembre a diciembre

Distribución: Puebla y Oaxaca



Figura 5. Planta adulta de *Agave potatorum* de 10 años de edad utilizada para este estudio.

### CAPÍTULO 3.

---

#### JUSTIFICACIÓN

El avance actual de la nanotecnología ha permitido la síntesis de múltiples materiales de dimensionalidad reducida, así como de diferente composición y morfología. Esta gran variedad de nanomateriales disponibles con propiedades especiales ha permitido su aplicación en diversas áreas de la ciencia y tecnología.

Este progreso importante de la nanotecnología ha permitido la síntesis de nanomateriales de distintas características y elementos: semiconductores, metálicos, cerámicos, basados en carbono, poliméricos, entre otros, gracias a las técnicas avanzadas de síntesis que se están implementando en grupos de investigación a nivel mundial. Sin embargo cada vez se requieren estándares más altos en cuanto a la fabricación de estos nuevos materiales, ya que aunado a la nanoescala y propiedades especiales que deben presentar, actualmente una gran preocupación a nivel internacional en el desarrollo de estos procesos es la ausencia de subproductos tóxicos que puedan contaminar el ambiente, además de que la ausencia de residuos no deseados anclados a las nanopartículas sintetizadas es un factor de suma relevancia para su aplicación en sistemas biológicos.

Precisamente una de estas disciplinas con mayor potencial e importancia para la aplicación de estos nanomateriales bioseguros es el área de la Biomedicina, mediante el uso de NP's metálicas, como apoyo para diagnóstico y tratamiento en algunas enfermedades de gran importancia a nivel mundial, como lo es el cáncer. Es por esto que las técnicas de síntesis mediante la "química verde" son una interesante opción, en particular utilizando extractos de plantas, estas técnicas se proponen como una alternativa de estudio en nuestro país, ya que en México tenemos disponibles una gran variedad de especies vegetales que contienen múltiples metabolitos secundarios con un amplio

## JUSTIFICACIÓN

potencial para la reducción de metales y la conformación de estructuras nanométricas que pueden ser investigadas para su aplicación contra células cancerígenas por ejemplo. Tomando en cuenta todas las anteriores consideraciones, la presente propuesta pretende potencializar y afinar las técnicas de la nanotecnología verde para la síntesis biogénica de nanopartículas metálicas funcionalizadas y biocompatibles, a partir de extractos de *Agave* reductores para su potencial aplicación en el área biomédica.

### 3.1. HIPÓTESIS

La Biosíntesis controlada de nanomateriales funcionales mediante extractos naturales permitirá ampliar sus aplicaciones en el área biomédica.

### 3.2. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanopartículas metálicas biogénicas y biocompatibles mediante extractos vegetales para su potencial aplicación biomédica

### 3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- A) Determinar los extractos de *Agave sp.* con mayor potencial para la síntesis de nanopartículas metálicas.
- B) Establecer las condiciones de síntesis para la obtención de nanopartículas metálicas por rutas biotecnológicas para obtener material estructuralmente estable con composición química definida a baja temperatura.
- C) Realizar la caracterización nano-estructural de las diferentes nanopartículas sintetizadas.
- D) Evaluar mediante pruebas *In vitro* la potencial aplicación biomédica de las nanopartículas sintetizadas.

## CAPÍTULO 4.

### METODOLOGÍA.

#### 4.1. Extractos vegetales reductores

La preparación de extractos selectivos de *Agave potatorum* se realizó a partir de biomasa proveniente de hojas basales de plantas cultivadas de *A. potatorum* de diez años de edad y se utilizó tanto el extracto líquido como la fibra seca. Inicialmente las hojas de agave fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada y cortadas en pequeños trozos de aproximadamente 10 g, posteriormente mediante fragmentación de las hojas en una licuadora industrial se obtuvo un primer extracto el cual fue posteriormente filtrado para elaborar el extracto acuoso llamado Fx1 y el bagazo resultante de este proceso fue sometido a desecado en un horno a 50 °C para posteriormente ser colocado en un equipo Soxhlet de 350 mL donde fue sometido a extracción etanólica caliente durante 5 ciclos de reflujo llamado Fx2, posteriormente el extracto etanólico fue soportado en sílica gel dentro de una columna cromatográfica y eluido posteriormente con hexano (Fig. 6) llamado Fx3. Todos los extractos obtenidos fueron posteriormente almacenados en frascos con cierre hermético a 4 °C hasta su utilización.

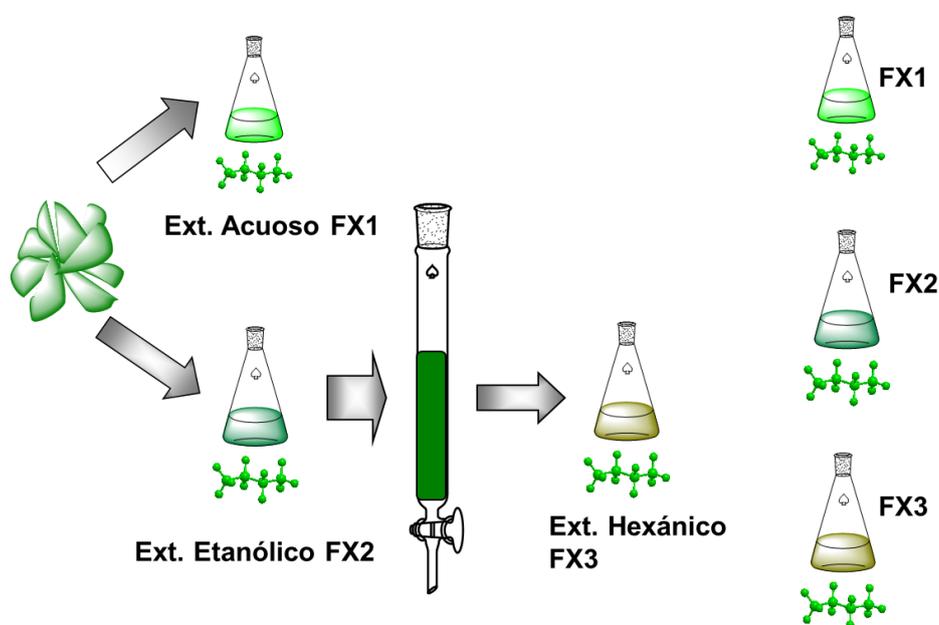


Figura 6. Metodología general del procedimiento de obtención de extractos.

### 4.2. Síntesis biogénica de nanopartículas de plata

La síntesis biogénica de nanopartículas de plata se realizó utilizando una solución acuosa 10mM de  $\text{AgNO}_3$  (Sigma-Aldrich), a la cual se le agregaron respectivamente 2 diferentes extractos provenientes del agave: Acuoso 4 mL (Fx1) y etanólico (Fx2) 4 mL, cada uno por separado en reactores de 100 mL, en una proporción de: 80%  $\text{AgNO}_3$  – 20% Fx1, 80%  $\text{AgNO}_3$  – 20% Fx2, manteniendo una temperatura constante de reacción de 65°C y agitación hasta obtener un cambio de coloración, virando de una solución transparente a café rojizo (Fx1 y Fx2), como indicador de la reducción de los iones  $\text{Ag}^{1+} \rightarrow \text{Ag}^0$ .

### 4.3. Síntesis biogénica de nanopartículas de cobre

La síntesis biogénica de nanopartículas de cobre se realizó utilizando una solución acuosa 10mM de  $\text{CuCl}_2$  (Sigma-Aldrich), a la cual se le agregó extracto etanólico (Fx2) 4 mL, en reactor de 100 mL, en una proporción de: 80%  $\text{CuCl}_2$  – 20% Fx2, manteniendo una temperatura constante de reacción de 65°C y agitación hasta obtener un cambio de coloración, virando de una solución color verde militar a color verde esmeralda, como indicador de la reducción de los iones  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^0$ .

### 4.4. Síntesis biogénica de nanopartículas de oro

La síntesis biogénica de nanopartículas de oro se utilizando una solución acuosa 1mM de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma-Aldrich), a la cual se le agregaron respectivamente los diferentes extractos provenientes del agave: Acuoso 2 mL, etanólico 2 mL y hexánico 8 mL, cada uno por separado en reactores de 100 mL, en una proporción de: 90%  $\text{HAuCl}_4$  – 10% Fx1, 90%  $\text{HAuCl}_4$  – 10% Fx2, 60%  $\text{HAuCl}_4$  – 40% Fx3 manteniendo una temperatura constante de reacción de 65°C y agitación hasta obtener un cambio de coloración, virando de amarillo claro a violeta (Fx1 y Fx2) y virando a color rosa (Fx3), como indicador de la reducción de los iones  $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$ .

### 4.5. Caracterización de las NP's sintetizadas

- a) *Análisis de espectroscopía UV-Vis*: El seguimiento de la formación y estabilidad de las NP's sintetizadas a partir de los tres metales (Au, Ag y Cu) se llevó acabo inicialmente mediante espectroscopia UV-Vis (Espectrofotómetro Perkin-Elmer lambda 35), en un rango de longitud de onda de 190 – 900 nm con una resolución

## METODOLOGÍA

de 1 nm, extrayendo alícuotas cada cierto tiempo hasta finalizar la reacción, procesando posteriormente los datos mediante el programa OriginLab.

- b) *Análisis mediante TEM (Microscopía electrónica de Transmisión:* La morfología de las NP's sintetizadas a partir de los tres metales (Au, Ag y Cu), así como los análisis de TEM de alta resolución y los patrones de Difracción Electrónica de Área Seleccionada (SAED) fueron obtenidos mediante las imágenes generadas mediante Microscopia Electrónica de Transmisión utilizando un microscopio TEM JEM 2010 (JEOL) operando a un voltaje de aceleración de 200 kV. Se depositaron 2 µl de las muestras en rejillas de cobre con recubrimiento Formvar, dejando evaporar el solvente a temperatura ambiente
- c) *Análisis de difracción de Rayos X:* Los análisis XRD fueron realizados en un difractómetro D8 Bruker Discover Series 2 operando con radiación Cu K $\alpha$ .

### 4.6. Ensayos de actividad citotóxica en cultivos celulares

Con la finalidad de evaluar la actividad citotóxica de las AuNP's sintetizadas se realizó la evaluación correspondiente en el Centro de Investigación Oncológica de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, utilizando el método MTT [117]. Este ensayo se fundamenta en la reducción metabólica del compuesto Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, la reducción es llevada a cabo por la enzima succinato-deshidrogenasa dando origen a un compuesto azul (formazan), de modo que es posible determinar la funcionalidad mitocondrial de cultivos celulares de la línea A549 (Carcinoma pulmonar) y células PBM (mononucleares de sangre periférica), incubando durante 24 horas en placas de cultivo celular multipocillos.

### 4.7. Pruebas químicas para los extractos de *Agave potatorum*

**Determinación de flavonoides.** 10 mg de quercitina se disolvieron en etanol al 80% y posteriormente diluido a 25, 50 and 100 µg/mL. Las soluciones estándar (0.5 mL) fueron mezcladas por separado con 1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Después de incubar a temperatura ambiente por 30 min, la absorbancia fue leída a 415 nm. Los cálculos se realizaron por el método de Folin Ciocalteu. [118]

**Determinación de fenoles totales:** El contenido de fenoles totales fue determinado por el método Folin–Ciocalteu, con algunas modificaciones [119]. 100 µl del extracto a analizar,

## METODOLOGÍA

diluido con agua destilada o el estándar de ácido gálico fueron mezclados con 500 µl del reactivo Folin–Ciocalteu y 2 mL de solución de carbonato de sodio al 10% y agua destilada hasta un volumen final de 10 mL. La mezcla fue homogenizada e incubada por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue determinada a 750 nm contra el blanco. Se utilizaron soluciones de ácido gálico (entre 0 y 100 ppm) para calibración. Los resultados fueron expresados como mg en equivalentes de ácido gálico (GAEs) por 100 g de peso fresco (mg de GAEs/100 g de PF). [119]

***Determinación de polifenoles totales:*** Se prepararon 10 mL de disoluciones de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 0 y 16 ppm y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5%. Se colocan 250 µL de cada disolución proveniente del estándar de ácido gálico así como del sobrenadante procedente del extracto vegetal y se colocan en matraces aforados de 25 mL. A continuación se agregaron 15 mL de agua destilada así como 1.25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, se mezcla bien y se deja reposar durante 8 minutos en condiciones de oscuridad. A continuación se agrega a cada matraz 3.75 mL de la solución de carbonato sódico al 7.5 % aforando posteriormente con agua destilada a un volumen final de 25 mL. Por último se procede a homogeneizar los matraces y se mantienen en oscuridad a temperatura ambiente por 2 horas, la absorbancia de las muestras se lee a 765 nm. [120].

***Determinación de esteroides:*** Se utilizaron 50 mg de cada uno de los extractos los cuales fueron disueltos en 25 mL de cloroformo homogenizando esta dilución, posteriormente se extrae 1mL de esta dilución y se le adicionan 2 mL de reactivo Liebermann Burchard y se afora en un matraz de 5mL completando el volumen con cloroformo. Esta mezcla se deja reposar 5 min y se procede a medir su absorbancia. [121]

***Determinación de azúcares reductores:*** Se prepararon soluciones de glucosa de diferente concentración mediante diluciones de una solución madre de 1 g/L, a continuación se realiza el mismo procedimiento para la curva de calibración con glucosa como para la muestra de extracto como se detalla a continuación, se coloca en tubos de 10 mL, 1 mL de cada extracto y 1 mL del reactivo DNS ajuntando el pH a 10.3, a continuación los tubos se llevan a baño térmico a 100 °C durante minutos y se dejan enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se agregan 8 mL de agua tridestilada, homogeneizando y se procede a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm, las

## METODOLOGÍA

lecturas obtenidas se comparan contra un blanco consistente en un tubo donde se sustituye el extracto por agua tridestilada repitiendo el procedimiento. [122]

### **4.8. Pruebas para evaluación de estabilidad de las AuNP's sintetizadas**

El seguimiento de la estabilidad de las AuNP's sintetizadas se llevó a cabo mediante espectroscopia UV-Vis (Espectrofotómetro Perkin-Elmer lambda 35), en un rango de longitud de onda de 190 – 900 nm con una resolución de 1 nm, evaluando la síntesis original almacenada en esterilidad a 4 °C, para ello se fueron extrayendo alícuotas de 2 mL cada 15 días.

### **4.9. Elaboración de nanopolvo a partir de las AuNP's sintetizadas**

Con la finalidad de elaborar el nanopolvo se procedió a sintetizar 50 mL de AuNP's, las cuales fueron posteriormente centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido fue desecado en un horno de calentamiento a 50°C durante 48 horas. La pastilla obtenida fue pulverizada en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino.

### **4.10. Soporte de las AuNP's sintetizadas en poliacrilamida**

Se procedió a depositar 15 mL de cada una de las nanopartículas sintetizadas en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL, agregando a cada una dos de las suspensiones de nanopartículas de oro (AuNP's Fx1 y AuNP's Fx2) 1 g de poliacrilamida granular Acua-gel® (acrilamida insoluble al agua y acrilato de potasio), después de 2 horas se sometieron ambas muestras de gel cargado de AuNP's a desecación a 45 °C por 12 horas hasta la eliminación total del solvente.

## CAPÍTULO 5.

---

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *5.1. Elaboración de los extractos de Agave*

El proceso que llevamos a cabo para la elaboración de los extractos de Agave fue realizado mediante el lavado cuidadoso de hojas frescas de *Agave potatorum* las cuales cortamos en fragmentos para su mejor procesamiento y pesaje (Fig. 7). De esta manera se procedió a pesar 100 g de hoja de *Agave potatorum* y se continuó con su fragmentación en una licuadora de uso industrial (Fig. 8), el extracto obtenido fue filtrado y almacenado a 4 °C hasta su posterior uso, este primer extracto crudo obtenido lo denominamos Fx1 (Fig. 9), procediendo a su almacenamiento en refrigeración a 4°C, ya que al contener múltiples azúcares y aminoácidos además de microorganismos como levaduras, empieza a fermentar rápidamente en caso de permanecer a temperatura ambiente. Con la finalidad de extraer compuestos adicionales empleando el bagazo de las hojas provenientes de esta primera fase el cual fue desecado en un horno a 50°C hasta la total pérdida de humedad (Fig. 9) y posteriormente lo colocamos en un extractor Soxhlet utilizando como solvente etanol, manteniéndolo bajo estas condiciones durante cuatro ciclos de reflujo con lo cual obtuvimos un extracto verde cristalino y se procedió a su enfriamiento (Fx2) (Fig. 11 F). Una vez enfriado a temperatura ambiente (24°C), este extracto Fx2 fue soportado sobre sílica gel cromatográfica y una vez seco se procedió a colocarlo en una columna cromatográfica para su elución empleando como solvente hexano (Fig. 10), todos los extractos fueron posteriormente almacenados a 4°C hasta su uso. Es interesante señalar que la planta de agave utilizada durante 4 años para este estudio (Fig. 5) no presenta daños o destrucción derivada del proceso de corte de múltiples hojas para su uso en los extractos, respaldando la naturaleza renovable y noble de este procedimiento de síntesis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 7. Hojas fragmentadas de *Agave potatorum* para su pesaje y procesamiento



Figura 8. Molienda de hojas de *Agave potatorum*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 9. Extracto acuoso Fx1 de *Agave potatorum* y bagazo sobrante para su secado.



Figura 10. Soporte del extracto Fx2 en sílica gel y su elución mediante hexano.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

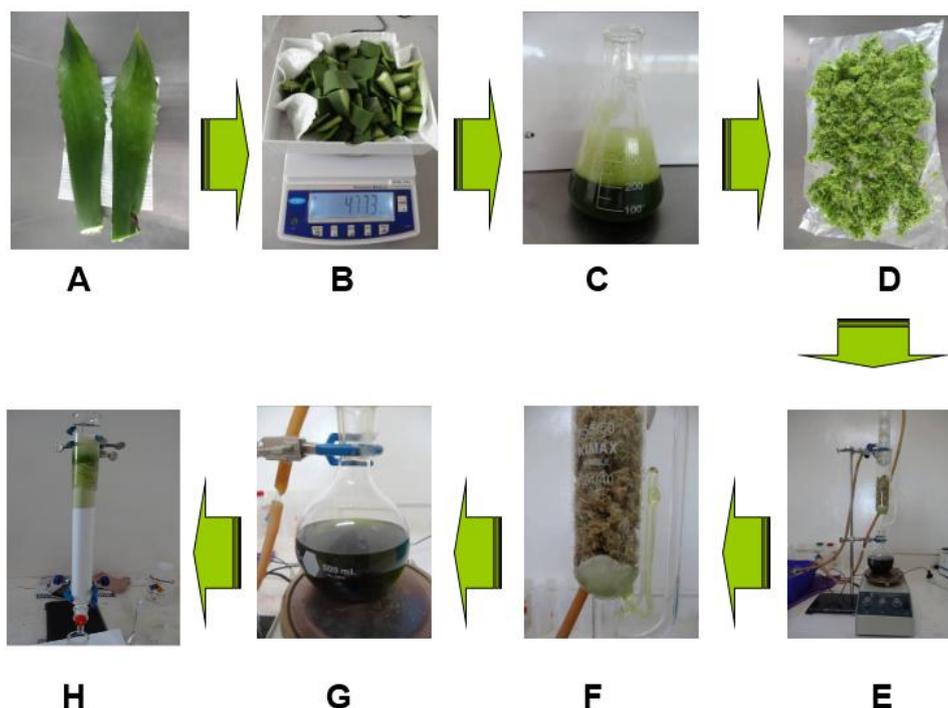


Figura 11. Resumen general del procedimiento de obtención de extractos. (A-lavado de hojas, B-corte y pesado, C- filtrado [Fx1], D- secado del bagazo, E- extracción caliente en Soxhlet, F-reflujo en caliente mediante etanol, G-extracto etanólico [Fx2], H-soporte del extracto etanólico en sílica y elución mediante hexano [Fx3]).

### 5.2. Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas de plata

El primer procedimiento utilizado para realizar la síntesis de AgNP's se llevó a cabo aprovechando las propiedades reductoras (Atribuidas a los compuestos con grupos OH presentes en metabolitos como flavonoides y polifenoles) del extracto crudo proveniente de *Agave potatorum* (denominado Fx1). Este extracto reductor fue adicionado a la solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  10 mM, siguiendo cuidadosamente los cambios en el reactor, de forma preliminar visualmente y posteriormente mediante espectrofotometría UV-Vis como se detalla a continuación:

- a) *Extracto acuoso Fx1*: La síntesis biogénica de las nanopartículas de plata fue realizada utilizando el extracto acuoso (Fx1) de *A. potatorum* el cual funciona como agente bioreductor y estabilizante [123], los metabolitos que se encuentran presentes en el Agave (azúcares, flavonoides, aminoácidos, fenoles, saponinas y

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

terpenoides) [20-25] permiten la reducción de los iones  $\text{Ag}^{+1}$  [107, 108]. Inicialmente la síntesis de AgNP's se manifiesta mediante el cambio de coloración de la solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) la cual es una solución transparente, que adquiere un color verdoso al agregarle el extracto Fx1 y posteriormente desarrolla una coloración café rojiza al avanzar el tiempo de reacción (Fig. 12 B), este cambio de color nos indica una reducción de los iones  $\text{Ag}^{+1}$  a su forma metálica elemental  $\text{Ag}^0$ , generando probables sitios de nucleación con su posterior proceso de crecimiento para formar las nanopartículas de plata (AgNP's). El seguimiento detallado de la reacción lo realizamos mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis que nos permite identificar la curva correspondiente a la resonancia del plasmón superficial (RPS) de las nanopartículas de plata [124, 125] a una longitud de onda de 400 nm, confirmándonos de manera preliminar la presencia de estas nanoestructuras (Fig. 12 A).

Para realizar este seguimiento mediante espectrofotometría UV-Vis, se procedió a extraer alícuotas de 1 mL a partir de la reacción principal (20 mL), estas alícuotas fueron posteriormente aforadas a un volumen de 10 mL, deteniendo la reacción inmediatamente mediante sumersión en baño frío, estas alícuotas extraídas fueron analizadas a continuación una a una en el espectrofotómetro UV-Vis para proceder a graficarlas en su conjunto. Como se observa en la figura 11, esta señal de RPS inicia en el minuto 5 (Fig. 12 A-a), presentándose como una curva doble definida con picos presentes a una longitud de onda de 420 y 441 nm la cual se va intensificando conforme avanza el tiempo de reacción; de esta manera la señal se intensifica de manera importante, llegando a su punto máximo de absorbancia a los 60 minutos de reacción (Fig. 12 A-1), terminando esta señal con

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

una mayor definición en la curva correspondiente a 441 nm, principalmente después de los 30 min de reacción (Fig. 12 A-h).

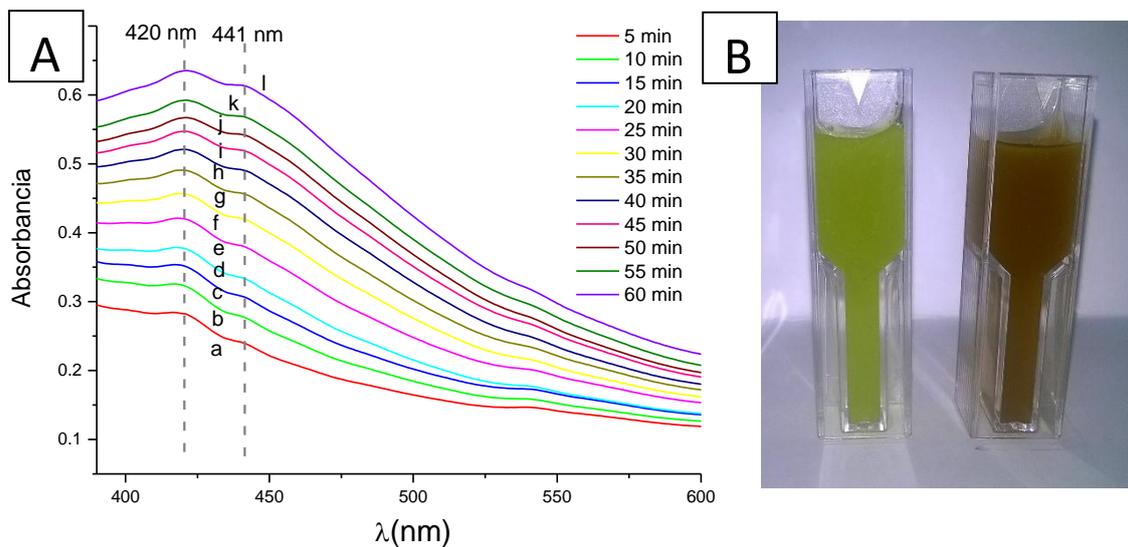


Figura 12. Seguimiento espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis de AgNP's Fx1: A) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a AgNP's en función del tiempo de reacción (5-60 min), B) Cambio de coloración de la reacción (Izquierda, reacción inicial, derecha, reacción final).

Posteriormente al análisis UV-Vis realizado se procedió a enviar las muestras para su caracterización microscópica con la finalidad de realizar el análisis morfológico de las AgNP's sintetizadas. Los resultados de la caracterización microestructural mediante TEM nos evidencian la presencia de nanopartículas en la muestra, las cuales además presentan una morfología predominantemente semiesférica y un tamaño promedio de 36.4 nm según el histograma de distribución de tamaño de partícula realizado (Fig. 13 y recuadro)

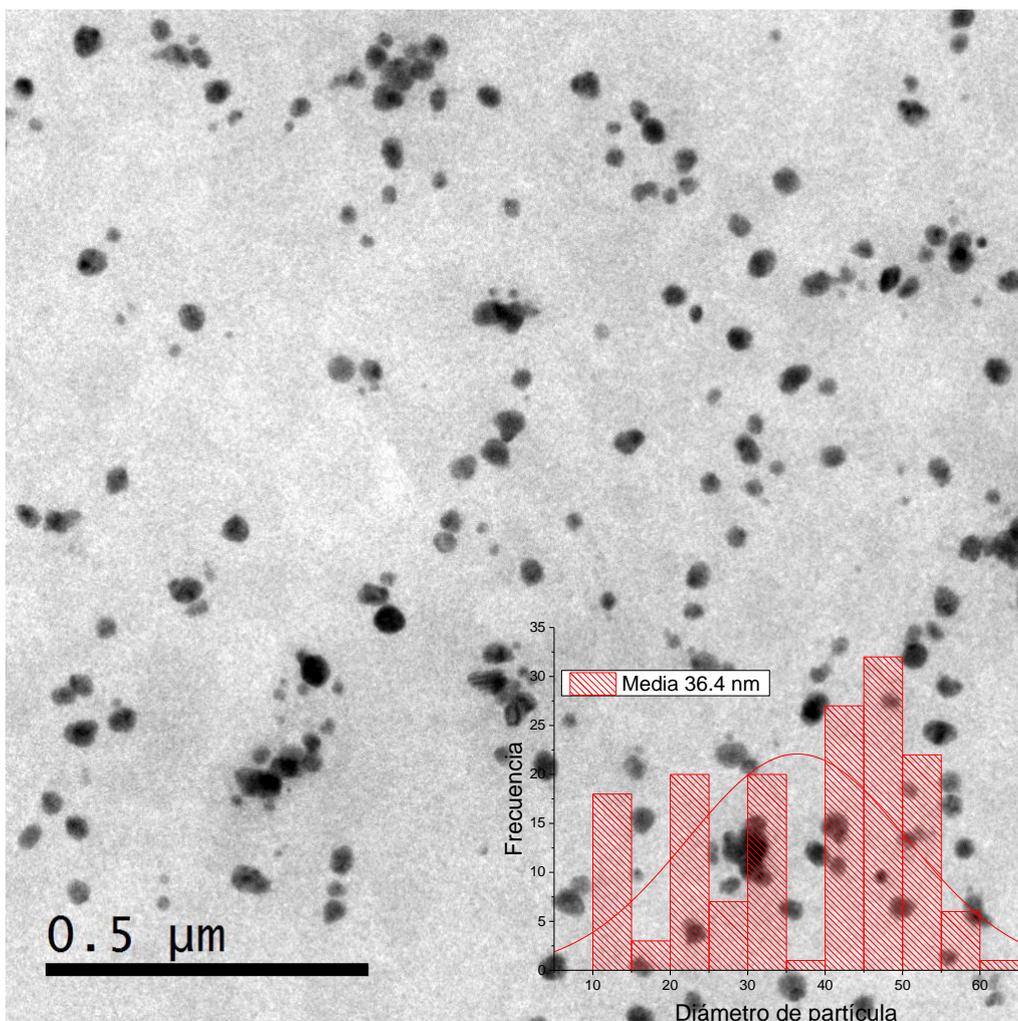


Figura 13. Micrografía TEM de muestra AgNP's sintetizadas Fx1, histograma de la distribución de tamaño de partícula (inserto).

### 5.3. Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas de cobre

El procedimiento para realizar la de CuNP's se llevó a cabo de manera similar a la síntesis de las AgNP's, utilizando las propiedades reductoras del extracto acuoso de *Agave potatorum* (denominado Fx1). Este extracto fue adicionado a la solución acuosa de CuCl<sub>2</sub> 10 mM, siguiendo cuidadosamente los cambios en el reactor, de forma visual y posteriormente mediante espectrofotometría UV-Vis como se detalla a continuación:

- a) *Extracto acuoso Fx1*: La síntesis biogénica de las nanopartículas de cobre se realizó mediante el extracto crudo (Fx1) de *A. potatorum* funcionando como

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

agente bioreductor y estabilizante [123], los metabolitos que se encuentran presentes en el Agave mencionados anteriormente (azúcares, aminoácidos, fenoles, saponinas y terpenoides) [20-25] permiten la reducción de los iones  $\text{Cu}^{+2}$ . Inicialmente la síntesis de CuNP's se manifiesta mediante el cambio de coloración de la solución de cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) la cual inicia de una coloración verde oscuro y posteriormente adquiere una coloración verde esmeralda, este cambio nos indica una reducción de los iones  $\text{Cu}^{+2}$  a su forma metálica elemental  $\text{Cu}^0$ , generando probables sitios de nucleación con su posterior proceso de crecimiento para formar las nanopartículas de cobre (CuNP's). El seguimiento detallado de la reacción lo realizamos mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis que nos permite identificar la curva correspondiente a la resonancia del plasmón superficial (RPS) de las nanopartículas de cobre a una longitud de onda superior a 600 nm [126], confirmándonos la presencia de estas nanoestructuras.

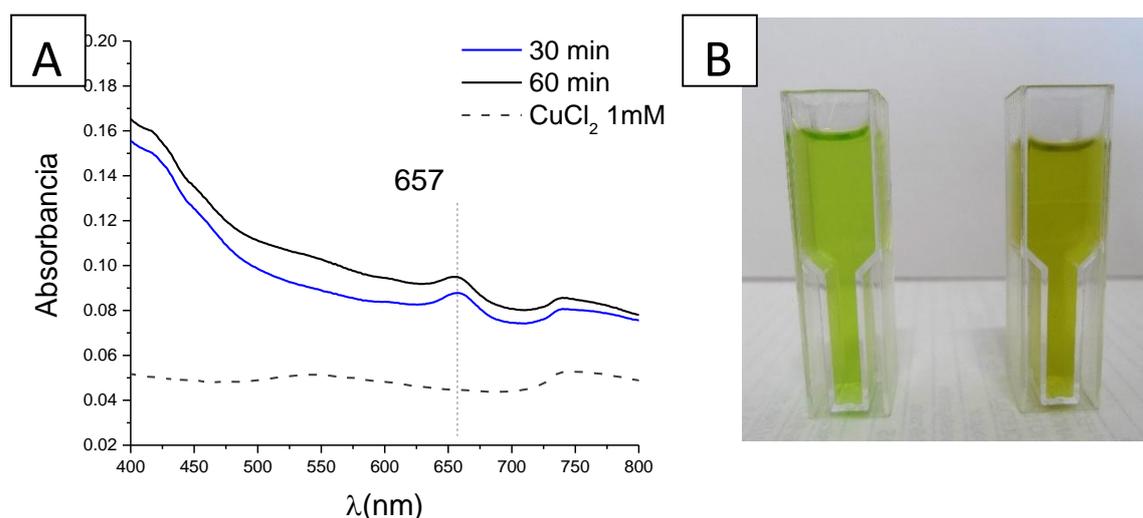


Figura 14. Seguimiento espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis de CuNP's Fx1: A) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a CuNP's en función del tiempo de reacción (30-60 min), B) Cambio de coloración de la reacción (Izquierda, reacción inicial, derecha reacción final).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este fin, el procedimiento lo realizamos extrayendo alícuotas de 1 mL a partir de la reacción, las cuales son aforadas a un volumen de 10 mL, deteniendo la reacción mediante un baño de agua fría inmediatamente, estas alícuotas extraídas fueron finalmente analizadas en el espectrofotómetro UV-Vis para proceder a graficarlas en su conjunto. Como se observa en la figura 14, esta señal de RPS se genera en el minuto 30 (fig. 14-a), presentándose como una sola curva a una longitud de onda de 657 nm la cual aumenta de manera discreta conforme avanza el tiempo de reacción; de esta manera a los 60 min de síntesis (fig. 14-b) la señal se intensifica. Posteriormente al análisis UV-Vis realizado se procedió a enviar las muestras a su caracterización microscópica con la finalidad de realizar el análisis morfológico de las nanopartículas que estamos sintetizando.

Los resultados de la caracterización microestructural mediante TEM nos evidencian la presencia de nanoestructuras sintetizadas en la muestra, las cuales además presentan una morfología predominantemente cúbica o en forma de paralelepípedos y un tamaño en un rango de 50 a 200 nm (Fig. 15).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

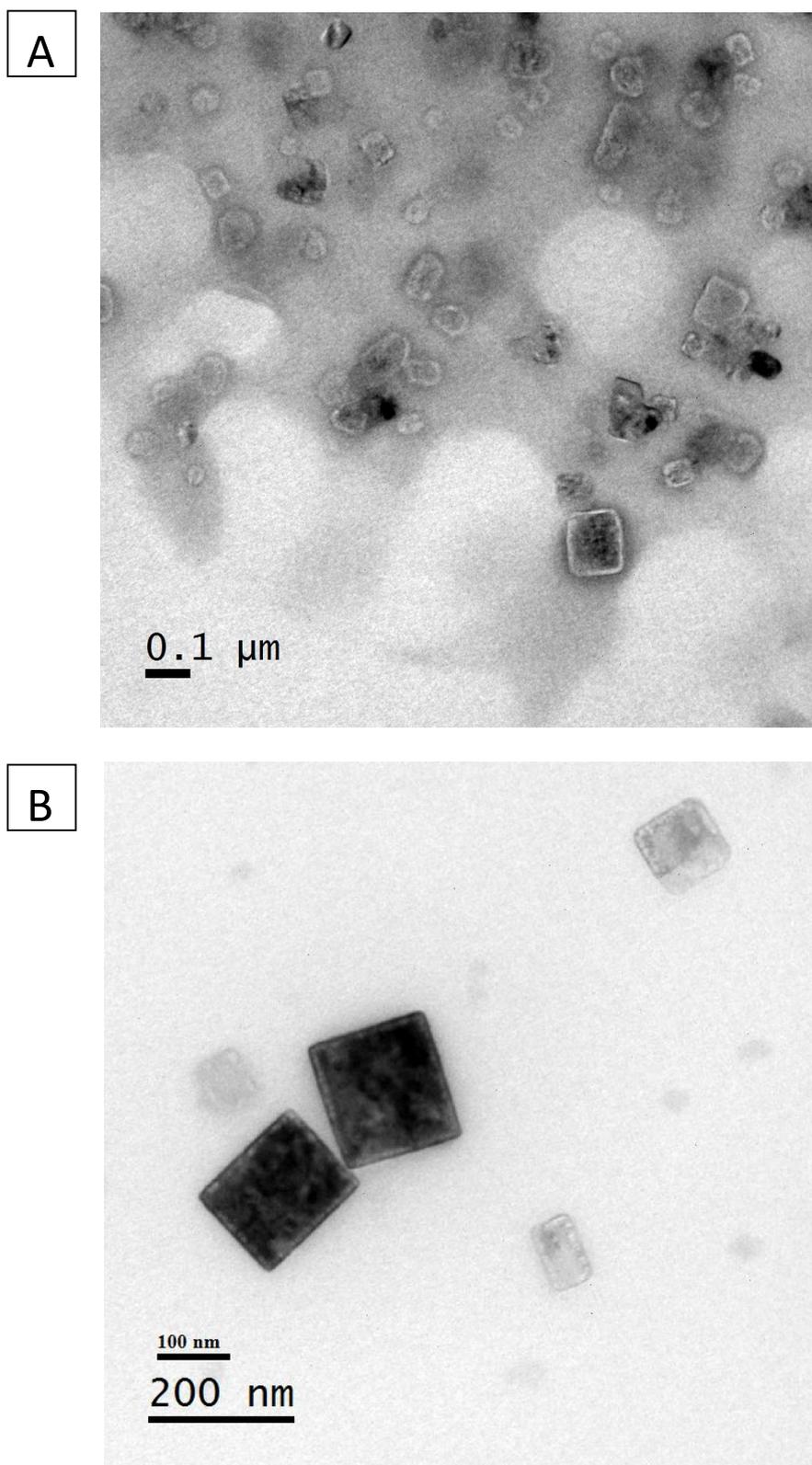


Figura 15. Micrografías TEM de muestra CuNP's sintetizadas Fx1

#### 5.4. Síntesis biogénica de nanopartículas metálicas de oro

El proceso de síntesis se llevó a cabo aprovechando por separado las propiedades reductoras de 3 extractos provenientes de *Agave potatorum*: un extracto acuoso (denominado Fx1), un extracto etanólico (denominado Fx2) y un extracto hexánico (denominado Fx3) (Fig. 6). Estos tres extractos reductores fueron adicionados a la solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  1 mM, siguiendo cuidadosamente los cambios en el reactor minuto a minuto, de forma preliminar visualmente y posteriormente mediante espectrofotometría UV-Vis:

##### b) Extracto acuoso Fx1:

La síntesis biogénica de las nanopartículas de oro se realizó en primera instancia utilizando el extracto acuoso (Fx1) de *A. potatorum* funcionando como agente bioreductor y estabilizante [123], los metabolitos que se encuentran presentes en el Agave (azúcares, aminoácidos, fenoles, saponinas y terpenoides) [20-25] permiten la reducción de los iones  $\text{Au}^{+3}$ . Inicialmente la síntesis de AuNP's se manifiesta mediante el cambio de coloración de la solución de Ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) la cual vira súbitamente de color amarillo a violeta, a los pocos segundos (entre 20 y 30) de entrar en contacto los reactantes entre sí ( $\text{HAuCl}_4$  y extracto Fx1), este cambio nos indica una reducción rápida de los iones  $\text{Au}^{+3}$  a su forma metálica elemental  $\text{Au}^0$ , generando probables sitios de nucleación con su posterior proceso de crecimiento para formar las nanopartículas de oro (AuNP's). Para corroborar la formación de las AuNP's se utilizó un láser rojo con la finalidad de hacer patente el efecto Tyndall [127] (el cual evidencia la presencia de partículas de tipo coloidal presente en disoluciones, las cuales dispersan la luz recibida, visibilizando la trayectoria del haz de luz) (Fig. 16). El seguimiento

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

detallado de la reacción lo realizamos mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis que nos permite identificar la curva correspondiente a la resonancia del plasmón superficial (RPS) de las nanopartículas de oro a una longitud de onda de 540 nm [128], confirmándonos la presencia de estas nanoestructuras.

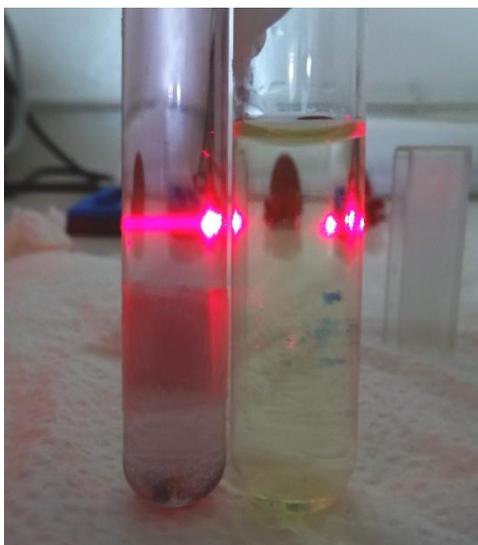


Figura 16. Comparación efecto Tyndall evidenciando el haz de láser y la presencia de partículas coloidales (tubo ensaye izquierda) contra solución 1mM de HAuCl<sub>4</sub> (tubo ensaye derecha)

Para este fin, el procedimiento lo realizamos extrayendo alícuotas de 1 mL a partir de la reacción, las cuales son aforadas a un volumen de 10 mL, deteniendo la reacción mediante un baño de agua fría inmediatamente, estas alícuotas extraídas fueron finalmente analizadas en el espectrofotómetro UV-Vis para proceder a graficarlas en su conjunto. Como se observa en la figura 17, esta señal de RPS inicia en el minuto 2 (fig. 17-a), presentándose como una sola curva bien definida a una longitud de onda de 543 nm la cual se va intensificando conforme avanza el tiempo de reacción; de esta manera a los 4 min de síntesis (fig. 17-b) la señal se intensifica de manera importante, llegando a su punto máximo de absorbancia a los 6 minutos de reacción, después de lo cual observamos un súbito decrecimiento de la curva (8 min, fig. 17-d), siendo esta señal finalmente mucho más amplia,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

además de presentar un ligero corrimiento de 5 nm hacia mayores longitudes de onda (fig. 17-e, f, g).

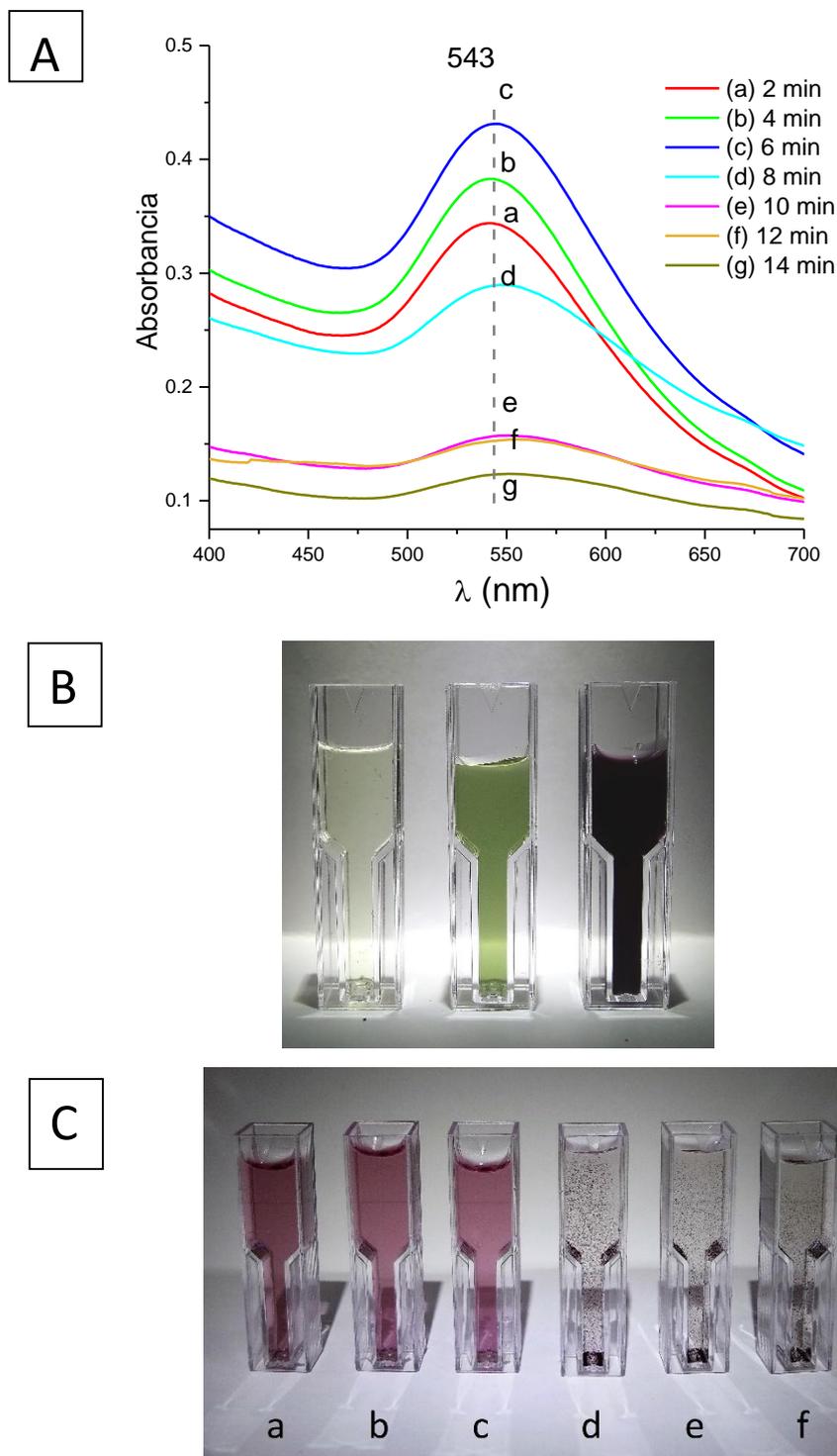


Figura 17. Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis Fx1: A) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a AuNP's en función del tiempo de reacción (2-14 min), B) Cambio de coloración de la reacción ( $\text{HAuCl}_4$  Izquierda, reacción inicial centro, reacción final derecha), C) Proceso de aglomeración después de 8 minutos de reacción cuando no es detenida mediante choque térmico (d, e, f) (Dilución 1:10).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este desplazamiento discreto de la señal UV-Vis que observamos, se presenta hacia longitudes de onda mayores (Fig. 17, d-f) lo cual nos podría estar indicando un proceso de la agregación de nanoestructuras [129], ocurriendo este fenómeno cuando los tiempos de síntesis son superiores a los 8 min de reacción. A continuación, para descartar que la formación de nanopartículas fuera un efecto de la temperatura procedimos a realizar un control, comparando una reacción de síntesis a 6 min contra una solución de  $\text{HAuCl}_4$  1mM sin extracto Fx1 a la misma temperatura (65 °C) y tiempo de reacción (6 min), confirmándonos que la señal RPS no se presenta cuando no se agrega el extracto Fx1 (Fig. 18).

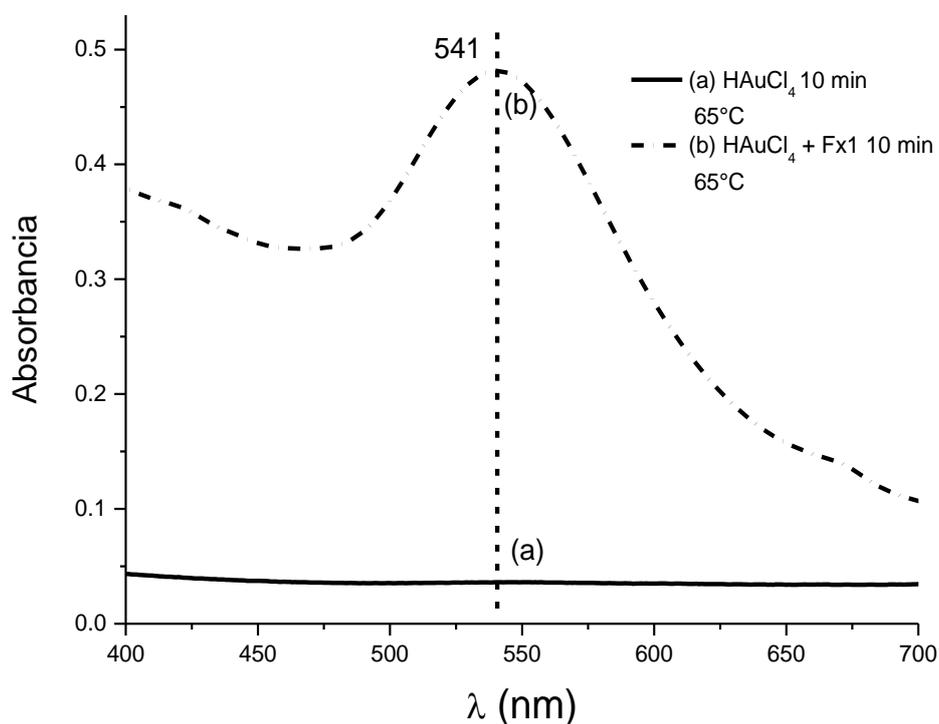


Figura 18. Control UV-Vis de la síntesis Fx1: a) Solución de  $\text{HAuCl}_4$  a 65 °C durante 6 minutos (Control negativo), b) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a AuNP's al agregar el extracto Fx1 a la solución de  $\text{HAuCl}_4$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posteriormente al análisis UV-Vis realizado se procedió a enviar las muestras a su caracterización microscópica con la finalidad de realizar el análisis morfológico de las nanopartículas que estamos sintetizando.

Los resultados de la caracterización microestructural mediante TEM nos evidencian una considerable cantidad de nanopartículas sintetizadas en la muestra, las cuales además presentan una morfología predominantemente semiesférica y un tamaño promedio de 14.3 nm según el histograma de distribución de tamaño de partícula realizado (Fig. 19 A y recuadro). La técnica de HRTEM (Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución) nos proporcionó evidencia del rearrreglo atómico de los átomos de oro en las caras observables de las nanopartículas sintetizadas. Una vez que pudimos corroborar mediante las micrografías generadas mediante las técnicas de microscopía electrónica la morfología y tamaño de los nanomateriales presente en nuestra muestra, procedimos a realizar el análisis microestructural correspondiente que nos proporcionara evidencia de la naturaleza metálica de nuestras AuNP's, esto mediante dos técnicas, determinando por una parte el patrón de difracción electrónica de área seleccionada (SAED) y por otro lado realizando el análisis mediante una técnica no destructiva de materiales cristalinos como lo es la difracción de rayos X (XRD).

Con este fin procedimos a centrifugar 5 mL de la reacción para formar un pellet y secarlo, esta muestra bajo el análisis de difracción de rayos X (XRD) nos proporcionó el difractograma correspondiente, señalando la presencia de estructuras cristalinas de oro metálico con la configuración cúbica centrada en las caras (FCC) lo cual se hace evidente al observar en este difractograma las señales correspondientes a los planos [111], [200], [220], [311] y [222], denotando

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ángulos  $2\theta$  de  $38.201^\circ$ ,  $44.401^\circ$ ,  $64.601^\circ$ ,  $77.598^\circ$  y  $81.756^\circ$ , según la carta cristalográfica Au (JCPDS 001-2616) (Fig. 20).

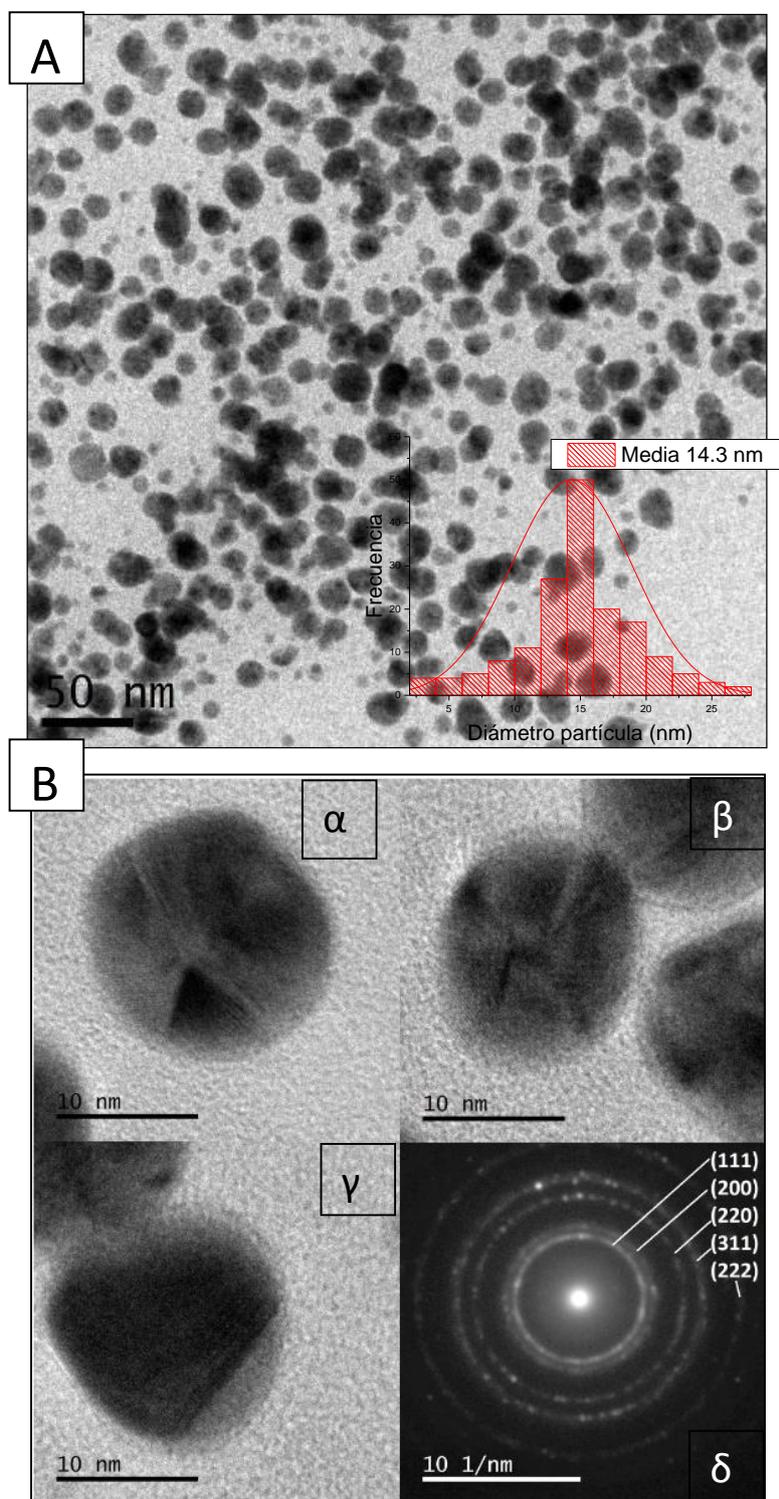


Figura 19. Caracterización microestructural de las AuNP's sintetizadas Fx1: A) Micrografía TEM de muestra Fx1, Histograma de la distribución de tamaño de partícula (inserto) B)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ - HRTEM de algunas AuNP's mostrando detalles del arreglo atómico,  $\delta$ ) SAED mostrando los planos correspondientes a la fase cúbica centrada en las caras de la muestra seleccionada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

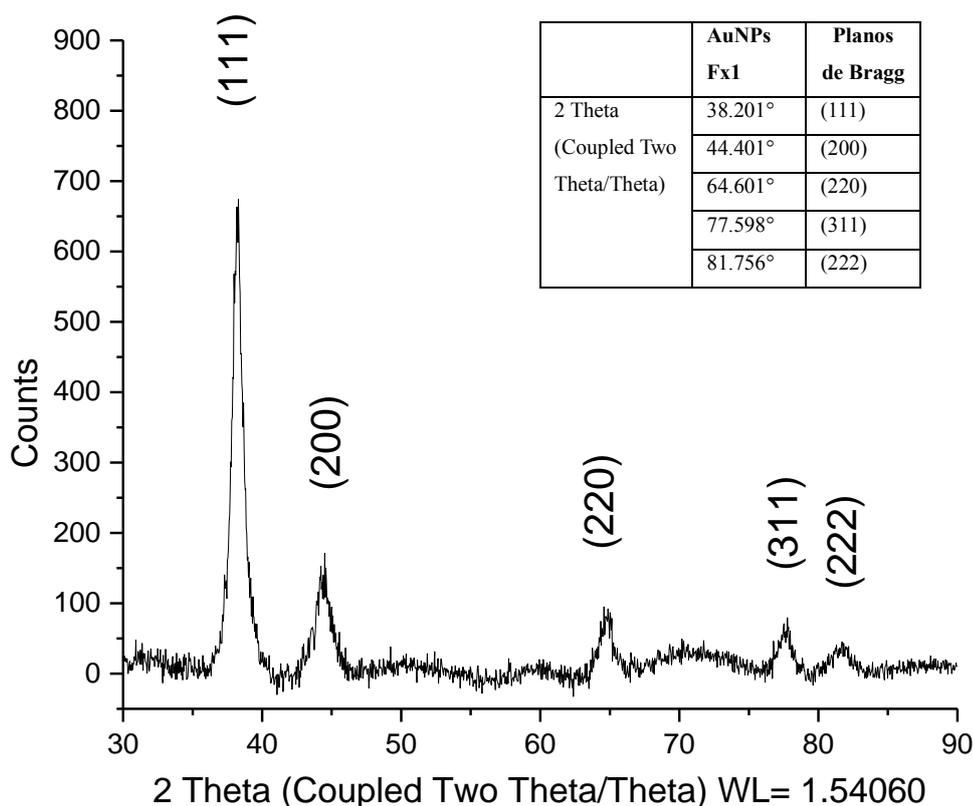


Figura 20. Patrón XRD correspondiente a AuNP's sintetizadas Fx1.

### c) *Extracto etanólico (Fx2):*

En segunda instancia, una vez que confirmamos la actividad reductora del primer extracto utilizado para la síntesis de AuNP's (Fx1), procedimos a repetir el procedimiento de esta técnica de síntesis cambiando el extracto utilizado, para lo cual empleamos en este caso el extracto etanólico de *A. potatorum* como agente bioreductor (Fx2). Después de agregar el extracto etanólico a la solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  se efectuó el seguimiento de la reacción mediante el análisis espectrofotométrico UV-Vis, extrayendo de la síntesis esta vez alícuotas a 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min de reacción (Fig. 21A), estas alícuotas una vez más fueron aforadas a 10 mL y colocadas en un baño refrigerante para detener la reacción,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

procediendo posteriormente a su lectura en el espectrofotómetro. Los datos obtenidos de cada alícuota fueron graficados mediante el programa OriginLab y observamos en esta gráfica la formación de la señal correspondiente a la resonancia del plasmón superficial de nanopartículas de oro a una longitud de onda de 537 nm [128]. Esta señal generada se intensifica conforme avanza el tiempo, iniciando en este caso el viraje de color a los 10 minutos de reacción (Fig. 21A), simultáneamente la reacción con este extracto Fx2 presenta diferencias importantes con la que realizamos previamente mediante el extracto Fx1 ya que el cambio de coloración no se presenta de manera súbita sino de forma gradual después de 7 minutos de reacción, aunado a lo cual observamos que la curva RPS se intensifica de manera constante conforme avanza el tiempo, aumentando su absorbancia y no tiende a desplazarse a longitudes de onda mayores, además de que no se observa la presencia de sedimentos en la parte inferior del reactor. Así mismo la coloración final de la reacción tiende a ser más intensa que mediante el extracto Fx1.

A continuación, para descartar que la formación de nanopartículas fuera un efecto de la temperatura procedimos a realizar un control, comparando una reacción de síntesis a 90 min contra una solución de  $\text{HAuCl}_4$  1mM sin extracto Fx2 a la misma temperatura (65 °C) y tiempo de reacción (90 min), confirmándonos que la señal RPS no se presenta cuando no se agrega el extracto Fx2 (Fig. 22).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

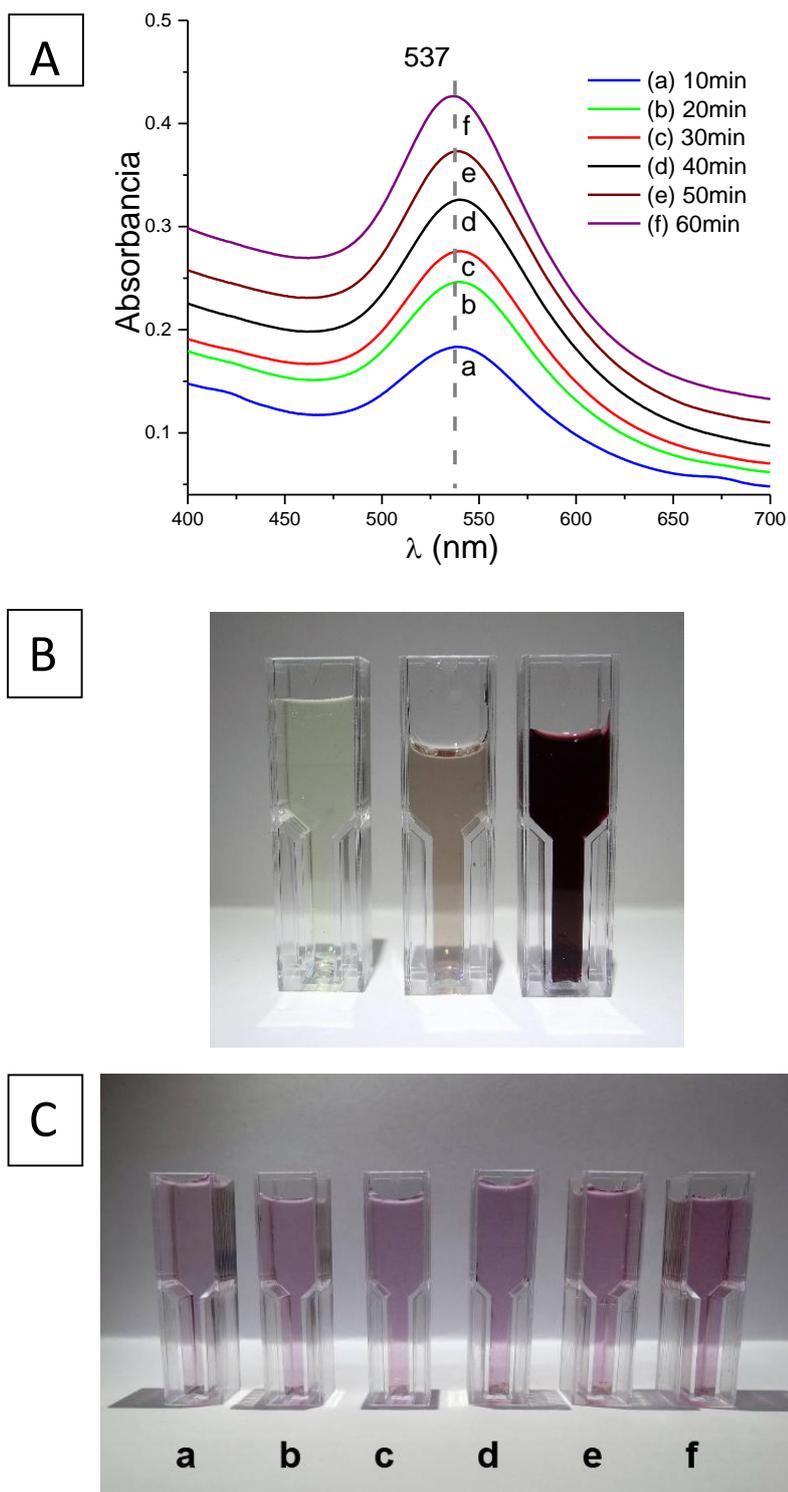


Figura 21. Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis Fx2: A) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a AuNP's en función del tiempo de reacción (10-60 min), B) Cambio de coloración de la reacción ( $\text{HAuCl}_4$  Izquierda, reacción inicial centro, reacción final derecha). C) Desarrollo de la reacción mostrando que no existe proceso de aglomeración cuando la síntesis no es detenida mediante choque térmico. (Dilución 1:10)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

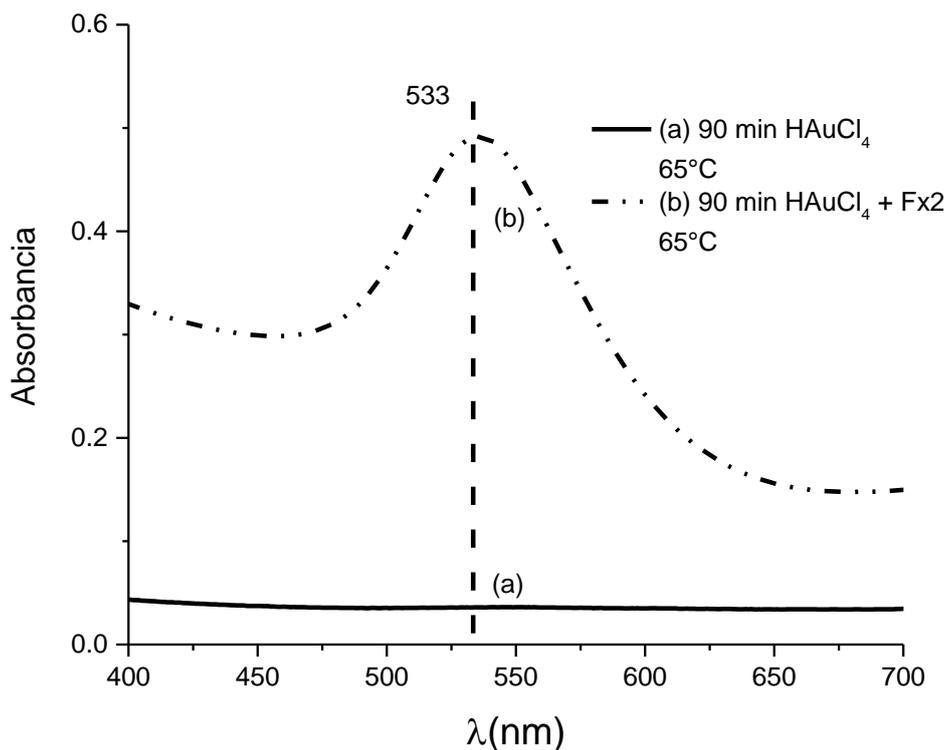


Figura 22. Control UV-Vis de la síntesis Fx2: a) Solución de HAuCl<sub>4</sub> a 65 °C durante 90 minutos (Control negativo), b) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a AuNP's al agregar el extracto Fx2 a la solución de HAuCl<sub>4</sub>.

A continuación, para corroborar la morfología y cantidad sintetizada de AuNP's en la muestra, se procedió nuevamente a realizar un análisis microestructural mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM). El resultado observado en las micrografías generadas difiere en aspectos importantes de la muestra Fx1, siendo los más relevantes los siguientes aspectos; en primer lugar existe una diferencia significativa en la cantidad de nanopartículas sintetizadas, además de variar en las morfologías presentes en la muestra y por último el tamaño de las nanopartículas sintetizadas (Fig. 23). Profundizando el análisis sobre estas variaciones tenemos que en esta síntesis realizada utilizando el extracto Fx2 la cantidad es aproximadamente la mitad de las que se sintetizaron con el extracto Fx1; el segundo punto importante corresponde a la morfología ya que en esta síntesis se observan figuras más bien poliédricas, presentándose

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

principalmente geometrías icosaédricas y decaédricas, aunque también se observan figuras trigonales aplanadas (Fig. 23 B recuadros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Por último se observa que con este extracto el tamaño de nanopartícula obtenida (en promedio) según el histograma de distribución de tamaño de partícula generado es de 36 nm (Fig. 23A, inserto).

Una vez que pudimos corroborar mediante las micrografías generadas la morfología y tamaño de los nanomateriales presentes en nuestra muestra, se procedió a realizar una vez más el análisis microestructural correspondiente que nos evidencia de la naturaleza metálica de las AuNP's sintetizadas, determinando tanto el patrón de difracción electrónica de área seleccionada (SAED), así como generando el difractograma respectivo la difracción de rayos X (XRD).

Para llevar a cabo este estudio procedimos a centrifugar 5 mL de la reacción para constituir un pellet y posteriormente secarlo, esta muestra nos proporcionó el difractograma de rayos X (XRD) correspondiente señalando la presencia de estructuras cristalinas de oro metálico con la configuración cúbica centrada en las caras (FCC) lo cual se hace demuestrado al observar en este difractograma las señales correspondientes a los planos [111], [200], [220], [311] y [222], denotando ángulos  $2\theta$  de  $38.192^\circ$ ,  $44.250^\circ$ ,  $64.673^\circ$ ,  $77.668^\circ$  y  $82.038^\circ$ , según la carta cristalográfica Au (JCPDS 001-2616) (Fig. 24 B).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

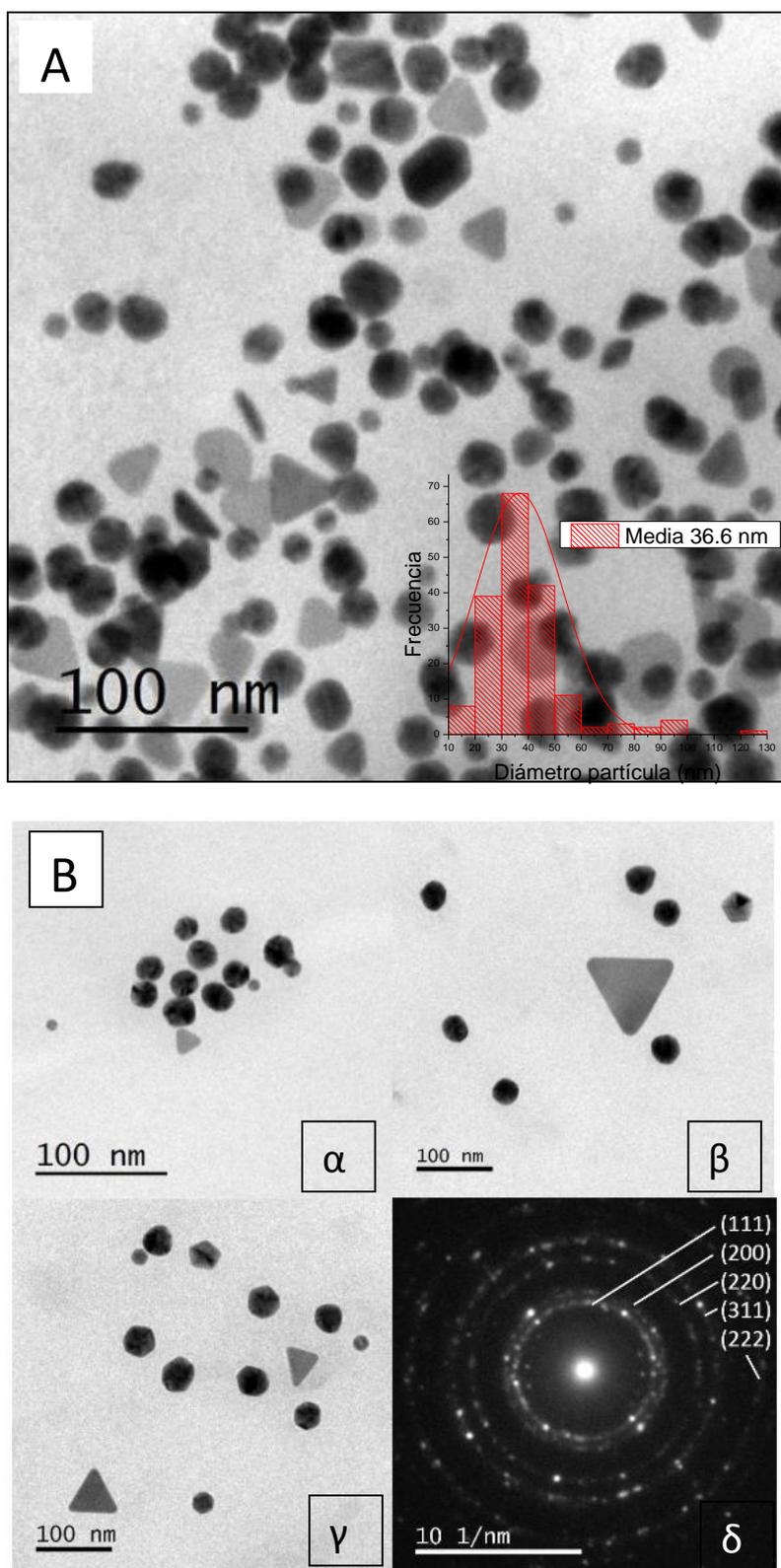


Figura 23. Caracterización microestructural de las AuNP's sintetizadas Fx2: A) Micrografía TEM de muestra Fx2, Histograma de la distribución de tamaño de partícula (inserto) B)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -TEM de algunas AuNP's mostrando detalles de las morfologías presentes,  $\delta$ ) SAED mostrando los planos correspondientes a la fase cúbica centrada en las caras de la muestra seleccionada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

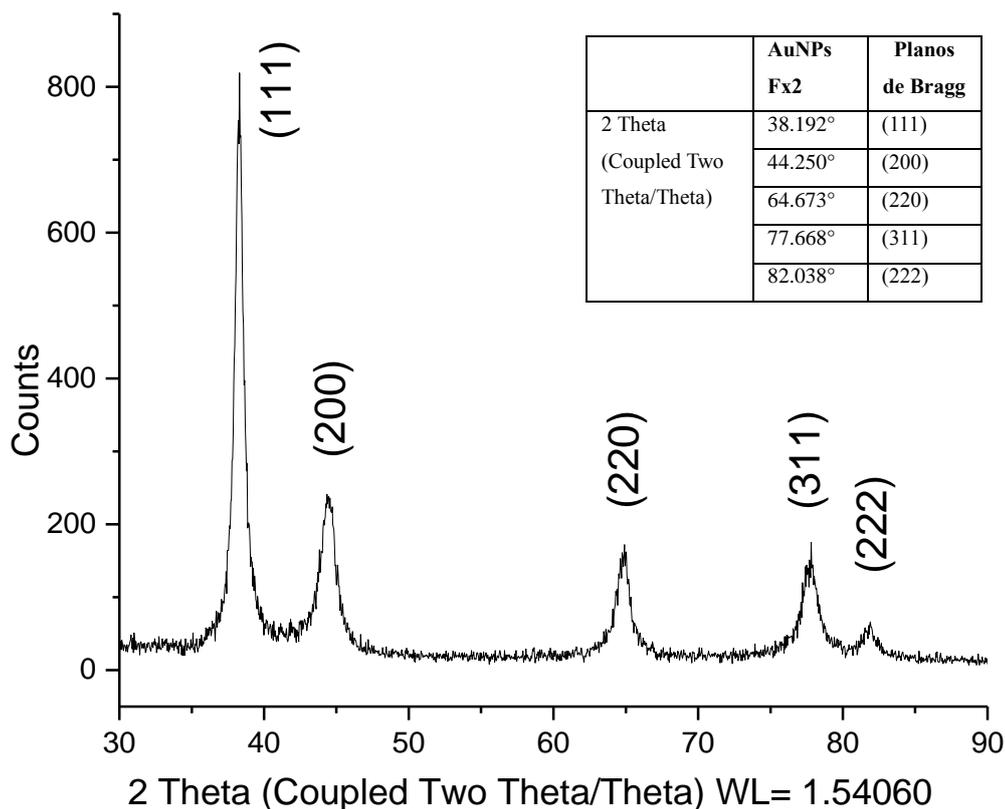


Figura 24. Patrón XRD correspondiente a AuNP's sintetizadas Fx2

### d) *Extracto hexánico (Fx3):*

El tercer proceso de síntesis biogénica de AuNP's llevado a cabo se realizó mediante un tercer solvente, utilizando el extracto hexánico (Fx3) obtenido previamente por elución en columna cromatográfica. Inicialmente en esta reacción la formación de AuNP's se evidenció mediante el cambio de coloración de la solución de  $\text{HAuCl}_4$  virando en este caso muy gradualmente de color amarillo claro a color salmón, este vire de coloración fue la señal visual que utilizamos como indicador para la evidencia de la reducción de los iones  $\text{Au}^{+3}$  a su forma metálica elemental  $\text{Au}^0$ , con su posterior proceso de nucleación seguido de su agregación para formar las AuNP's (Fig. 25).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo nuestro proceso de monitoreo previo de la síntesis se extrajeron de la reacción esta vez alícuotas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 min de síntesis (Fig. 25A), estas alícuotas fueron aforadas a 10 mL y detenidas en un baño refrigerante para continuar con su lectura en el espectrofotómetro UV-Vis y posteriormente graficados en el programa OriginLab. La gráfica obtenida de este proceso nos muestra la formación de la curva correspondiente a la resonancia del plasmón superficial (RPS) de las AuNP's a una longitud de onda de 547 nm.

Como se observa en la fig. 25 A-a, esta señal se presenta de forma apenas perceptible a los 10 min de reacción, a los 20 minutos se observa ya como una curva muy amplia pero más definida (Fig. 25 A-b), esta señal se continua intensificando conforme transcurre el tiempo de reacción en los intervalos de 30, 40, 50 y 60 minutos, definiéndose principalmente a partir los 70 minutos, donde ya se presenta con una forma parecida a las anteriores síntesis que realizamos (AuNP's Fx1 y AuNP's Fx2), aunque es importante señalar que la curva obtenida presenta una amplitud mayor a la señal que fue generada en las síntesis anteriores (AuNP's Fx1 y AuNP's Fx2), esta señal continua aumentando en su valor de absorbancia hasta los 90 minutos (Fig. 25 A-i), tiempo en el cual fue detenida la síntesis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

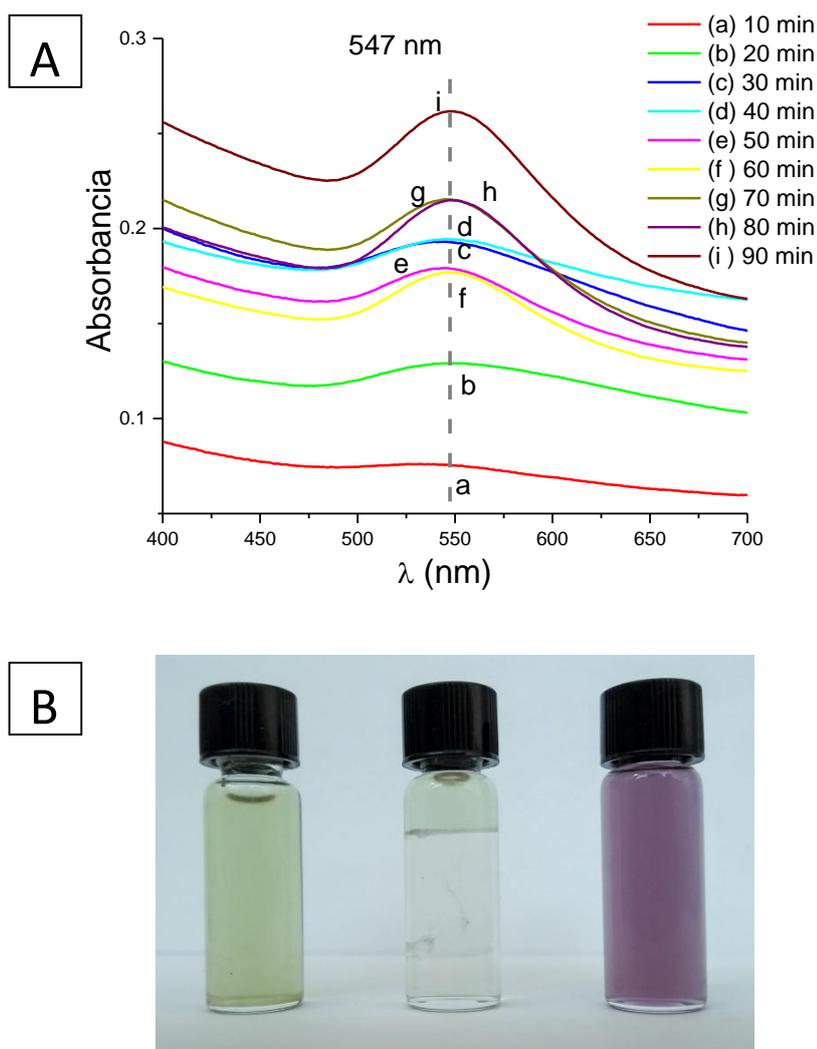


Figura 25. Seguimiento visual y espectrofotométrico UV-Vis de la síntesis Fx3: A) Formación de la señal correspondiente a la RPS perteneciente a AuNP's en función del tiempo de reacción (20-90 min), B) Cambio de coloración de la reacción ( $\text{HAuCl}_4$  Izquierda, reacción inicial centro, reacción final derecha)

Las AuNP's sintetizadas a 90 min (Máxima señal de absorbancia) fueron caracterizadas mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (MET). Es interesante resaltar que en esta síntesis la variación de tamaño se concentra únicamente en dos poblaciones de partículas con tamaños de 6 y 20 nm respectivamente, según el histograma de distribución de tamaño de partícula generado (Fig. 26, inserto), lo cual no se había observado en las síntesis mediante los extractos anteriores Fx1 y Fx2. La morfología predominante en esta síntesis Fx3 es esférica (Fig. 26B).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

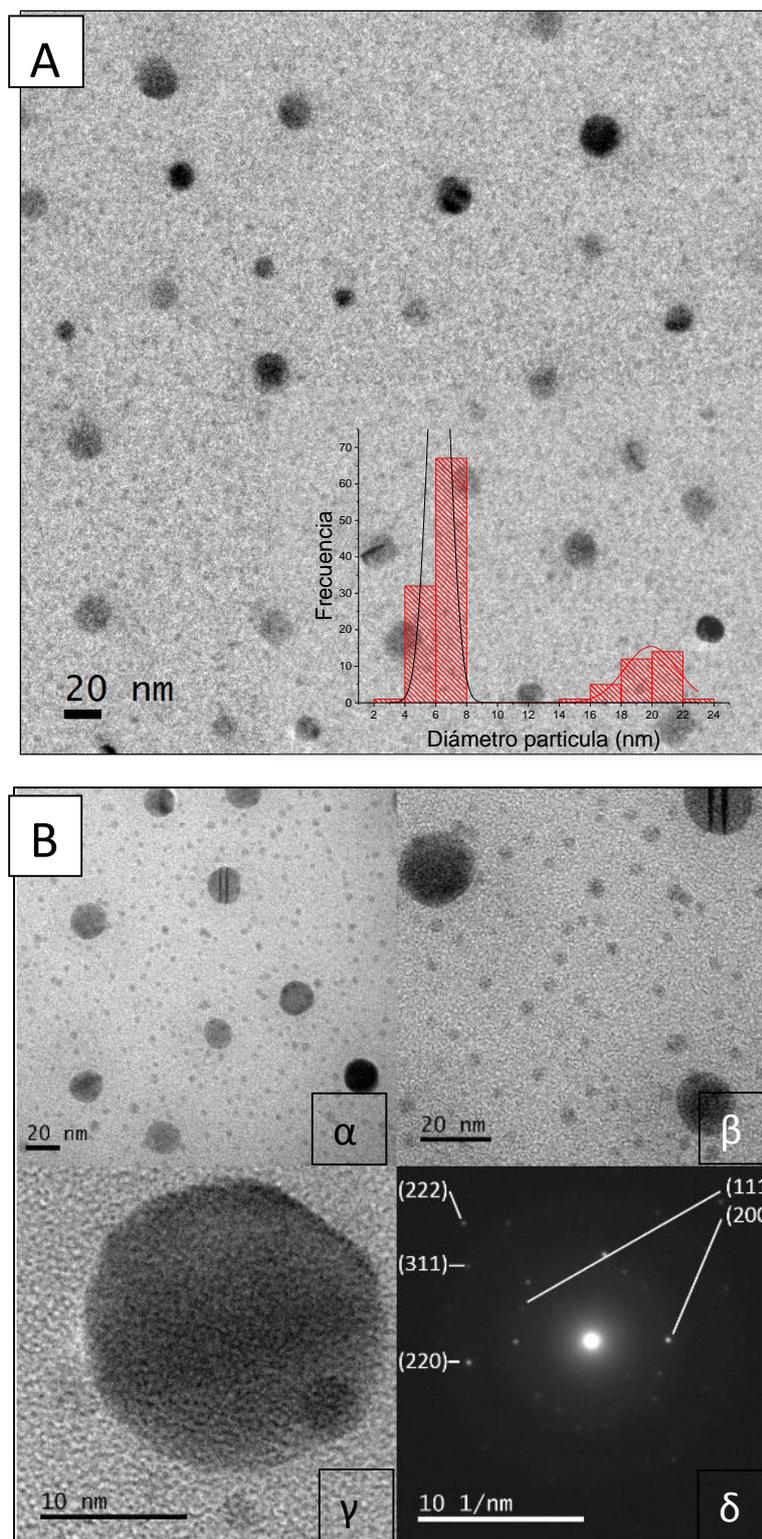


Figura 26. Caracterización microestructural de las AuNP's sintetizadas Fx3: A) Micrografía TEM de muestra Fx3, Histograma de la distribución de tamaño de partícula (inserto) B)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ - Acercamiento de algunas AuNP's sintetizadas mostrando detalles de su estructura,  $\delta$ ) SAED mostrando los planos correspondientes a la fase cúbica centrada en las caras de la muestra seleccionada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación de corroborar la morfología y tamaño de los nanomateriales sintetizados en nuestra muestra mediante las micrografías TEM, se procedió a realizar una vez más el análisis microestructural correspondiente que nos proporciona información sobre la naturaleza metálica de las AuNP's sintetizadas, determinando tanto el patrón de difracción electrónica de área seleccionada (SAED) (Fig. 26 D  $\delta$ ), así como generando el difractograma respectivo la difracción de rayos X (XRD) (Fig. 27).

De manera análoga al procedimiento realizado con las síntesis anteriores, procedimos a centrifugar 5 mL de la reacción Fx3, obteniendo un pellet para posteriormente secarlo, de esta muestra se obtuvo el difractograma de rayos X (XRD) correspondiente señalando la presencia de estructuras cristalinas de oro metálico con la configuración cúbica centrada en las caras (FCC) lo cual se hace patente al observar en este difractograma las señales correspondientes a los planos [111], [200], [220], [311] y [222], denotando ángulos  $2\theta$  de  $38.316^\circ$ ,  $44.486^\circ$ ,  $64.811^\circ$ ,  $77.778^\circ$  y  $81.737^\circ$ , según la carta cristalográfica Au (JCPDS 001-2616) (Fig. 27).

De esta forma pudimos corroborar que los tres extractos utilizados (Fx1, Fx2 y Fx3) tienen en mayor o menor medida una actividad reductora sobre los iones  $\text{Au}^{+3}$  lo cual genera la nucleación y subsecuente agregación para la formación de nanopartículas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

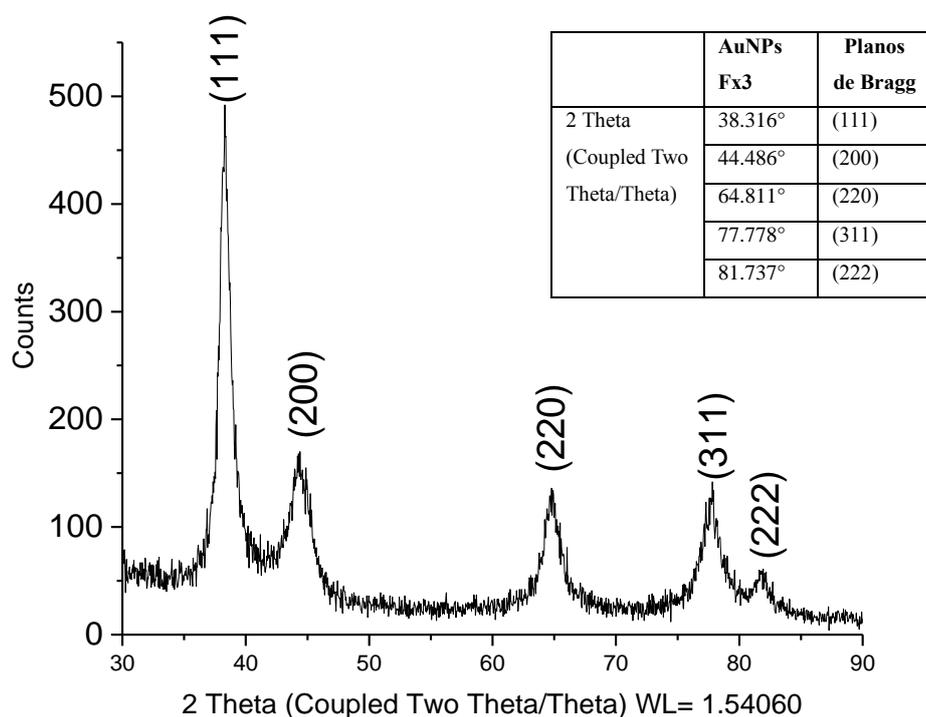


Figura 27. Patrón XRD correspondiente a AuNP's sintetizadas Fx3.

### 5.5. Monitoreo de la estabilidad de nanopartículas de oro

El siguiente análisis que se realizó a las AuNP's sintetizadas fue el monitoreo de su estabilidad ante el paso del tiempo, para lo cual fueron extraídas alícuotas, previamente diluidas 1:10 y almacenadas a 4°C, para realizar su lectura UV-Vis periódicamente. Sin embargo, en la muestra sintetizada mediante extracto Fx1 se observó en repetidas ocasiones que en el interior de la reacción se desarrollaba el crecimiento de una masa gelatinosa probablemente generada por un hongo lo cual además ocasionaba la desestabilización de las nanopartículas de Au (Fig. 28 B), esta desestabilización de las AuNP's fue determinada mediante UV-Vis, al presentarse una curva amplia que se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda mayores después de 90 días de almacenamiento (Fig. 28 A-f). Observando esta interferencia, supusimos que muy posiblemente era ocasionada por microorganismos que se desarrollaban aprovechando

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los compuestos orgánicos presentes en las nanopartículas, por lo cual, con la finalidad de eliminar esta interferencia o contaminación, realizamos una estrategia de repetir las síntesis Fx1 y Fx2 mediante condiciones de esterilidad, filtrando mediante membranas de 40 nm de poro ambos reactantes (HAuCl<sub>4</sub> y extractos), además de esterilizar mediante autoclave todo el material involucrado en la síntesis y posteriormente realizando el procedimiento dentro de una campana de flujo laminar. De esta manera, con las nuevas AuNP's estériles sintetizadas, se realizó el seguimiento a lo largo de 6 meses, efectuando su análisis periódico quincenal mediante espectrofotometría UV-Vis, extrayendo alícuotas en condiciones de esterilidad las cuales fueron desechadas tras su lectura. Este seguimiento lo realizamos con las AuNP's Fx1 y Fx2 ya que son las que fueron realizadas con solventes de una mayor biocompatibilidad (agua y etanol) y por tanto aquellas que tienen un mayor interés para nuestros estudios biológicos. A través de este nuevo análisis observamos diferencias positivas muy importantes, ya que en las AuNP's sintetizadas en esterilidad mediante los extractos Fx1 y Fx2 se mantiene a la misma longitud de onda durante los 6 meses que fue realizado el estudio, de manera que las señales obtenidas prácticamente se superponen como se observa en la figura 29. El seguimiento de la estabilidad de las AuNP's Fx1 nos muestra que desde la primera lectura realizada (24 de mayo 2017), hasta la última (29 de noviembre de 2017) se observa la misma forma de la curva, así como prácticamente la misma intensidad de absorbancia, tal como muestra la figura 29 A, además de presentar la misma coloración durante los 6 meses del análisis (Fig. 29 A, inserto). Por otra parte, el seguimiento que efectuamos en la estabilidad de las AuNP's Fx2 nos señala que en la primera lectura realizada (24 de mayo 2017) la curva generada es un poco más amplia que la realizada en la segunda lectura (31 de mayo 2017), además de que la segunda aumenta prácticamente al doble su absorbancia, este efecto se pudiera interpretar a una actividad residual del extracto reductor Fx2, o a la presencia de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

metabolitos reductores en esta fracción que siguen realizando la síntesis a baja temperatura. A partir de la tercera lectura (13 de junio de 2017) hasta la última (29 de noviembre de 2017) se observa la presencia de la misma forma de la curva, además de presentar la misma intensidad de absorbancia, como muestra la figura 27 B, cambiando ligeramente la tonalidad de la reacción, ya que va adquiriendo un color más rojizo durante los 6 meses del análisis (Fig. 29 B, inserto). Otra diferencia relevante en el almacenamiento de estas nanopartículas se observa en el hecho de que las AuNP's Fx1 tienden a formar una especie de sedimento mientras que las AuNP's Fx2 permanecen suspendidas en la solución (Fig. 30), sin embargo en el caso de las primeras (AuNP's Fx1) es interesante que el efecto de "sedimentación" no ocasiona su agregación irreversible ya que mediante una ligera agitación manual, retoman su forma inicial en suspensión (Fig. 31), lo cual además es corroborado mediante el análisis UV-Vis realizado, donde no se observa alguna modificación de la señal o su disminución significativa en valores de absorbancia (Fig. 29 A).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

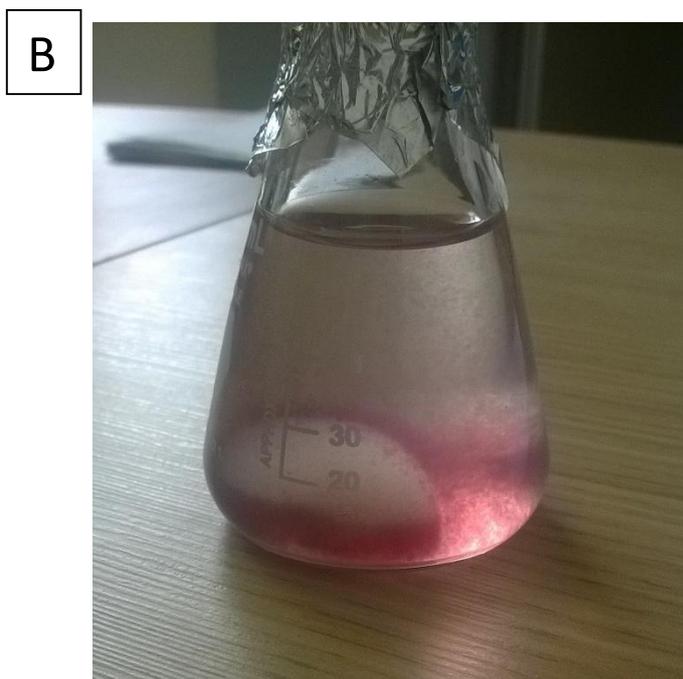
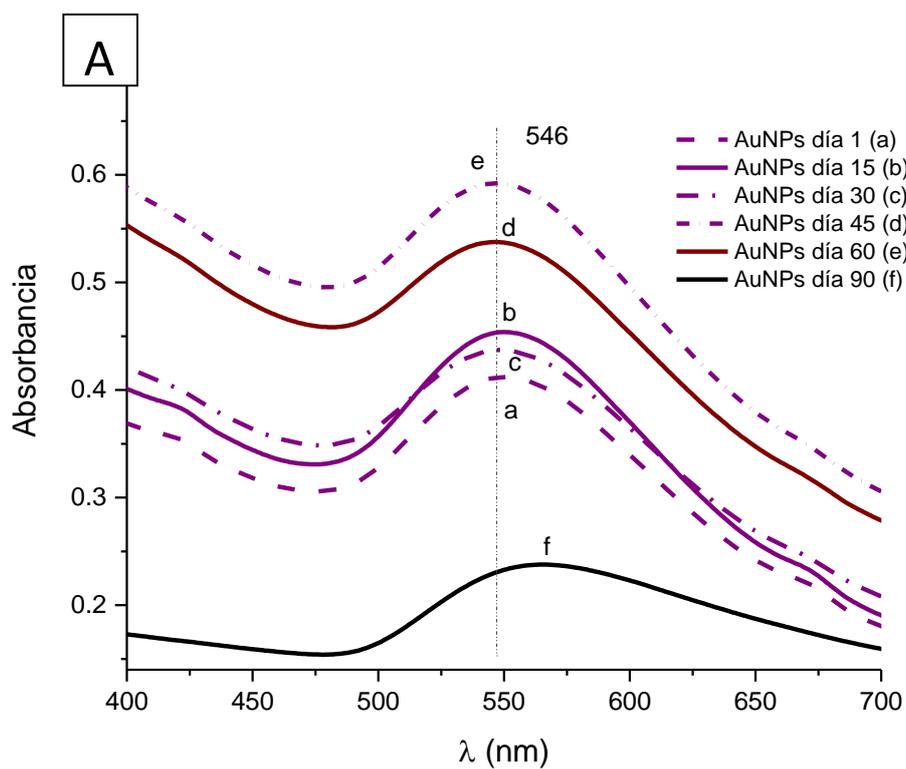


Figura 28. Seguimiento UV-Vis de la estabilidad de las AuNP's Fx1, A) Lecturas UV-Vis de la muestra sintetizada durante 90 días, B) Crecimiento de una masa gelatinosa translúcida en el interior de las AuNP's sintetizadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

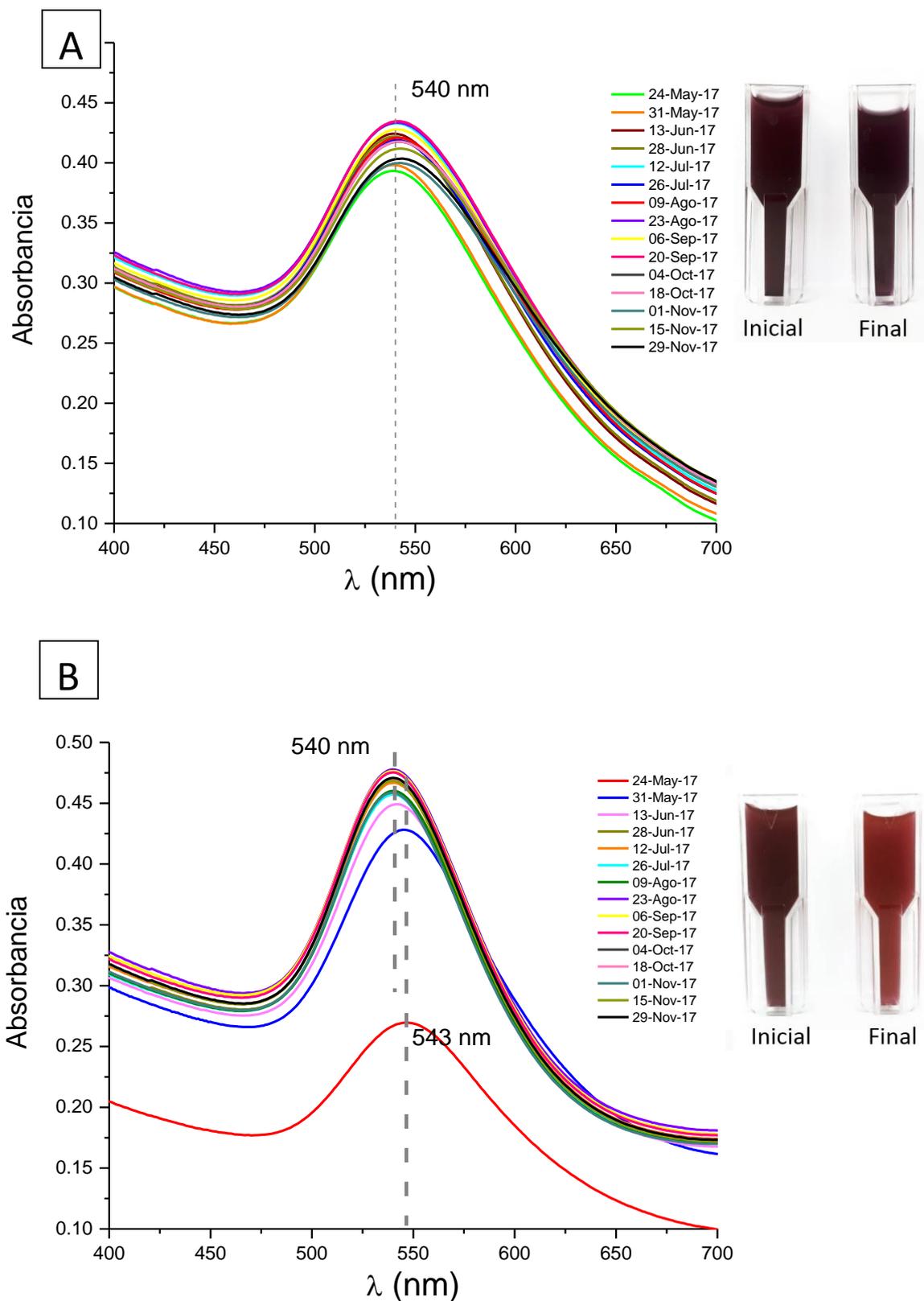


Figura 29. Seguimiento UV-Vis de la estabilidad de las AuNP's sintetizadas durante 180 días. A) AuNP's sintetizadas mediante extracto Fx1 (Inserto: coloración inicial derecha, coloración final izquierda) B) AuNP's sintetizadas mediante extracto Fx2 (Inserto: coloración inicial derecha, coloración final izquierda).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

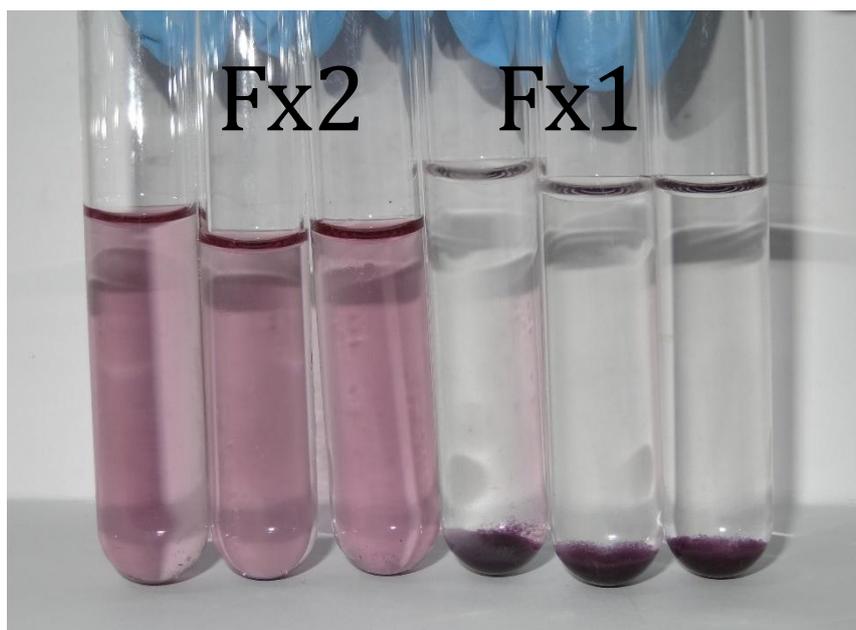


Figura 30. Comparación por triplicado del efecto de almacenamiento de las AuNP's sintetizadas. Síntesis mediante los extractos Fx1 (derecha) donde se presenta sedimentación y Fx2 (Izquierda) donde no se presenta este efecto.

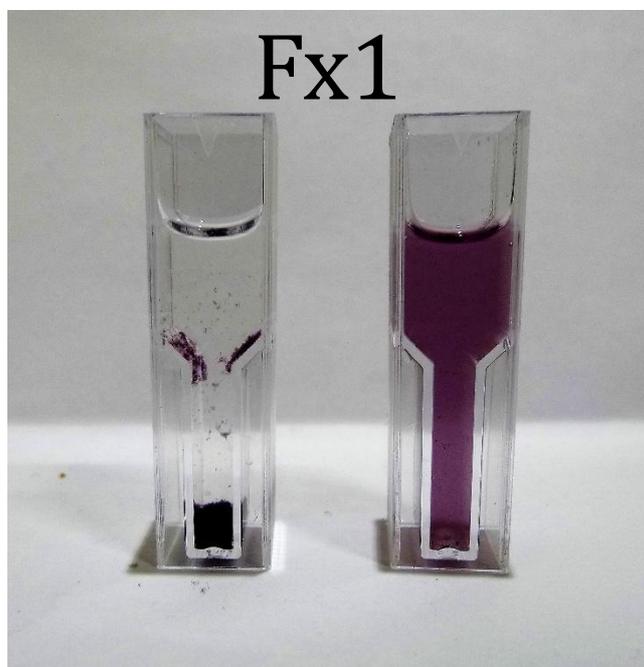


Figura 31. Proceso de resuspensión de AuNP's Fx1. AuNP's sintetizadas mediante extracto Fx1 antes de agitación manual (derecha) y después de agitación manual (Izquierda).

### ***5.6. Elaboración de nanopolvo***

Partiendo de nuestra solución coloidal de AuNP's que sintetizamos mediante los extractos Fx1 y Fx2 se procedió a buscar otra forma de almacenamiento de estos nanomateriales, para ello procedimos a elaborar un nanopolvo con la finalidad de evaluar si era posible restaurar las propiedades de las AuNP's después de almacenarlas en forma sólida sin solvente y posteriormente tratar de resuspenderlas nuevamente en solvente acuoso.

Para realizar estos ensayos se requirió una mayor cantidad de nanopartículas, por lo cual los volúmenes sintetizados para las reacciones AuNP's Fx1 y AuNP's Fx2 fueron aumentados hasta 50 mL para ambas reacciones. Este volumen sintetizado fue posteriormente centrifugado en lotes de tubos ependorff de 2 mL a 12,000 rpm durante 10 minutos en microcentrífuga hasta completar la centrifugación de los 50 mL de cada una de las síntesis realizadas (AuNP's Fx1 y AuNP's Fx2). Una vez acumuladas las nanopartículas en pastillas (Fig. 32 A), procedimos a descartar el sobrenadante y estas pastillas obtenidas se colocaron en un horno de desecación a una temperatura de 50°C hasta su completa deshidratación, tras lo cual se procedió a pulverizar ambas pastillas cuidadosamente en un mortero de agata hasta obtener dos polvos oscuros (Fig. 32 B). Estos nanopolvos obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

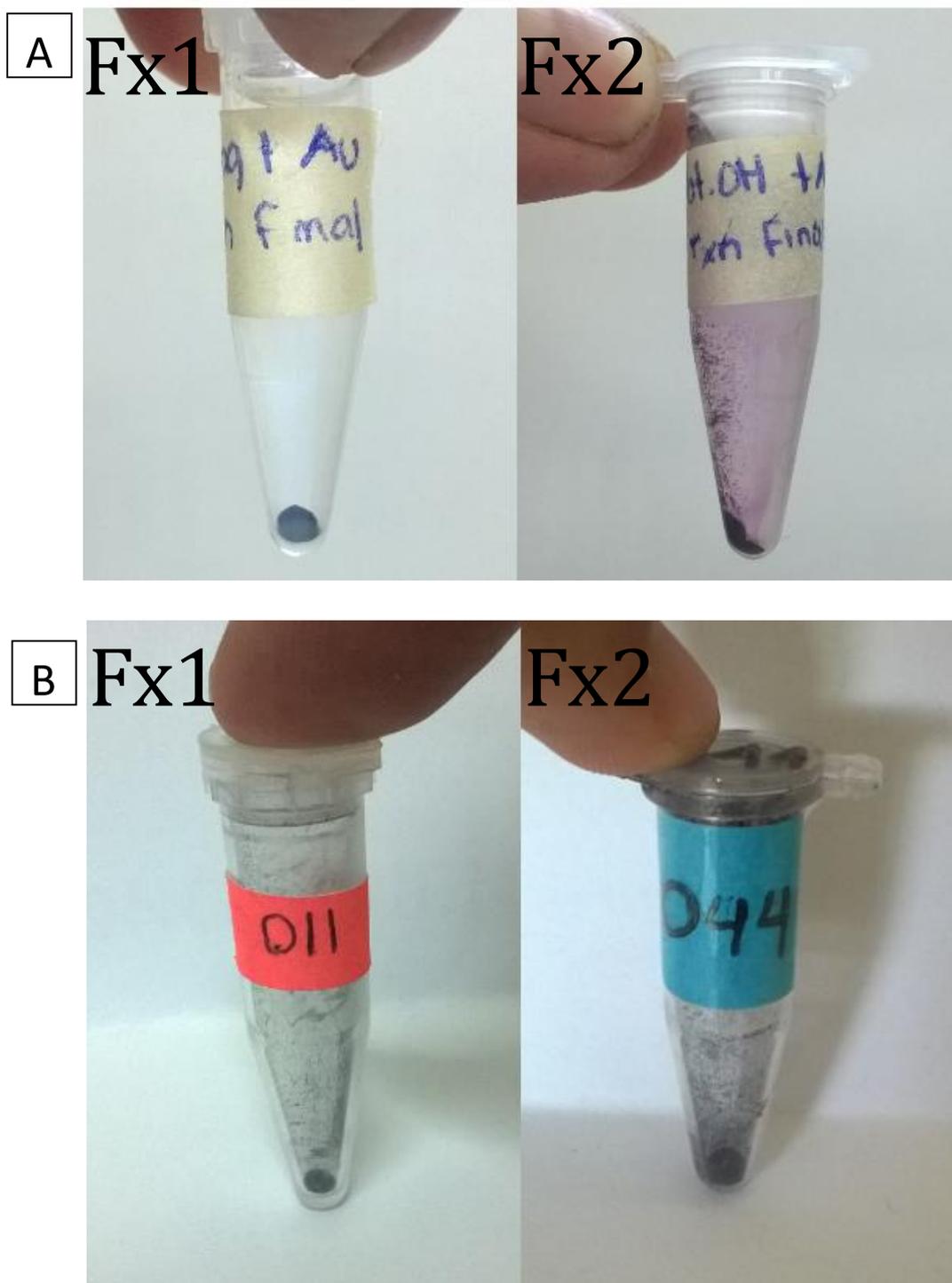


Figura 32. Proceso de elaboración de nanopolvo a partir de las AuNP's sintetizadas mediante extracto Fx1 y Fx2 A) Centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos, B) Secado y pulverización de las pastillas obtenidas.

Una vez obtenidos los nanopolvos de ambas fracciones (Fx1 y Fx2) se continuó con la rehidratación y resuspensión de ambas muestras, procediendo a pesar 0.0196 g de cada

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nanopolvo para resuspender estas nanopartículas en un volumen final de 5 mL y obtener una concentración 10 mM. Ambos nanopolvos resuspendidos en agua tridestilada fueron analizados mediante UV-Vis para su posterior comparación (Fig. 33).

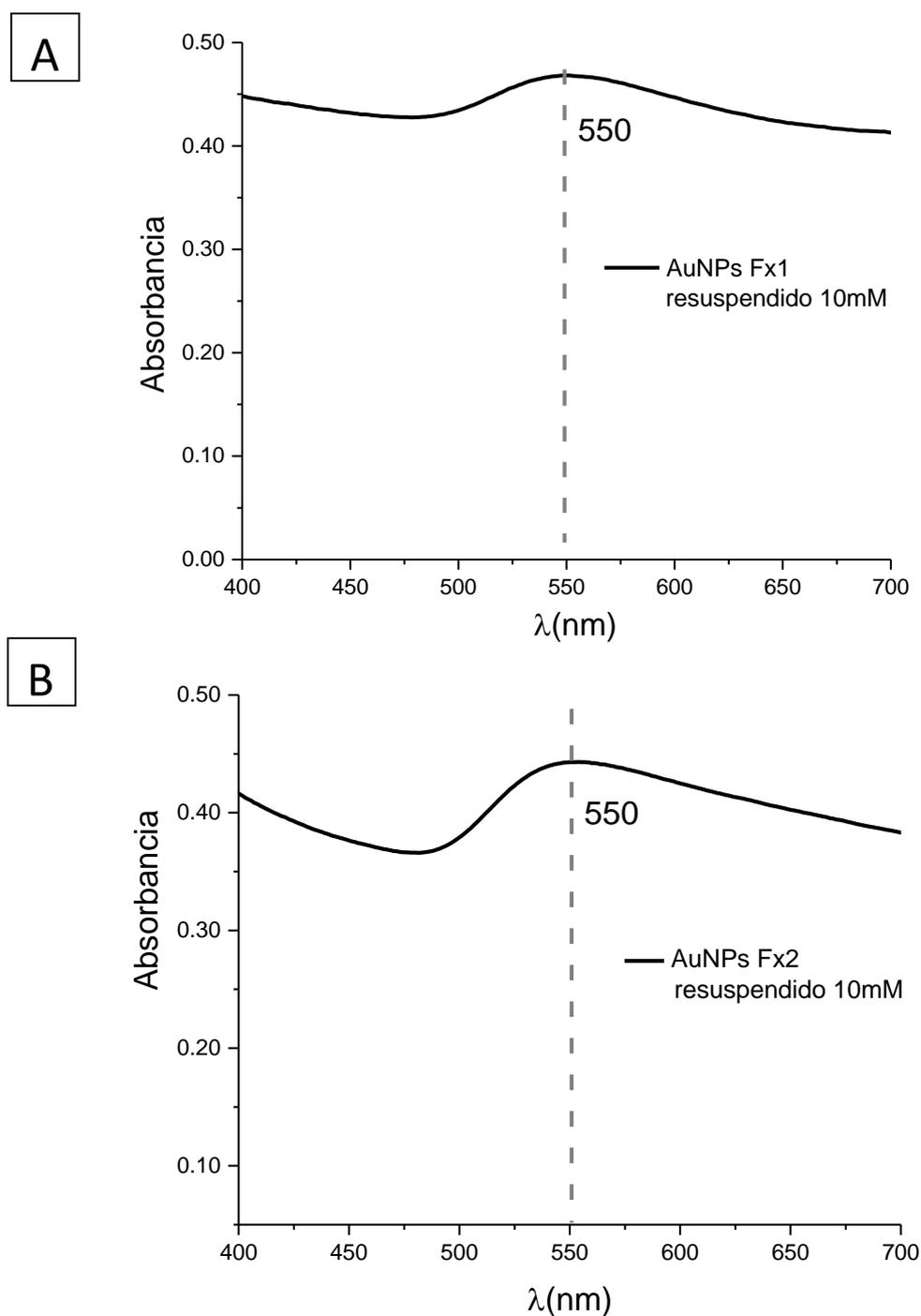


Figura 33. Análisis UV-Vis de los nanopolvos resuspendidos en H<sub>2</sub>O tridestilada a partir de las AuNP's sintetizadas mediante las fracciones Fx1 (A) y Fx2 (B).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este procedimiento nos mostraron mediante la espectrofotometría UV-Vis la presencia de señales a 550 nm, las cuales pueden ser interpretadas como la evidencia de las AuNP's suspendidas nuevamente en el solvente utilizado (H<sub>2</sub>O), aunque las curvas presentes no sean de la misma intensidad y forma a las obtenidas en la síntesis original.

### ***5.7. Soporte de las AuNP's en polímero***

*Ensayos preliminares de liberación controlada:* Para realizar un análisis que nos permitiera evaluar de manera preliminar la capacidad de las AuNP's sintetizadas para ser soportadas en algún compuesto biocompatible del cual puedan ser posteriormente liberadas efectuamos un experimento en el cual se realizaron reacciones de un volumen de 20 mL mediante las fracciones Fx1 y Fx2, a continuación a cada una de estas reacciones procedimos a depositarles 0.1g de un polímero de poliacrilamida altamente higroscópico (Acua-gel®), esperando 3 horas posteriores para garantizar la carga total de las AuNP's en el polímero, una vez retenidas en este polímero se procedió a la desecación total del polímero con la finalidad de eliminar lentamente el solvente de la red de poliacrilamida pero manteniendo las AuNP's dentro de la misma (Fig. 34).

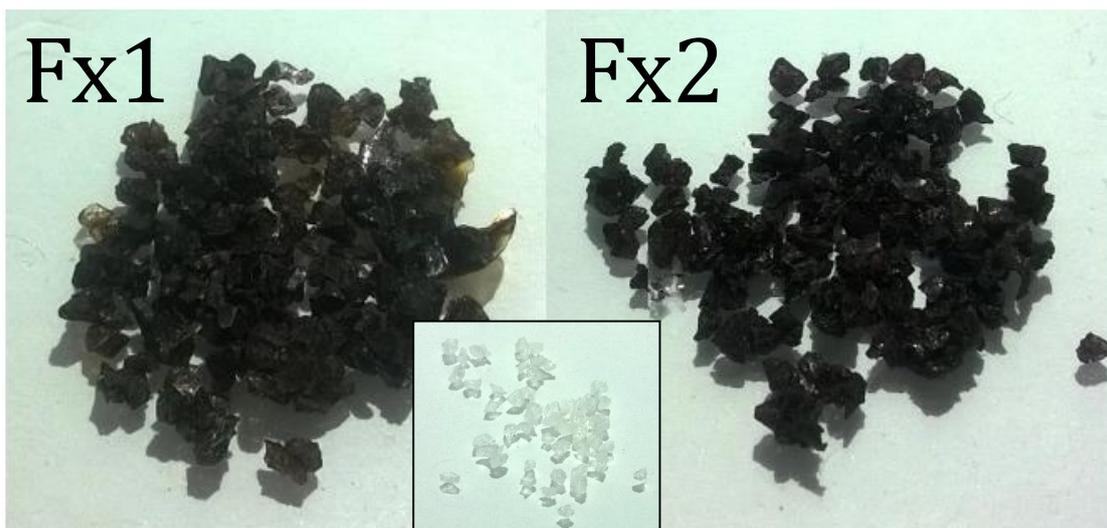


Figura 34. Soporte en polímero de poliacrilamida las AuNP's sintetizadas mediante las fracciones Fx1 (Izquierda) y Fx2 (Derecha) después de su desecación. Polímero de poliacrilamida antes de realizar el tratamiento (Recuadro central).

Una vez soportadas las AuNP's en el polímero se procedió a intentar su liberación en un medio acuoso, incorporando los gránulos en un volumen de 10 mL de agua tridestilada y extrayendo alícuotas cada 60 minutos para efectuar su lectura UV-Vis , como resultado se obtuvo una recuperación aceptable del material lo cual fue interpretado al generarse nuevamente las curvas correspondientes a la RPS de las AuNP's a 552 nm para el caso de las AuNP's Fx1 y 554 para las AuNP's Fx2 (Fig. 35). Como se puede observar para el caso de las AuNP's Fx1 (Fig. 35A) la liberación de las nanopartículas se observa desde los 60 minutos de contacto con el solvente acuoso, al presentarse una curva bien definida con una absorbancia de 0.33, la cual va aumentando de manera discreta hasta alcanzar su punto máximo de absorbancia (0.37) a los 300 minutos de contacto. En el caso de las AuNP's Fx2 sucede de manera distinta ya que la liberación de las nanopartículas se empieza a presentar nuevamente a partir de los 60 minutos de contacto con el solvente acuoso pero con una absorbancia mucho más baja (0.12), aumentando de manera muy importante a los 120 minutos de contacto, después de lo cual se mantiene en aumento de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

forma más moderada, hasta alcanzar su punto máximo de absorbancia a los 360 minutos de contacto (0.23) (Fig.35B).

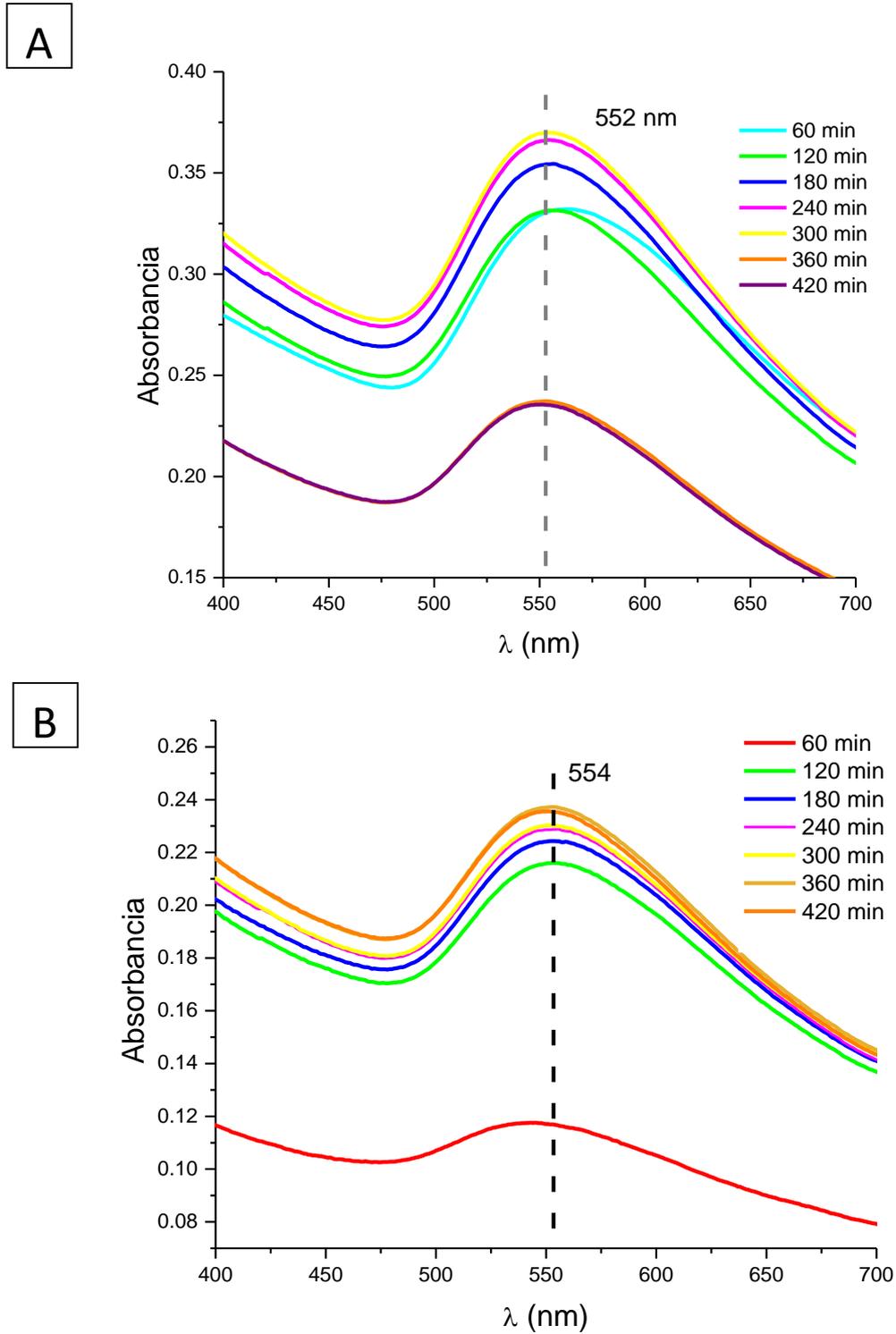


Figura 35. Lectura UV-Vis del sobrenadante analizado a partir de las muestras acuosas en contacto con los gránulos de poliacrilamida impregnados con las AuNP's sintetizadas mediante las fracciones Fx1 (A) y Fx2 (B) desde 60 hasta 420 minutos.

### *5.8. Determinación de los principales compuestos presentes en los extractos de A. potatorum*

Una vez que determinamos las características de tamaño y forma de las nanopartículas de oro sintetizadas mediante los extractos obtenidos Fx1, Fx2 y Fx3, era importante realizar un estudio preliminar para determinar de forma global los grupos de compuestos presentes en cada uno de los extractos, de modo que exista forma de correlacionar estos compuestos con el tipo de nanomaterial sintetizado. Con esta finalidad se realizaron determinaciones cuantitativas mediante pruebas químicas básicas para corroborar la presencia de los grupos principales de compuestos que se han reportado en otras especies del género *Agave*. Los resultados obtenidos nos demuestran que el extracto Fx1 (acuoso) es el que contiene una mayor cantidad de flavonoides, fenoles totales, polifenoles totales y esteroides (Fig. 36 y 37); por otra parte, el extracto Fx2 (etanólico) muestra altas concentraciones de fenoles totales, esteroides y azúcares reductores (Fig. 36 B y 37D). Por último, en el extracto Fx3 (hexánico), observamos altas concentraciones de fenoles totales, flavonoides, esteroides y azúcares reductores (Fig. 36 y 37). La gran cantidad de metabolitos reductores presentes en el extracto Fx1 puede tener un impacto muy importante en la gran velocidad de síntesis de las NP's observada cuando se emplea como agente reductor, además de realizar su actividad en concentraciones muy bajas (presentando actividad incluso al ser utilizado al 1%), esto puede ser atribuido a la actividad reductora tanto de flavonoides [130] así como de compuestos fenólicos [131], la cual ha sido reportada en múltiples estudios para la síntesis de nanopartículas, siendo relacionados en varios estudios como los principales donadores de electrones para la reducción de estos iones metálicos. Por otra parte en el extracto Fx2 la diferencia más relevante se presenta en la alta cantidad de azúcares reductores, los cuales también han sido reportados para su uso en la síntesis de nanomateriales [132], sin embargo podríamos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

atribuir su actividad a generar las distintas morfologías presentes en la muestra Fx2. Los datos analizados también sugieren que la concentración de azúcares reductores no es tan relevante para el proceso de síntesis ya que en el extracto Fx1 observamos la menor concentración de los mismos sin ocasionar esto algún decremento en la velocidad de la reacción y observándose que después del tiempo donde se presenta el pico máximo de absorción UV-Vis sucede un decaimiento/desplazamiento de la señal hacia longitudes de onda mayores lo cual se puede interpretar como la agregación del material a estructuras de mayor tamaño manifestándose incluso a simple vista por la presencia de sedimentos en el reactor. Por otra parte, en la reacción Fx2 es interesante que observamos diferentes morfologías en las micrografías TEM, esto pudiera deberse a que ese extracto presenta la mayor cantidad de azúcares reductores lo cual podría favorecer distintos sitios de nucleación que generan formas distintas. El mejor control de la forma y tamaño lo obtuvimos en las AuNP's sintetizadas utilizando el extracto Fx3 donde observamos únicamente dos tamaños de partícula (6 y 20 nm), donde la correlación fitoquímica más relevante que observamos fue una muy baja concentración de polifenoles totales con respecto a los extractos Fx1 y Fx2. En las tres reacciones que realizamos la temperatura fue la misma, 65 °C, lo cual nos corrobora la actividad de las biomoléculas reductoras a baja temperatura en los tres extractos utilizados, además que se realizaron como controles las reacciones empleando únicamente los disolventes sin metabolitos (Fx2 etanol, Fx3 hexano) para descartar actividad reductora proveniente de estos disolventes, obteniendo resultados negativos como se esperaba (no existe presencia de AuNP's).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

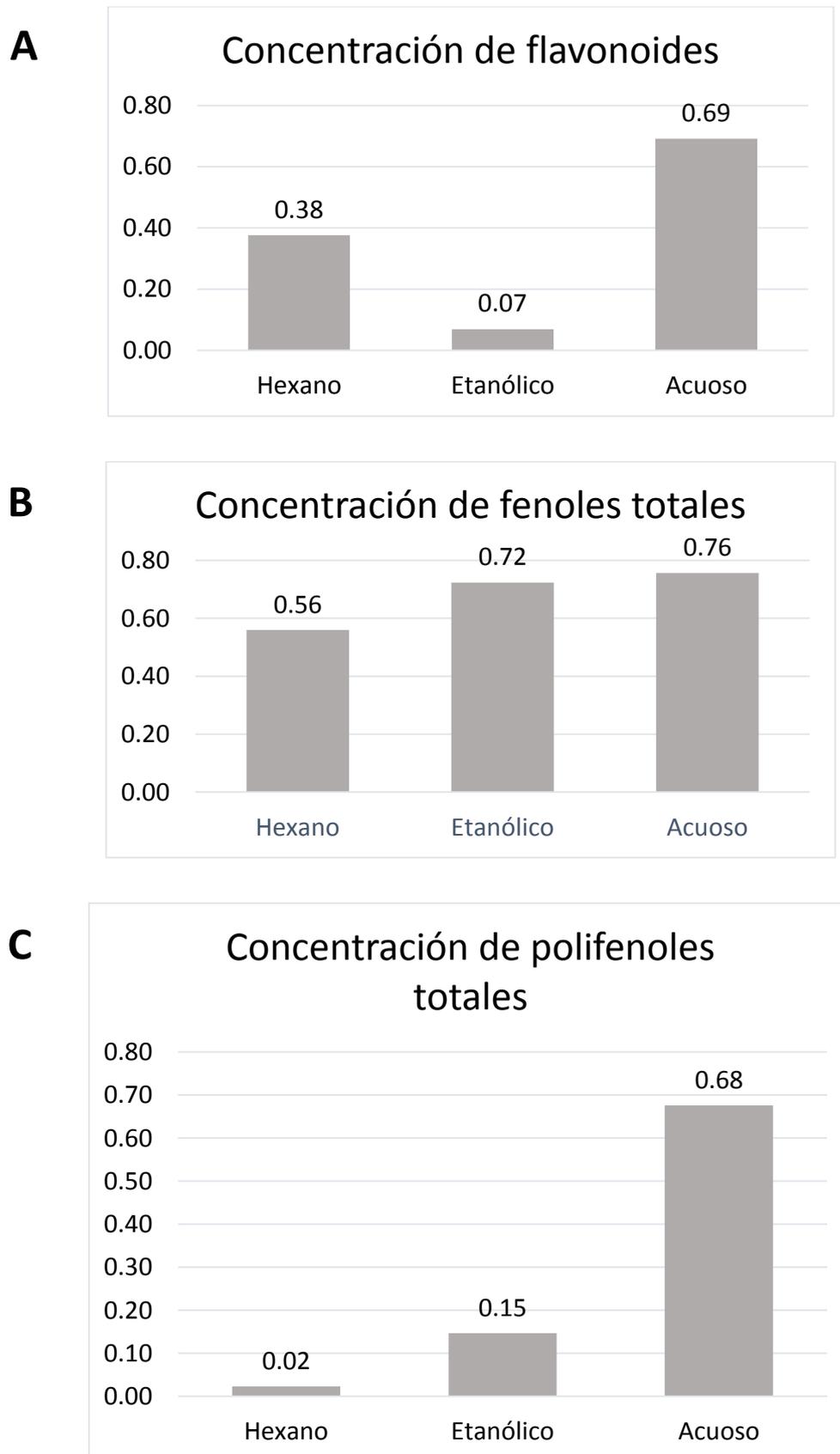


Figura 36. Principales componentes fenólicos presentes en los extractos Fx1, Fx2 y Fx3 de *A. potatorum* utilizados. (Todas las concentraciones están expresadas en milimoles por mililitro).

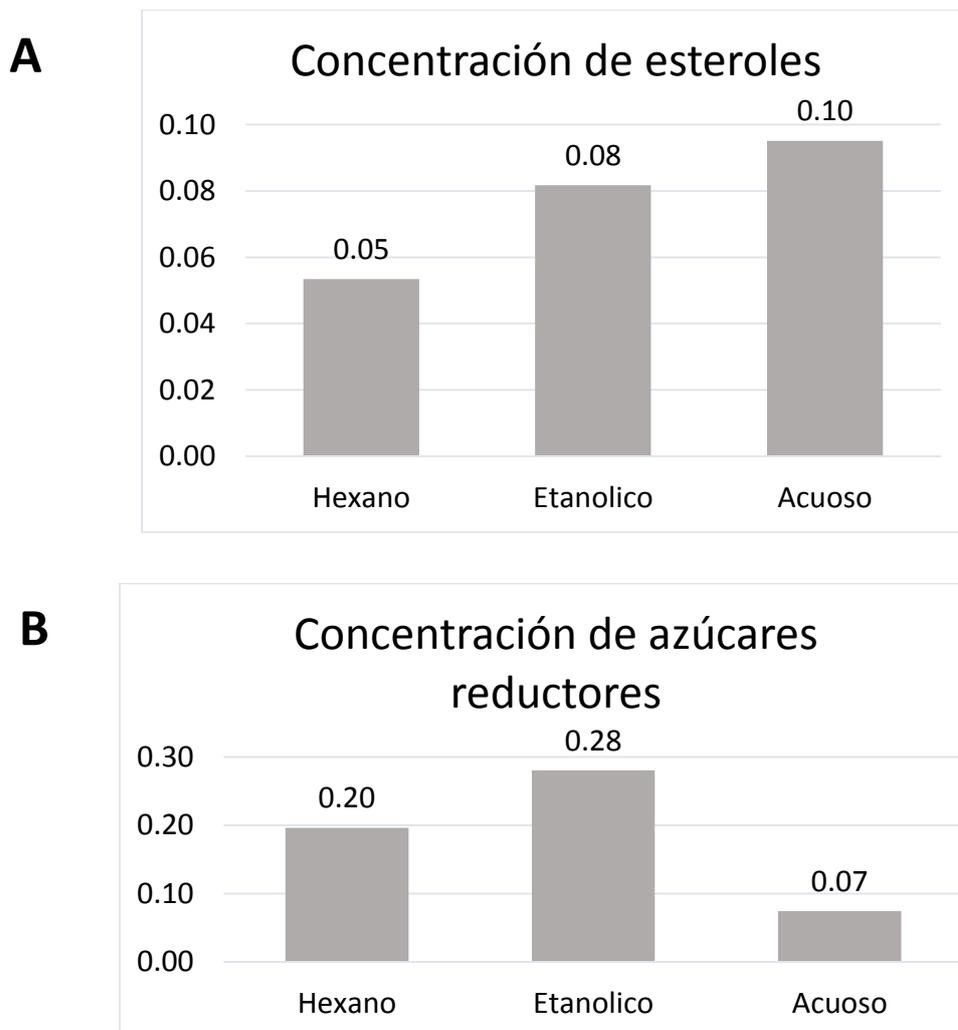


Figura 37. Otros grupos de compuestos presentes en los extractos Fx1, Fx2 y Fx3 de *A. potatorum* utilizados. (Todas las concentraciones están expresadas en milimoles por mililitro).

### 5.9. Ensayos de actividad citotóxica

Como parte del seguimiento de la biocompatibilidad de los nanomateriales que estamos sintetizando se procedió a realizar mediante una colaboración de investigación los ensayos preliminares con la finalidad de evaluar la actividad citotóxica de las AuNP's sintetizadas [133]. Para llevar a cabo estos estudios se realizaron los ensayos MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) utilizando la línea celular A549 y células mononucleares sanas provenientes de sangre periférica como control, estas células fueron incubadas durante 24 horas en contacto con las AuNP's Fx1. Es

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

importante señalar que en estudio a diferencia de otros que se han realizado se utilizó como controles el extracto Fx1 y la solución de  $\text{HAuCl}_4$ . Con la finalidad de afinar los detalles para estos ensayos procedimos a sintetizar en condiciones de esterilidad meticulosa nuevamente las AuNP's, dentro de una campana de flujo laminar. Los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT nos da evidencia de actividad citotóxica tanto en las células A549 como en células PBM, a partir de una concentración de Au de 0.05 mM, siendo mayor la toxicidad presentada en A549 (70% aproximadamente) que en las células PBM (60% aproximadamente). Además, resulta de gran relevancia señalar que el extracto Fx1 por sí mismo resulta ser más toxico que las AuNP's en las concentraciones respectivas de 0.005 y 0.01 mM, esto puede ser atribuible a que al ser un extracto crudo presenta una gran cantidad de metabolitos intactos y muy reactivos que afectan la viabilidad celular. Las cantidades utilizadas de AuNP's para este estudio fueron las necesarias para buscar un efecto de citotoxicidad, sin embargo es muy importante señalar que la dosis para su posible aplicación en alguna actividad específica es todavía un pendiente por determinar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

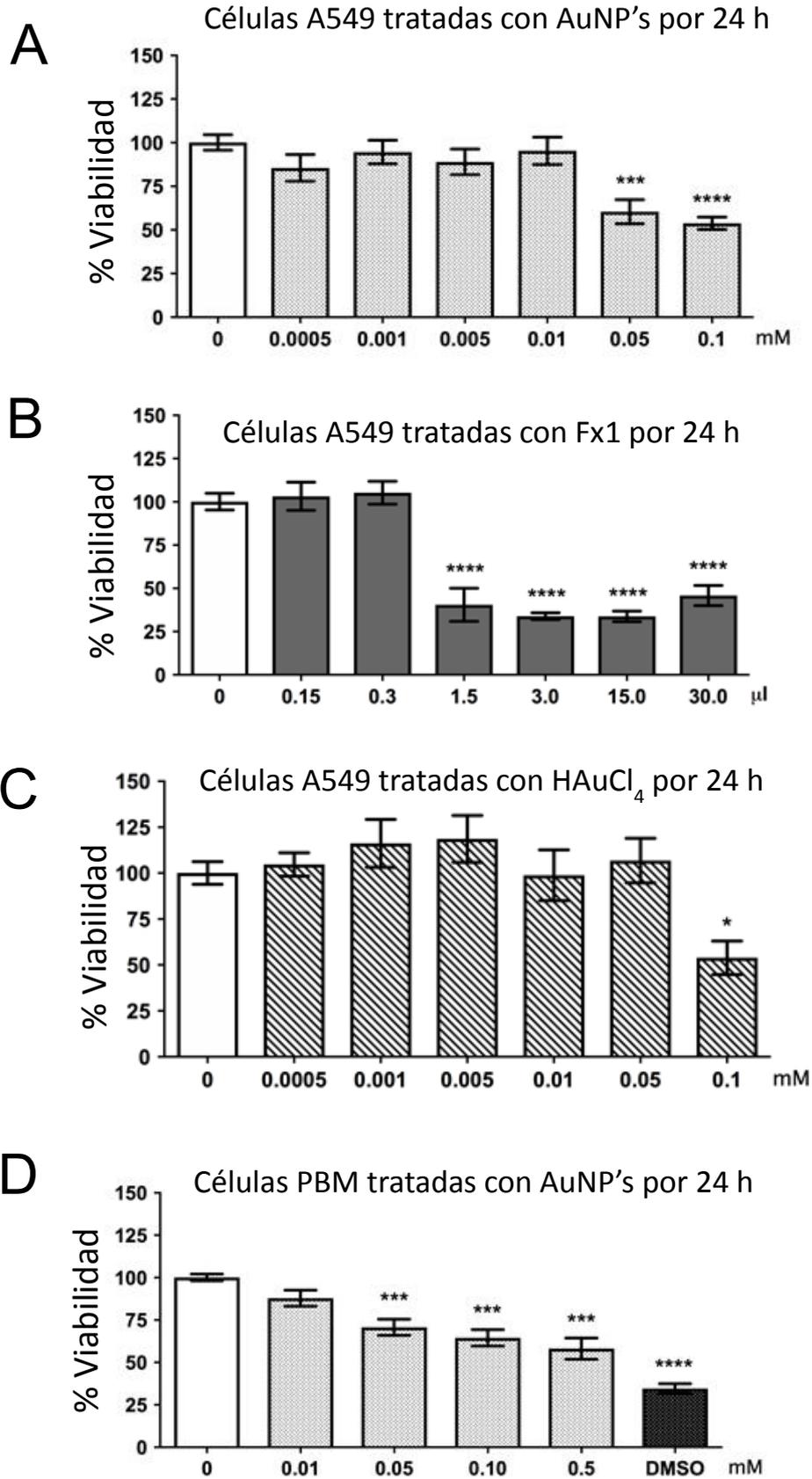


Figura 38. Ensayo MTT para determinar actividad citotóxica de AuNP's Fx1. (A) Células A549 tratadas con AuNP's, (B) Células tratadas con HAuCl<sub>4</sub> (C) Células tratadas con extracto Fx1, (D) Células PBM A549 tratadas con AuNP's. (Evaluación de la actividad citotóxica de nanopartículas de oro en células mononucleares de individuos sanos, Armenta, 2018).

## CAPÍTULO 6.

---

### CONCLUSIONES

Para explorar el potencial y las capacidades de la planta que utilizamos en este trabajo como se ha detallado en la sección experimental, empleamos de manera inicial el extracto acuoso (Fx1) para reducir soluciones metálicas de tres elementos distintos: cobre ( $\text{CuCl}_2$ ), plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y oro ( $\text{HAuCl}_4$ ), los resultados obtenidos nos demostraron la capacidad reductora notable del extracto Fx1 para la síntesis de nanomateriales a partir de metales distintos, los cuales presentaron diferentes morfologías y tamaños. Partiendo de los resultados obtenidos de estos elementos metálicos sería factible seguir estudiando las capacidades del extracto Fx1 utilizando otros precursores (Sulfatos, cloruros, nitratos, etc.) a partir de los mismos metales (Cu, Ag, Au) con la finalidad de seguir expandiendo el espectro de nanomateriales obtenidos (Nuevas morfologías, tamaños, dispersión).

Otra vertiente importante de este trabajo realizado fue diferenciar la síntesis de nanomateriales mediante el ensayo de un solo metal y distintos extractos obtenidos de la misma planta variando los solventes utilizados, los cuales denominamos Fx1 (acuoso), Fx2 (etanólico) y Fx3 (hexánico), al repetir nuestro proceso de síntesis con cada una de las fracciones obtenidas pudimos corroborar diferencias importantes, tanto en la coloración de la reacción y tiempo de síntesis, así como en el seguimiento espectrofotométrico y en la caracterización microestructural de los nanomateriales sintetizados, variaciones en la síntesis muy posiblemente debidas a la variedad de las biomoléculas presentes en cada extracto. A simple vista el color de las reacciones de síntesis se observa con una mayor intensidad para los extractos tanto Fx1 (color violeta) como Fx2 (color violeta rojizo) mientras que la reacción Fx3 se presenta una coloración lila pálido (comparar insertos en fig. 1, 2 y 3); además de que el tiempo de reacción se va

## CONCLUSIONES

incrementando conforme se disminuye la población de biomoléculas reductoras presentes en los extractos Fx1 (6 min), Fx2 (60 min) y Fx3 (90 min) , siendo estos tiempos determinados por el máximo espectro de absorción UV-Vis obtenido.

Otra diferencia importante se presenta en la cantidad de bioreductor necesario ya que mientras para las reacciones Fx1 y Fx2 utilizamos un 10% de extracto, en el caso de Fx3 empleamos 40%, lo cual puede deberse a una baja en la actividad reductora ocasionada por la menor cantidad de metabolitos presentes en esta fracción, aunque de manera paralela esto contribuye al mayor control en la relación forma/tamaño.

Mediante el seguimiento realizado utilizando la espectrofotometría UV-Vis observamos distintas formas en las señales generadas por las distintas fracciones además de formarse en diferentes longitudes de onda Fx1 (543 nm), Fx2 (537 nm) y Fx3 (547 nm) lo que nos da indicios de las variaciones entre los nanomateriales sintetizados de manera preliminar antes de ser caracterizados microestructuralmente. Los análisis de las micrografías TEM nos permiten observar que en la síntesis con Fx1 obtenemos una gran cantidad de AuNP's de forma aproximadamente esférica con un tamaño promedio de 13.4 nm, mientras que en la síntesis realizada mediante la fracción Fx2 lo que observamos es la presencia de distintas morfologías (icosaedros, decaedros y trigonales planas, con un tamaño de población promedio de 36.6 nm; siendo la diferencia más importante la que encontramos en la última fracción utilizada (Fx3) donde se observa la presencia de AuNP's esféricas prácticamente de solo dos tamaños (6 y 20 nm). Los resultados de XRD nos corroboran en los tres casos, Fx1, Fx2 y Fx3 la cristalinidad de las AuNP's obtenidas lo cual evidencia la naturaleza metálica del oro y que no se trata de un óxido. La caracterización fitoquímica preliminar de los tres extractos nos muestra la presencia de familias de compuestos que ya han sido caracterizadas en otras especies de Agave, sin embargo a la fecha no existe aún algún estudio fitoquímico profundo en la especie de agave mezcalero

## CONCLUSIONES

que estamos empleando en este estudio (*Agave potatorum*). De esta manera las características del proceso que utilizamos para esta biosíntesis nanotecnológica: baja temperatura, biomoléculas reductoras y tiempos reducidos fortalecen la metodología de nuestra síntesis, además el uso de solventes biocompatibles como agua y etanol favorece la biocompatibilidad de las AuNP's obtenidas, en el caso del hexano, aunque se trata de un solvente tóxico en altas concentraciones, sucede que al tener un muy bajo punto de ebullición (67 °C) es fácilmente eliminado de la reacción al evaporarlo subiendo la temperatura, como se realiza de manera rutinaria en la industria de extracción de aceites comestibles.

El tamaño y morfología diferente de las AuNP's sintetizadas en las tres reacciones nos demuestra que es posible manipular la síntesis para controlar de mejor manera la forma y el tamaño de las nanopartículas generadas, ya que al ir separando los componentes del extracto se aíslan diversos metabolitos que reducen y estabilizan las AuNP's de diferente manera, generando distintos bionanomateriales en el proceso (Fig. 39), el estudio más profundo de los componentes de cada fracción utilizada (Fx1, Fx2 y Fx3) así como la subdivisión en otras fracciones del extracto de *Agave* nos permitirá en un futuro controlar las características de las AuNP's de una manera más dirigida y precisa así como proponer un mecanismo de acción de las biomoléculas involucradas. Además, el seguimiento de las señales de RPS alrededor de 540 nm obtenidas mediante la espectrofotometría UV-VIS nos indican la formación de AuNP's, lo cual nos permite dar seguimiento a la cinética de las reacciones para su posterior manipulación.

Con respecto a las pruebas biológicas realizadas, observando estos resultados preliminares, se presenta la necesidad de análisis celulares más detallados, comparando la actividad de estas AuNP's contra otros nanomateriales de oro disponibles comercialmente (Síntesis química) para tener un panorama mucho más claro de si son

## CONCLUSIONES

más o menos tóxicas que las que son sintetizadas mediante métodos químicos. Así mismo es un pendiente importante estimar de alguna forma la dosis aproximada que tendría una actividad para su aplicación celular, ya que las cantidades que se utilizaron en estos primeros análisis son demasiado altas lo cual también es un factor a considerar.

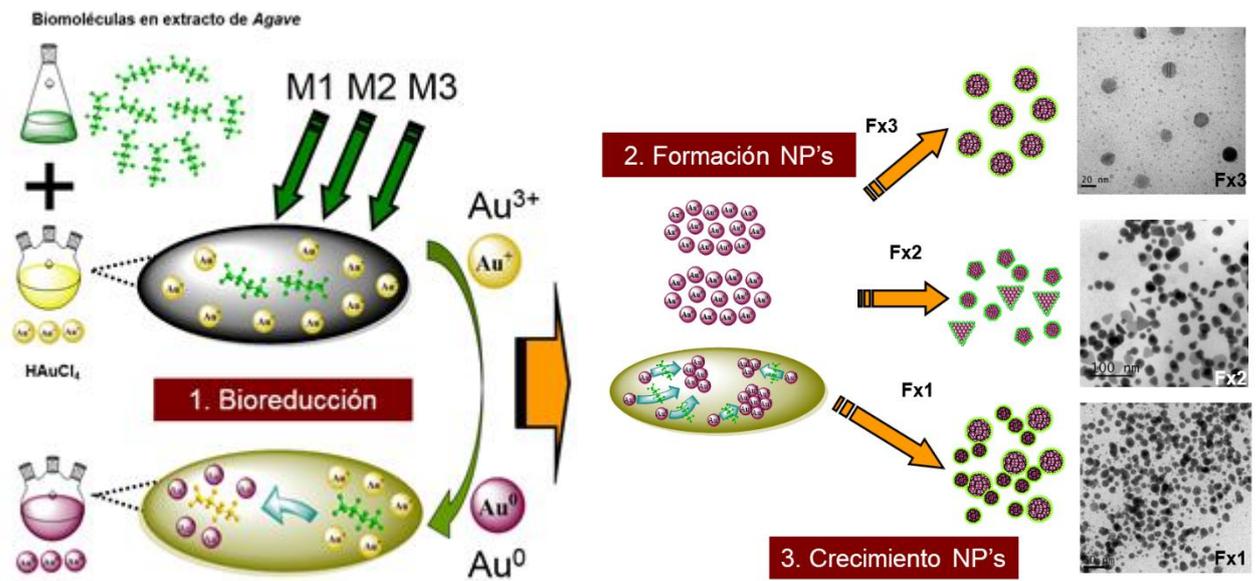


Figura 39. Resumen general de las síntesis efectuadas mediante los extractos de *A. potatorum*.

## 7. REFERENCIAS

- [1] Daniel, M.-C., & Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *ChemInform*, 35(16). doi:10.1002/chin.200416213
- [2] Yeh, Y., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology, *Nanoscale*, 4, 1871-1880.
- [3] Das M., Shim K. H., Soo S. A., & Kee D. Y., (2011), Toxicology and Environmental Health Sciences, Vol. 3(4).
- [4] Park, Y., Hong, Y. N., Weyers, A., Kim, Y. S., & Linhardt, R. J., (2011) Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles, *IET Nanobiotechnology.*, vol. 5(3), pp. 69–78.
- [5] Sen, I. K., Maity, K., & Islam, S.S. (2012). Green synthesis of gold nanoparticles using a glucan of an edible mushroom and study of catalytic activity. *Carbohydrate Polymer*. doi:10.1016/j.carbpol.08.058
- [6] Rao, C. N. R. & Cheetham A.K. (2001) Science and technology of nanomaterials: current state and future prospects. *J Mater Chem*.11:2887–2894.
- [7] Sun, Y. (2002). Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science*, 298(5601), 2176–2179. doi:10.1126/science.1077229
- [8] Hashmi, A. S. K. & Hutchings, G.J. (2006). Gold catalysis. *Angew Chem Int. Ed*. 45:7896–7936.
- [9] Qin, L., Zeng, G., Lai, C., Huang, D., Xu, P., Zhang, C., ... & Yi, H. (2018). “Gold rush” in modern science: fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing. *Coordination Chemistry Reviews*, 359, 1-31.
- [10] Kumar, A., Zhang, X., & Liang, X. J. (2013). Gold nanoparticles: emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnology advances*, 31(5), 593-606.
- [11] Begum, N. A., Mondal, S., Basu, S., Laskar, R. A., & Mandal, D. (2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 113-118.
- [12] Roy, N., Mondal, S., Laskar, R. A., Basu, S., Mandal, D., & Begum, N. A. (2010). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 317-325.
- [13] He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., & Gu, N. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61(18), 3984-3987.
- [14] Kitching, M., Ramani, M., & Marsili, E. (2015). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microbial biotechnology*, 8(6), 904-917.
- [15] Rai, M., & Duran, N. (Eds.). (2011). *Metal nanoparticles in microbiology*. Springer Science & Business Media.
- [16] Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S., Porat, Z. E., & Zeiri, Y. (2014). Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International journal of nanomedicine*, 9, 4007.
- [17] Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.

## REFERENCIAS

- [18] Salam, H. A., Rajiv, P., Kamaraj, M., Jagadeeswaran, P., Gunalan, S., & Sivaraj, R. (2012). Plants: green route for nanoparticle synthesis. *Int Res J Biol Sci*, 1(5), 85-90.
- [19] Mondal, S., Roy, N., Laskar, R. A., Sk, I., Basu, S., Mandal, D., & Begum, N. A. (2011). Biogenic synthesis of Ag, Au and bimetallic Au/Ag alloy nanoparticles using aqueous extract of mahogany (*Swietenia mahogani* JACQ.) leaves. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 497-504.
- [20] Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A., Uribe-Soto, J. N., & González-Valdez, L. S. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(03), 9.
- [21] Hernández, S. R., Lugo, C. E. C., Díaz, J. L., & Villanueva, S. (2005). Extraction and indirect quantification of saponins from the *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*, 3, 1-citation\_lastpage.
- [22] Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & de Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6440-6451.
- [23] Santos H.J.L., (2008), Identificación y cuantificación de terpenos en *Agave mezcalero* por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas. Facultad de Química UNAM.
- [24] Ade-Ajayi, A. F., Hammuel, C., Ezeayanaso, C., Ogabiela, E. E., Udiba, U. U., Anyim, B., & Olabanji, O. (2011). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(7), 180-183.
- [25] Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of *Agave*: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22-46.
- [26] Monterrosas-Brisson, N., Ocampo, M., Jiménez-Ferrer, E., Jiménez-Aparicio, A., Zamilpa, A., Gonzalez-Cortazar, M., ... & Herrera-Ruiz, M. (2013). Anti-inflammatory activity of different *Agave* plants and the compound Cantalasonin-1. *Molecules*, 18(7), 8136-8146.
- [27] Mina, S. A., Melek, F. R., Abdel-khalik, S. M., El-Shaarawy, F. S., & Eskander, J. (2014). Pharmacological activities of *Agave seemanniana* and isolation of three steroidal saponins. *European Journal of Medicinal Plants*, 271-283.
- [28] MaBasheerahmed, A. M. (2015). Gastro protective effect of *Agave americana* Linn. leaf extract in indomethacin-induced enterocolitis in rats. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 9(4).
- [29] *CA Cancer Journal for Clinicians* 60 (2010) 277–300.
- [30] Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC
- [31] OMS 2015, Nota descriptiva N°297
- [32] Pérez-Cabeza de Vaca, R., Cárdenas-Cárdenas, E., Mondragón-Terán, P., & Erazo-Valle Solís, A. A. (2018). Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 22(4), 171-181.
- [33] Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161–171. doi:10.1038/nrc1566
- [34] McKenzie, L. C., & Hutchison, J. E. (2004). Green nanoscience. *Chimica oggi*, 22(9), 30-33.

## REFERENCIAS

- [35] Dahl, J. A., Maddux, B. L., & Hutchison, J. E. (2007). Toward greener nanosynthesis. *Chemical reviews*, 107(6), 2228-2269.
- [36] Jha, A. K., Prasad, K., & Prasad, K. (2009). A green low-cost biosynthesis of Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Biochemical engineering journal*, 43(3), 303-306.
- [37] Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13611-13614.
- [38] Beveridge, T. J., & Murray, R. G. (1976). Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1502-1518.
- [39] Southam, G., & Beveridge, T. J. (1994). The in vitro formation of placer gold by bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(20), 4527-4530.
- [40] Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M. A., & Dhivya, B. (2009). Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 133-137.
- [41] Shaligram, N. S., Bule, M., Bhambure, R., Singhal, R. S., Singh, S. K., Szakacs, G., & Pandey, A. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain. *Process biochemistry*, 44(8), 939-943.
- [42] Das, S. K., Das, A. R., & Guha, A. K. (2009). Gold nanoparticles: microbial synthesis and application in water hygiene management. *Langmuir*, 25(14), 8192-8199.
- [43] Bhainsa, K. C., & D'souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160-16.
- [44] Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., ... & Sastry, M. (2001). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Letters*, 1(10), 515-519.
- [45] Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago, P., & Yacaman, M. J. (2002). Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano letters*, 2(4), 397-401.
- [46] Kumar, I., Mondal, M., Meyappan, V., & Sakthivel, N. (2019). Green one-pot synthesis of gold nanoparticles using *Sansevieria roxburghiana* leaf extract for the catalytic degradation of toxic organic pollutants. *Materials Research Bulletin*, 117, 18-27.
- [47] Meva, F. E. A., Mbeng, J. O. A., Ebongue, C. O., Schlüsener, C., Kökçam-Demir, Ü., Ntomba, A. A., ... & Tchoumbi, E. (2019). *Stachytarpheta cayennensis* aqueous extract, a new bioreactor towards silver nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 10(02), 102.
- [48] Sundarrajan, P., & Shetty, S. (2019). SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES USING VARIOUS PLANT EXTRACTS AND THEIR VARIOUS ENVIRONMENTAL APPLICATIONS. *MESMAP-5 PROCEEDING BOOK*, 91.
- [49] García-Mendoza, A. 2002. "Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico", en *Cactus and Succulent Journal (US)*, núm. 74, pp. 177-187.
- [50] Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson.

## REFERENCIAS

- [51] Santos, J., 2008. Identificación y cuantificación de terpenos en Agave mezcalero por microextracción en fase sólida, cromatografía de gases, espectrometría de masas, Tesis de maestría.
- [52] Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A., Uribe-Soto, J. N., & González-Valdez, L. S. (2013). The phenols of the genus Agave (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(03), 9.
- [53] Alivisatos, A. P. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *science*, 271(5251), 933-937.
- [54] Banin, U., Cao, Y., Katz, D., & Millo, O. (1999). Identification of atomic-like electronic states in indium arsenide nanocrystal quantum dots. *Nature*, 400(6744), 542.
- [55] Collier, C. P., Saykally, R. J., Shiang, J. J., Henrichs, S. E., & Heath, J. R. (1997). Reversible tuning of silver quantum dot monolayers through the metal-insulator transition. *Science*, 277(5334), 1978-1981.
- [56] Grieve, K., Mulvaney, P., & Grieser, F. (2000). Synthesis and electronic properties of semiconductor nanoparticles/quantum dots. *Current opinion in colloid & interface science*, 5(1-2), 168-172.
- [57] Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, 104(1), 293-346.
- [58] Lu, A. H., Salabas, E. E., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
- [59] Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., & Mattoussi, H. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature materials*, 4(6), 435.
- [60] Shipway, A. N., Katz, E., & Willner, I. (2000). Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *ChemPhysChem*, 1(1), 18-52.
- [61] Rao, C. N. R., Müller, A., & Cheetham, A. K. (Eds.). (2006). *The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications*. John Wiley & Sons.
- [62] Schmid, G. (Ed.). (2011). *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons.
- [63] Yadav, T. P., Yadav, R. M., & Singh, D. P. (2012). Mechanical milling: a top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(3), 22-48.
- [64] Kim, M., Osone, S., Kim, T., Higashi, H., & Seto, T. (2017). Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review. *KONA Powder and Particle Journal*, 2017009.
- [65] Suslick, K. S. (1990). Sonochemistry. *science*, 247(4949), 1439-1445.
- [66] Mannucci, S., Ghin, L., Conti, G., Tambalo, S., Lascialfari, A., Orlando, T., ... & Marzola, P. (2014). Magnetic nanoparticles from *Magnetospirillum gryphiswaldense* increase the efficacy of thermotherapy in a model of colon carcinoma. *PloS one*, 9(10), e108959.
- [67] Husseiny, M. I., El-Aziz, M. A., Badr, Y., & Mahmoud, M. A. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(3-4), 1003-1006.

## REFERENCIAS

- [68] He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., & Gu, N. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61(18), 3984-3987.
- [69] Law, N., Ansari, S., Livens, F. R., Renshaw, J. C., & Lloyd, J. R. (2008). Formation of nanoscale elemental silver particles via enzymatic reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(22), 7090-7093.
- [70] Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150-153.
- [71] Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Nellaiah, H., & Sangiliyandi, G. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials letters*, 62(29), 4411-4413.
- [72] Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Nellaiah, H., & Sangiliyandi, G. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials letters*, 62(29), 4411-4413.
- [73] Balaji, D. S., Basavaraja, S., Deshpande, R., Mahesh, D. B., Prabhakar, B. K., & Venkataraman, A. (2009). Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 68(1), 88-92.
- [74] Nelson, D., Priscyla, D. M., Oswaldo, L. A., Gabriel, I. H. D. S., & Elisa, E. (2005). Mechanical aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, 8.
- [75] Bansal, V., Rautaray, D., Ahmad, A., & Sastry, M. (2004). Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Materials Chemistry*, 14(22), 3303-3305.
- [76] Bhainsa, K. C., & D'souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160-164.
- [77] Abdel-Aziz, S. M., Prasad, R., Hamed, A. A., & Abdelraof, M. (2018). Fungal Nanoparticles: A Novel Tool for a Green Biotechnology?. In *Fungal Nanobionics: Principles and Applications* (pp. 61-87). Springer, Singapore.
- [78] Saratale, R. G., Saratale, G. D., Shin, H. S., Jacob, J. M., Pugazhendhi, A., Bhaisare, M., & Kumar, G. (2018). New insights on the green synthesis of metallic nanoparticles using plant and waste biomaterials: current knowledge, their agricultural and environmental applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10164-10183.
- [79] Ebrahiminezhad, A., Zare-Hoseinabadi, A., Sarmah, A. K., Taghizadeh, S., Ghasemi, Y., & Berenjian, A. (2018). Plant-mediated synthesis and applications of iron nanoparticles. *Molecular biotechnology*, 60(2), 154-168.
- [80] Tripathi, A., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., & Mukherjee, A. (2009). Antibacterial applications of silver nanoparticles synthesized by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(1), 93-98.

## REFERENCIAS

- [81] Aljabali, A., Akkam, Y., Al Zoubi, M., Al-Batayneh, K., Al-Trad, B., Abo Alrob, O., ... & Evans, D. (2018). Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. *Nanomaterials*, 8(3), 174.
- [82] Aubin-Tam, M. E., & Hamad-Schifferli, K. (2008). Structure and function of nanoparticle–protein conjugates. *Biomedical Materials*, 3(3), 034001.
- [83] Khan, A. K., Rashid, R., Murtaza, G., & Zahra, A. (2014). Gold nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 13(7), 1169-1177.
- [84] Rosi, N. L., Giljohann, D. A., Thaxton, C. S., Lytton-Jean, A. K., Han, M. S., & Mirkin, C. A. (2006). Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*, 312(5776), 1027-1030.
- [85] Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751.
- [86] Huo, Q. (2007). A perspective on bioconjugated nanoparticles and quantum dots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(1), 1-10.
- [87] Selvan, S. T., Tan, T. T. Y., Yi, D. K., & Jana, N. R. (2009). Functional and multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing. *Langmuir*, 26(14), 11631-11641.
- [88] Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., ... & Franco, R. (2008). Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(3), 943-950.
- [89] Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy.
- [90] Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine & Biology*, 49(18), N309.
- [91] Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2008). Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(8), 977-985.
- [92] Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., ... & West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13549-13554.
- [93] Yavuz, M. S., Cheng, Y., Chen, J., Cobley, C. M., Zhang, Q., Rycenga, M., ... & Wang, L. V. (2009). Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nature materials*, 8(12), 935.
- [94] Han, G., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2007). Multi-functional gold nanoparticles for drug delivery. In *Bio-applications of Nanoparticles* (pp. 48-56). Springer, New York, NY.
- [95] Thomas, M., & Klibanov, A. M. (2003). Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9138-9143.

## REFERENCIAS

- [96] Jones, M. R., Millstone, J. E., Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Young, K. L., & Mirkin, C. A. (2009). Plasmonically controlled nucleic acid dehybridization with gold nanoparticles. *ChemPhysChem*, 10(9-10), 1461-1465.
- [97] Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2011). Inorganic nanoparticles in cancer therapy. *Pharmaceutical research*, 28(2), 237-259.
- [98] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), 1307-1315.
- [99] Nishiyama, N. (2007). Nanomedicine: nanocarriers shape up for long life. *Nature nanotechnology*, 2(4), 203.
- [100] Mendes, R., Fernandes, A. R., & Baptista, P. V. (2017). Gold Nanoparticle Approach to the Selective Delivery of Gene Silencing in Cancer-The Case for Combined Delivery?. *Genes*, 8(3), 94. doi:10.3390/genes8030094
- [101] Johannsen, M., Gneveckow, U., Eckelt, L., Feussner, A., Waldöfner, N., Scholz, R., ... & Jordan, A. (2005). Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *International journal of hyperthermia*, 21(7), 637-647.
- [102] Johannsen, M., Thiesen, B., Wust, P., & Jordan, A. (2010). Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 26(8), 790-795.
- [103] Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., & Tamarkin, L. (2004). Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug delivery*, 11(3), 169-183.
- [104] Sperling, R. A., & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), 1333-1383.
- [105] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), 1307-1315.
- [106] Nishiyama, N. (2007). Nanomedicine: nanocarriers shape up for long life. *Nature nanotechnology*, 2(4), 203.
- [107] McKenzie, L. C., & Hutchison, J. E. (2004). Green nanoscience. *Chimica oggi*, 22(9), 30-33.
- [108] Terenteva, E. A., Apyari, V. V., Dmitrienko, S. G., & Zolotov, Y.A., (2015) Formation of plasmonic silver nanoparticles by flavonoids reduction. A comparative study and application for determination of these substances. *Spectrochimica acta part A Mol Biomol Spectrosc* 151:89–95
- [109] Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic Mittal, A. K., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003> nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- [110] Kim, D., Jeong, S., & Moon, J. (2006). Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology*, 17(16), 4019.

## REFERENCIAS

- [111] Andrade, J. L., De la Barrera, E., García, C. R., Ricalde, M. F., Soto, G. V., & Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 37-50.
- [112] Bobadilla, A. Caracterización de terpenos en el Agave tequilana Weber variedad azul y su evolución en la producción de tequila. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM, México, 2003.
- [113] Medina, A. Determinación de terpenos en Agave tequilana Weber var. Azul, Agave angustifolia, Agave salmiana y en sus respectivas bebidas alcohólicas. Tesis. Facultad de Química. UNAM. 2004. 54 p.
- [114] Ade-Ajayi, A. F., Hammuel, C., Ezeayanso, C., Ogabiela, E. E., Udiba, U. U., Anyim, B., & Olabanji, O. (2011). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of Agave sisalana Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(7), 180-183.
- [115] Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & de Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of Agave attenuata. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6440-6451.
- [116] García-Mendoza, A. J. (2010). Revisión taxonómica del complejo Agave potatorum Zucc.(Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta botánica mexicana*, (91), 71-93.
- [117] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- [118] Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- [119] Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food research international*, 44(7), 2047-2053.
- [120] García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- [121] Saptarini, N. M., Indriyati, W., & Shalihati, A., (2016), Colorimetric Method for Total Phytosterols Content Analysis in Soybean (*Glycine max*), Soymilk, and Soy Yoghurt, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(4):1458-1464.
- [122] Garriga, M., Almaraz, M., & Marchiaro, A. (2017), Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method), *Actas de Ingeniería*, Volumen 3, pp. 173-179.
- [123] Behera, M., & Giri, G. (2014). Green synthesis and characterization of cuprous oxide nanoparticles in presence of a bio-surfactant. *Materials Science-Poland*, 32(4), 702-708.
- [124] Willets, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58, 267-297.
- [125] Petryayeva, E., & Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Analytica chimica acta*, 706(1), 8-24.

## REFERENCIAS

- [126] Liu, P., Wang, H., Li, X., Rui, M., & Zeng, H., (2015), Localized Surface Plasmon Resonance of Cu Nanoparticles by Laser Ablation in Liquid Media, *RSC Advances*, 5(97), 79738–79745. doi:10.1039/c5ra14933a
- [127] Petrucci, R. H., Harwood, W. S., Herring, G. E., & Madura J., *General Chemistry: Principles and Modern Applications* 9th Ed. New Jersey, 2007.
- [128] Haiss W., Thanh N. T. K., Aveyard J. & Ferning D. G. (2007), Determination of size and concentration of Gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, Vol. 79, No. 11, 4215-4221.
- [129] Jain P. K., Lee K. S., El-Sayed I. H., & El-Sayed M. A. (2006), Calculated absorption and scattering properties of Gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 110:14, pp. 7238-7248.
- [130] Hussain, M., Raja, N. I., Iqbal, M., & Aslam, S. (2019). Applications of plant flavonoids in the green synthesis of colloidal silver nanoparticles and impacts on human health. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43(3), 1381-1392.
- [131] Alegria, E., Ribeiro, A., Mendes, M., Ferraria, A., do Rego, A., & Pombeiro, A. (2018). Effect of Phenolic Compounds on the Synthesis of Gold Nanoparticles and its Catalytic Activity in the Reduction of Nitro Compounds. *Nanomaterials*, 8(5), 320. doi:10.3390/nano8050320
- [132] Shukla, A. K., & Iravani, S. (2016). Green Synthesis and Spectroscopic Characterization of Nanoparticles. *Sustainable Agriculture Reviews*, 65–99. doi:10.1007/978-3-319-39303-2\_3
- [133] Armenta, M. I. Y., (2018) Evaluación de la actividad citotóxica de nanopartículas de oro en células mononucleares de individuos sanos, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.