

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES



TESIS

BIOSÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIPROLIFERATIVA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA, OBTENIDAS A BASE DE EXTRACTOS DE ANNONA MURICATA, SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.

M. en C.M. MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ PEDROZA

TUTOR ACADEMICO:
DR. RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE
TUTOR ADJUNTO:
DRA. LILIANA ARGUETA FIGUEROA

Toluca, México; Enero 2020

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	3
ABREVIATURAS.....	4
ABSTRACT	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPITULO I: ANTECEDENTES	10
1.1 CIENCIA DE MATERIALES.....	10
1.1.1 NANOTECNOLOGIA	10
1.1.2 NANOMATERIALES	11
1.1.3 NANOPARTICULAS.....	13
1.1.4 NANOPARTÍCULAS DE METALES NOBLES.....	14
1.2 NANOPARTICULAS DE PLATA (AgNPs).....	16
1.2.1 SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA (AgNPs)	16
1.2.2 BIO-REDUCTORES	18
1.2.3 GUANABANA (Annona muricata).....	19
1.3 CÁNCER DE MAMA.....	20
1.3.1 LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS	21
1.3.2 CULTIVO CELULAR	21
1.3.3 CUANTIFICACIÓN CELULAR	22
CAPITULO II: TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN	25
2.1 ESPECTROSCOPIA	25
2.1.1 ESPECTROSCOPIA UV-Vis	25
2.1.2 ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	28
2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	31
2.2.1 ESPECTROSCOPÍA DE RAYOS X DE ENERGÍA DISPERSA (EDS)	32
2.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	34

En función de lo antes descrito se planteó lo siguiente;	37
HIPOTESIS	37
OBJETIVOS	37
CAPITULO III: METODOLOGIA	38
3.1 Recolección y conservación de hojas y cáscara de <i>A. muricata</i>	38
3.2 Biosíntesis de las Nanopartículas de plata con extractos de <i>A. muricata</i>	40
3.2.1 Preparación de extracto acuoso de hojas (EH) y cáscara (EC) de <i>A. muricata</i>	40
3.2.2 Preparación de la solución de nitrato de plata	40
3.2.3 Síntesis de Nanopartículas de Plata:	40
3.3 Caracterización.....	42
3.3.1 Caracterización de propiedades ópticas de las AgNPs.....	42
3.3.2 Caracterización morfológica y estructural de las AgNPs.....	42
3.3.3 Caracterización de los principales grupos funcionales presentes en los extractos de <i>Annona muricata</i> y AgNPs.....	42
3.4 Ensayo de viabilidad celular	43
3.4.1 Análisis estadístico.	44
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)	45
4.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	46
4.2.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA UV-Vis.....	46
4.2.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA FTIR.....	48
4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL	49
4.3.1 ANALISIS ELEMENTAL MEDIANTE SEM-EDS.....	49
4.3.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO MEDIANTE TEM	52
4.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO MTT.	54
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	62
ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aplicaciones de la nanotecnología (Elaboración propia)	11
Figura 2: Métodos de síntesis de nanopartículas. (A) "Bottom-up" y (B) "Top-down" [37]	14
Figura 3: Paso del espectro de un estado discreto desde el átomo a un estado continuo de bandas del material masivo (bulk) [40]	15
Figura 4: Mecanismo de formación de AgNPs a partir de una reducción química en disolución de sal AgNO_3 [48]	17
Figura 5: Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT [72]	24
Figura 6: Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante [75]	27
Figura 7: Efecto de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) en las nanopartículas metálicas [76]	28
Figura 8: Diagrama de un espectrómetro por transformada de Fourier [78]	30
Figura 9: Proceso de formación de la imagen de un microscopio electrónico de barrido	34
Figura 17: Espectro FTIR de los extractos de hojas (EH) y cascara (EC) de <i>A. muricata</i>	48
Figura 18: Análisis EDS: comparativo de las gráficas de análisis elemental y line-scan de las nanopartículas generadas, a)AgNPs-EC y b)AgNPs-EH.	50
Figura 19: Mapeo químico de los elementos Carbón (color azul), Plata (color amarillo) y Oxígeno (color morado), a)AgNPs-EC y b)AgNPs-EH.....	51
Figura 20: Micrografía obtenida por MET de AgNPs-EH, así como grafica de distribución de tamaños de las mismas	54
Figura 21: Gráfica del porcentaje de viabilidad celular respecto a diferentes dosis de AgNPs-EH y AgNPs-EH sobre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 y macrófagos.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diferentes regiones del espectro Ultravioleta y visible y sus rangos o zonas comprendidas [74]	26
Tabla 2: Principales diferencias y similitudes entre SEM y TEM	32
Tabla 3: Resultados del ensayo MTT de viabilidad celular frente a las AgNPs y extractos.....	55

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
Å	Armstrong
<i>A. muricata</i>	<i>Annona muricata</i>
Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de Plata
AgNPs-EC	Nanopartículas de Plata biosintetizadas con extracto de cáscara
AgNPs-EH	Nanopartículas de Plata biosintetizadas con extracto de hojas
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
ATP	Adenosín trifosfato
Be	Berilio
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC	Extracto Cáscara
EDS	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (Energy-dispersive Xray spectroscopy)
eF	Nivel de Fermi
EH	Extracto Hojas
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FT-IR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
H ₂ O	Agua
HOMO	Orbital molecular ocupado de más energía
IR	Espectroscopia Infrarroja
keV	kilo-electronvolt
kV	Kilovolts
LaB ₆	Hexaboruro de lantano
Li	Litio
LUMO	Orbital molecular no ocupado de más baja energía
M	Molar
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-468	Línea celular de cáncer de mama
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MTT	[3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, bromuro de 5 difenil-2H-tetrazoilo]
NDA+	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NDAH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina-reducida
OD	Densidad Óptica
RPS	Resonancia Plasmonica Superficial (surface plasmon resonance)
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido (Scanning electron microscopy)
Si	Silicio
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión (transmission electron microscopy)
U	Uranio
UV-Vis	Luz en el rango del ultravioleta y visible

ABSTRACT

Currently treatments for breast cancer are expensive and not very accessible, due to this, it requires the development of new routes of administration, treatments and novel materials, such as the one proposed. Carrying out the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using extracts of a plant well known for its anticancer activity known as "Soursop" (*Annona muricata*); where the main active compounds of *A. muricata* (in leaves, stems and husk) are acetogenins and polyphenols, among others, which means that they can be used as reducing agents; It should be noted that anticancer activity is directly attributed to acetogenins. The biosynthesized AgNPs with leaf extract (AgNPs-EH) and with shell extract (AgNPs-EC) of *A. muricata*; were characterized by means of the UV-Vis technique, to observe the optical properties of the AgNPs, comparing the reaction times against the growth of the optical response known as Surface Plasmonic Resonance (RPS), as well as Transmission Electron Microscopy (TEM), to recognize the morphology and the average sizes of nanoparticle, with the help of the Scanning Electron Microscopy (SEM), a chemical mapping was achieved, to observe the distribution of the AgNPs in the medium, as well as with the help of the EDS technique (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) the elemental chemical composition of the AgNPs was identified. In addition, by means of FT-IR it was possible to identify the vibrational mode of the functional groups present in the extracts. Achieving elucidate the cell viability of AgNPs in cell lines such as MCF-7, MDA-MB-468 and macrophages.

RESUMEN

Actualmente los tratamientos para cáncer de mama son costosos y poco accesibles, debido a esto, se requiere el desarrollo de nuevas vías de administración, tratamientos y materiales novedosos, como el que se propone. Llevando a cabo la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) usando extractos de una planta muy conocida por su actividad anticancerígena conocida como “Guanábana” (*Annona muricata*); donde los compuestos activos principales de *A. muricata* (en hojas, tallos y cáscara) son acetogeninas y polifenoles, entre otros, lo que hace que puedan utilizarse como agentes reductores; cabe señalar que la actividad anticancerígena se le atribuye directamente a las acetogeninas. Las AgNPs biosintetizadas con extracto de hojas (AgNPs-EH) y con extracto de cáscara (AgNPs-EC) de *A. muricata*; se caracterizaron mediante la técnica UV-Vis, para observar las propiedades ópticas de las AgNPs, comparando los tiempos de reacción contra el crecimiento de la respuesta óptica conocida como Resonancia Plasmonica Superficial (RPS), así mismo se utilizó la Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), para reconocer la morfología y los tamaños promedio de nanopartícula, con ayuda de la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) se logró realizar un mapeo químico, para observar la distribución de las AgNPs en el medio, así como con ayuda de la técnica EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) se identificó la composición química elemental de las AgNPs. Además, mediante FT-IR se lograron identificar el modo vibracional de los grupos funcionales presentes en los extractos. Logrando elucidar la viabilidad celular de las AgNPs en líneas celulares como MCF-7, MDA-MB-468 y macrófagos.

INTRODUCCIÓN

Actualmente padecimientos como el cáncer, son tratados con diversas técnicas, como son hipertermia, radioterapias, algunos fármacos, etc. [1, 2]. El desarrollo de nuevas vías de administración, tratamientos y materiales novedosos, como el que se propone, no solo ayudará a tratar una de las enfermedades más prevalentes y devastadoras de la actualidad, si no que al mismo tiempo se contribuirá con el medio ambiente, puesto que haremos uso de una tecnología verde para la fabricación de dicho material.

Las nanopartículas de Plata (AgNPs) poseen múltiples propiedades fisicoquímicas [3] que hoy en día se han combinado con diferentes materiales de origen natural, como parte del tratamiento de enfermedades crónico degenerativas en lo que hoy en día conocemos como “Bionanomedicina” [4, 5]. Debido a las propiedades mejoradas de los materiales de tamaño nanométrico, las AgNPs se utilizan cada vez más en la industria farmacéutica [6].

Por ello se llevó a cabo la biosíntesis de AgNPs usando extractos de una planta muy conocida por su actividad anticancerígena conocida como “Guanabana” (*Annona muricata*) [7]; esta planta es una especie del género *Annona*, de la familia *Annonaceae*, orden *Magnoliales* y división *Magnoliophyta* [8], este árbol tiende a florecer y fructificar la mayor parte del año. Se distribuye en las regiones tropicales de América Central y del Sur, África Occidental y Sudeste Asiático [9], la fruta *A. muricata* es una baya ovoide colectiva comestible, de color verde oscuro [10].

Los compuestos activos de *A. muricata* (en hojas, tallos y cáscara) son acetogeninas y los polifenoles, entre otros [11, 12], lo que hace que puedan

utilizarse como agentes reductor para la biosíntesis de nanopartículas [13]. Cabe señalar que la actividad anticancerígena se le atribuye directamente a las acetogeninas, en específico al grupo funcional “lactona” ya que son las encargadas de bloquear el complejo I a nivel mitocondrial en las células cancerígenas, que convierte el NADH a NAD⁺, y crea la acumulación de protones a través de la membrana mitocondrial, dejando de producir ATP, obligando la apoptosis selectiva [14].

Dichas acetogeninas predominan en hojas y cáscara de *A. muricata*, por esta razón, se han utilizado extractos de los mismos para sintetizar AgNPs, ya que ofrecen propiedades altamente anticancerígenas.

Hoy en día, se conocen varios estudios relacionados directamente con las propiedades de las hojas de *A. muricata* [15-17], , pero poco se sabe sobre el efecto relacionado con la cáscara de *A. muricata* (el cual es un material de desecho [18]). Que, aunque se subestima su condición, ofrece muchas propiedades que superan a las ya conocidas por las hojas de *A. muricata*.

Por ello se ha realizado la biosíntesis de AgNPs con extracto de hojas (AgNPs-EH) y con extracto de cáscara (AgNPs-EC) de *A. muricata*; se caracterizaron mediante la técnica UV-Vis, para observar las propiedades ópticas de las AgNPs, comparando los tiempos de reacción contra el desarrollo de la respuesta óptica conocida como Resonancia Plasmonica Superficial (RPS), así mismo se utilizó la Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), para elucidar la morfología y los tamaños promedio de nanopartícula, con ayuda de la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) se logró realizar un mapeo químico, para observar la distribución de las AgNPs en el medio, así como con ayuda de la técnica EDS (Energy-dispersive X-

ray spectroscopy) se identificó la composición química elemental de las AgNPs. Además, mediante FT-IR se pudieron identificar el modo vibracional del grupo funcional lactona, presente en los extractos. Así mismo, se elucidó la viabilidad celular de las AgNPs en líneas celulares como MCF-7, MDA-MB-468 **cepas de líneas celulares de cáncer de mama** y macrófagos.

CAPITULO I: ANTECEDENTES

1.1 CIENCIA DE MATERIALES

La ciencia de materiales es tan antigua como el hombre mismo, sin embargo, día a día presenta avances novedosos, por ello, ha cobrado suma importancia debido a las múltiples aplicaciones que presenta la materia en la escala de los nanómetros. De aquí se ha derivado a su vez la nanotecnología encargada, principalmente, del diseño, la manipulación, caracterización, producción y aplicación de nanoestructuras, nanodispositivos y nanosistemas, entre otros [19].

1.1.1 NANOTECNOLOGIA

La primera referencia de nanotecnología fue dada en 1959 por uno de los grandes físicos del siglo pasado, el teórico y divulgador Richard Feynman, quien auguró una gran cantidad de nuevos descubrimientos en el caso de poder fabricar materiales de dimensiones atómicas o moleculares [20]. Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas nanométricas ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), lo que hoy se conoce como “Nanotecnología” [21]. Hoy en día es una ciencia multidisciplinaria que puede intervenir no solo en la fabricación de nuevos materiales, sino también en las aplicaciones que la misma nos brinda.

Así mismo la Nanociencia estudia los fenómenos y la manipulación de materiales de magnitudes atómicas y moleculares de materiales del orden atómico y molecular, donde las propiedades que ofrecen son diferentes a escalas mayores [22]. Esta ciencia ha tenido un importante papel en el siglo XXI pues se logra colocar en todos

los ámbitos, tratando de mejorar e innovar constantemente de acuerdo a las necesidades que día a día surgen.

1.1.2 NANOMATERIALES

Un nanomaterial es todo aquel que contenga uno o más componentes que se encuentren en el rango de 1 a 100nm, los cuales pueden ser; nanorodillos, nanotubos, nanopartículas, etc [22].

Los materiales nanométricos presentan características muy diferentes a los materiales macroscópicos, es decir, las propiedades de las nanoestructuras se comportan de manera distinta a los mismos materiales a mayor escala presentando así diferencias fisicoquímicas y eléctricas. En la actualidad estos materiales nanométricos se han empleado como [23]; almacenamiento de datos [24], catálisis [25], y en el área biomédica, tal es el caso de liberación de fármacos y terapia génica [26], obtención de imágenes moleculares diagnósticas [27] y como sensores biológicos [28], entre otros como se muestra en la Figura 1.



Figura 1: Aplicaciones de la nanotecnología (Elaboración propia)

Debido a las múltiples propiedades que ofrecen las nanopartículas, surge la necesidad de manejar y controlar las características de las nanopartículas, tales como forma, tamaño y composición química [29]. Esto se reflejará directamente en sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas, principalmente. Las propiedades de los nanomateriales metálicos son consideradas como únicas debido a las características que presenta la banda de conducción [30]. Las propiedades de un material vienen determinadas por la posición del nivel de Fermi (eF) y su estructura de bandas electrónicas.

Por su composición, los nanomateriales se pueden clasificar en nanomateriales metálicos, semiconductores, **polímeros, cerámicos y nanocompositos** [31]. Por su forma, la clasificación es más compleja, ya que se basa en características tales como esfericidad, llanura y la relación longitud-radio [32]. Los nanomateriales metálicos son de suma importancia debido a la variedad de propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas que presentan, las cuales se basan en la estructura de su banda electrónica y las diferencias de la misma comparada con la banda de un semiconductor, o bien, de un aislante.

Si se compara un metal macroscópico con una nanopartícula metálica, se observan diferencias notables en su reactividad química, así como en su estabilidad cinética y termodinámica, cambios en la relajación fotónica y electrónica, todo esto debido a la elevada relación superficie-volumen [19].

1.1.3 NANOPARTICULAS

Según la ASTM (organización de normas internacionales que desarrolla y publica, acuerdos voluntarios de normas técnicas para una amplia gama de materiales, productos, sistemas y servicios) consideran que las nanopartículas, son partículas ultra finas con longitudes en dos o tres dimensiones superiores a 0,001 micrómetros (1 nanómetro) y menores que aproximadamente 0,1 micrómetros (100 nanómetros) y que pueden o no presentar una propiedad intensiva relacionada con el tamaño [33].

Para la obtención de nanopartículas existen dos procesos básicos, uno de ellos es denominado *bottom-up* en el que se empieza por átomos hasta llegar a la nanopartícula. Dentro de este proceso, el método más importante es el de reducción química de una sal metálica. En este caso también se emplean agentes estabilizantes como polímeros y surfactantes, los cuales controlan el crecimiento de la nanopartícula, y previene la aglomeración de *nanoclusters* [34]. A sí mismo, los métodos de síntesis se pueden dividir en químicos, físicos y biológicos [35]. El otro proceso se denomina como *top-down*, en el cual se parte de un material en bulk, hasta llegar a un material nanoscópico conocido como nanopartícula. Este proceso involucra, un mecanismo físico o mecánico de molienda y posteriormente una estabilización de las partículas [36]. Como muestra la Figura 2, en el primer caso se produce nanomateriales partiendo del nivel atómico, en cambio, la segunda consigue una disminución del tamaño del material, consiguiendo así materiales a nanoescala.

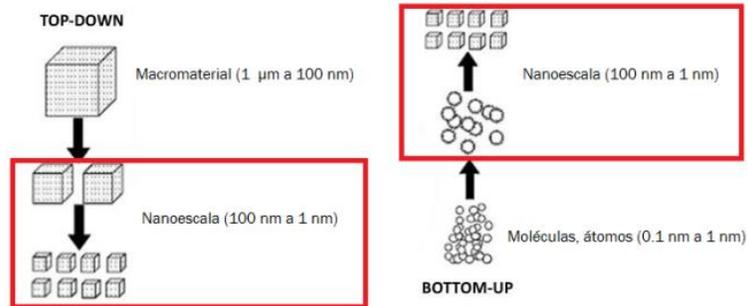


Figura 2: Métodos de síntesis de nanopartículas. (A) "Bottom-up" y (B) "Top-down" [37]

1.1.4 NANOPARTÍCULAS DE METALES NOBLES

Los metales nobles presentan una intensa absorción óptica, cuando la frecuencia del fotón incidente se encuentra en resonancia con la excitación coherente colectiva de los electrones de la banda de conducción. Por ello, las nanopartículas de metales nobles, principalmente, presentan una respuesta óptica denominada Resonancia de Plasmón Superficial (RPS), debido a una radiación ejercida sobre el material a través de un campo eléctrico externo [37]. La frecuencia resonante se encuentra fuertemente ligada al tamaño de la nanopartícula, a su forma y a sus propiedades dieléctricas del medio circundante [38]. Para comprender mejor cómo cambian las propiedades electrónicas de un material metálico al reducir su tamaño, hay que analizar los niveles electrónicos. Se sabe, que la distancia entre los estados energéticos contiguos, aumenta de manera inversa al aumentar el volumen de las partículas. Esto lleva a que el espectro continuo de bandas (que refleja la situación del material masivo bulk), cambie a un conjunto de estados discretos al disminuir el tamaño hasta la escala nanométrica, esto se debe a que las nanopartículas metálicas no pueden ser tratadas como elementos diminutos de un

bloque de metal, y la banda de conducción presente en un metal (bulk), está ausente en estos sistemas y por tanto, se dan los estados discretos de banda (Figura 3).

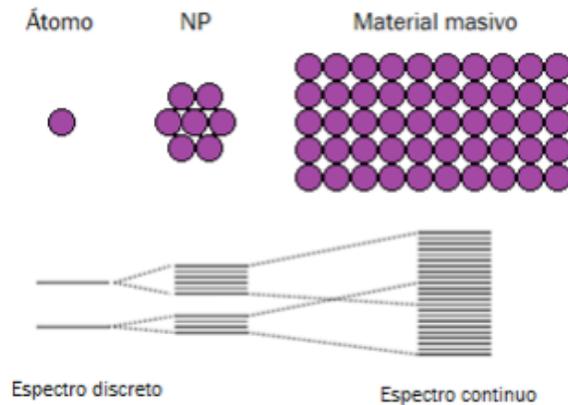


Figura 3: Paso del espectro de un estado discreto desde el átomo a un estado continuo de bandas del material masivo (bulk) [40]

Las partículas a escala nanométrica, han sido empleadas en múltiples aplicaciones médicas. Las propiedades más importantes a considerar para emplear las nanopartículas dependen directamente del tipo de nanopartícula, tamaño y forma, algunas de las propiedades que exhiben ciertas nanopartículas en esta área son: baja toxicidad, biocompatibilidad, pueden administrarse, conjugar [39] o funcionalizar con biomoléculas e incluso con ligantes de reconocimiento selectivo con la finalidad de lograr una especificidad molecular [40].

1.2 NANOPARTICULAS DE PLATA (AgNPs)

Uno de los metales nobles con el que se están sintetizando nanopartículas es la plata (Ag), la cual ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, agente antibacteriano, etc. [41]. En términos médicos las nanopartículas de plata se han utilizado para promover la cicatrización de heridas [42] y quemaduras [43], con aplicaciones potenciales como bactericida, que de una manera significativa logra introducirse en diferentes investigaciones relacionadas con sus características fisicoquímicas [44].

Las nanopartículas de plata poseen múltiples propiedades, que derivan de su tamaño y forma, una de ellas son las propiedades ópticas que brinda, pues debido a que poseen un **plasmon** superficial característico, el cual nos permite por medio del espectro emitido mediante UV-Vis, identificar y hasta predecir el tamaño de las mismas.

Se estima que de todos los nanomateriales utilizados en productos para el consumo, las nanopartículas de plata son las que tienen un mayor grado de comercialización [45].

1.2.1 SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA (AgNPs)

La síntesis de AgNPs en disolución (disolución coloidal) requiere del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las

AgNPs para así obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten una propiedad determinada.

En general, la síntesis de AgNPs metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes:

- i) Precursor metálico
- ii) Agente reductor
- iii) Agente estabilizante.

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento (Figura 4).

El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.) [46].

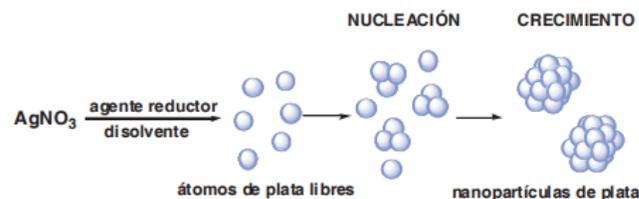


Figura 4: Mecanismo de formación de AgNPs a partir de una reducción química en disolución de sal AgNO_3 [48]

1.2.2 BIO-REDUCTORES

Actualmente se ha optado por biosintetizar nanopartículas utilizando agentes reductores como; metabolitos, extractos vegetales, células, tejidos, semillas, órganos y organismos completos vegetales.

En términos de métodos verdes, existen una clasificación: bioquímicos y biológicos, los cuales a diferencia de los fisicoquímicos, no generan residuos contaminantes, son más económicos y fáciles de obtener [47].

Específicamente la biosíntesis de nanopartículas a través de diversas plantas o raíces como: árnica, ajo, valeriana, té verde, te negro [48, 49], entre otros que ofrezcan esta propiedad, se llevan a cabo a través de la reacción con una solución de 1 a 2 mM de iones de un metal precursor con algún agente biológico, de tal manera que se lleve a cabo la reducción. La síntesis verde de nanopartículas de metales es una reacción redox y ocurre gracias a la capacidad para reducir que poseen los componentes celulares o extracelulares como proteínas, carbohidratos, ácidos orgánicos, fenoles y otros metabolitos [13, 50], los cuales aportan electrones a los cationes de los metales llevándolos a una forma metálica con carga cero y de escala nanométrica [51].

1.2.3 GUANABANA (*Annona muricata*)

La guanábana (*Annona muricata*) proviene de un árbol que pertenece a la familia *Annonaceae* [52], puede llegar a medir de 8 a 10 metros [53, 54], posee hojas perennes, verde brillante [55], y flores que logran aparecer en cualquier lugar en el tronco o cualquier rama. La composición de la guanabana consiste en 67,5% de pulpa comestible, 20% cáscara y 8,5% de semillas [56]. Dicha pulpa contiene de 80 a 81% de agua, 1% de proteína, 18% de hidratos de carbono, 3,43% de acidez titulable, 24,5% de azúcar, y vitaminas B1, B2, y C [57, 58]. Además cuenta con diferentes aminoácidos como Prolina y ácido γ -aminobutírico [59]. Otros aminoácidos detectados, en orden de cantidad relativa, fueron ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, serina, alanina, citrulina, cisteína (o cistina), arginina y lisina [60].

En medicina tradicional han sido aplicados para tratar diversas dolencias tales como fiebre, dolor, enfermedades respiratorias y la piel, parásitos internos y externos, las infecciones bacterianas, la hipertensión, la inflamación, la diabetes y el cáncer [61]. Estudios recientes muestran citotoxicidad en cultivos de líneas celulares de cáncer, como carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, y adenocarcinoma de colon [62]. La efectividad se deriva de las propiedades intrínsecas de la guanábana, que logran tener un efecto tóxico a nivel celular y por ende ocasionar apoptosis, derivada de la vía de estrés en el retículo endoplásmico [62].

1.3 CÁNCER DE MAMA

En la actualidad una de las enfermedades más prevalentes y fulminantes es el cáncer, la palabra *cáncer* es griega y significa *cangrejo* [63]. La proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células con genes mutados, los cuales actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular pertenecientes a distintos tejidos de diferentes órganos.

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, ya que representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519 000 mujeres por cáncer de mama y aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo [64].

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos [65]. Las bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, que hace que un alto porcentaje de mujeres acudan al médico con la enfermedad ya muy avanzada, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento [66].

Cabe señalar que en México, cada 90 min muere una mujer debido a este padecimiento, mientras que la secretaria de salud diagnostica a una mujer cada 30 min [67].

Hoy en día existen múltiples técnicas para tratar este padecimiento, sin embargo, día a día se intenta implementar fármacos o vías de administración más efectivas y con menos riesgos a la salud [68].

1.3.1 LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS

La carcinogénesis u oncogénesis es el proceso por el cual una célula normal se convierte en una célula cancerosa, de ahí que los tumores cancerosos se caracterizan por la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células con genes mutados, los cuales actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular pertenecientes a distintos tejidos de diferentes órganos [69]. Actualmente existen diferentes variedades de líneas celulares de cáncer de mama, las cuales han sido obtenidas de pacientes. Las líneas celulares cancerígenas pueden clasificarse de acuerdo al estado en el cual fueron obtenidas, ya sea de un tumor primario o bien de una metástasis [70]. Por esa misma razón se utilizaron en esta investigación, líneas celulares cancerígenas obtenidas de una metástasis, en específico de metástasis a líquido pleural, de carcinoma intradual, como son la MCF-7 Y MDA-MB-468, siendo líneas celulares de carácter hormonodependientes y hormonoindependientes respectivamente [70].

1.3.2 CULTIVO CELULAR

En el año de XX se ubican los primeros cultivos celulares, cuando Harrison 1907 y Carrel 1912 lograron cultivar fragmentos de tejidos. En la actualidad se han estandarizado varios métodos y medios de cultivo para realizar cultivos de diferentes líneas celulares. Estos métodos permiten evaluar diferentes respuestas

en especial citotoxicidad. Es importante reconocer que los principales conocimientos in vitro que tenemos sobre el cáncer de mama se basan en esta técnica [71].

1.3.3 CUANTIFICACIÓN CELULAR

Cuando se trabaja con células en este caso cancerígenas y requerimos evaluar la viabilidad celular respecto a un agente anticancerígeno, la cuantificación es sumamente importante, así como las condiciones de crecimiento o el inicio de experimentos en los cuales el número de células utilizado debe ser preciso.

Existen dos formas de cuantificar las células; **una de ellas es**; donde directamente se cuantifica de la placa de cultivo o pocillo tomando una muestra significativa mediante la cámara de Neubauer; y **la otra manera**, esta se hace mediante la cuantificación de determinadas estructuras celulares o bien por medio de la medición del metabolismo celular. Existe un método estandarizado que se utiliza **comúnmente**, el cual es el ensayo MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, bromuro de 5 difenil-2H-tetrazoilo]; esta es una sal de tetrazoilo que mediante la deshidrogenación mitocondrial de células viables se obtiene como producto el formazano [72].

1.3.3.1 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT

El ensayo de viabilidad celular mediante la reducción del MTT es una técnica para medir la respuesta celular a un fármaco o un tóxico, en este caso las AgNPs (EH y EC), que además ofrece información sobre la viabilidad, muerte y las actividades metabólicas celulares. La aplicación más importante ha sido en encontrar dosis

adecuadas para tratamientos médicos (fármacos) en quimioterapia [73]; además es un medio importante para evaluar los mecanismos de toxicidad causada por las nanopartículas.

El ensayo colorimétrico por medio del MTT fue descrito por Mosmann en 1983 para medir la citotoxicidad y la proliferación celular. Se descubrió que el MTT produce un color intenso tras la reducción celular debido a la formación de formazano (Figura 5). Por lo tanto, la producción de formazano refleja el estado funcional de la cadena respiratoria. La actividad metabólica de las células incluye deshidrogenasas. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en su formazano color violeta, el cual indica proliferación celular.

Sin embargo, El MTT, tiene una desventaja, ya que el formazano es extremadamente insoluble en agua, lo que parece limitar la aplicación.

Actualmente el ensayo de MTT es usando como un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de enzimas mitocondriales de células viables para transformar la sal de tetrazoilo en formazano. Los métodos colorimétricos requieren menos tiempo y son mucho más económicos, se logran identificar mediante un espectrofotómetro de barrido de 96 pocillos que generalmente permite procesar una gran cantidad de muestras [74].

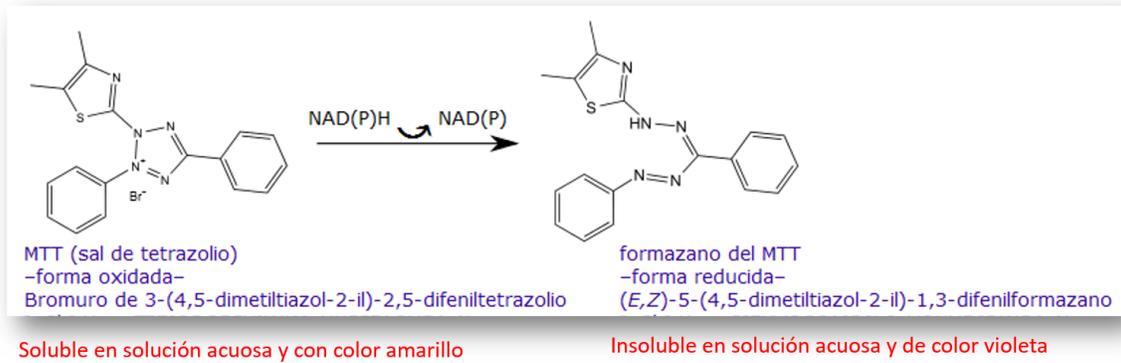


Figura 5: Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT [72]

CAPITULO II: TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.1 ESPECTROSCOPIA

La espectroscopia es una técnica de análisis que se basa en la absorción de radiación por parte de las moléculas, específicamente se refiere a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, se basa principalmente en la interacción materia – radiación electromagnética, y a las mediciones desde una determinada longitud de onda [75].

La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía (fotones); la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía.

La longitud de onda, del movimiento ondulatorio por el cual es transmitida la energía radiante varía en un intervalo amplio, la magnitud de esta longitud sirve como medio para clasificar las diversas formas de radiación electromagnética [75].

2.1.1 ESPECTROSCOPIA UV-Vis

La base de la espectroscopia Visible y Ultravioleta consiste en medir la radiación absorbida en UV a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Esta relación establece que para una misma especie absorbente en una celda de espesor constante, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración [76].

La espectroscopia UV-Vis es una técnica de absorción que involucra la absorción de luz ultravioleta y visible por parte de una molécula promoviendo el paso de un electrón desde un orbital molecular fundamental a un orbital excitado; es decir, que origina que un electrón sea excitado del orbital de baja energía LUMO (de sus siglas en inglés Lowest Unoccupied Molecular Orbital) al de energía más alta HOMO (de sus siglas en inglés Highest Occupied Molecular Orbital). Produciendo transiciones de electrones desde niveles energéticos bajos a niveles más altos; transiciones entre un orbital enlazante o un par de electrones libres y otro orbital incompleto antienlazante.

La separación energética entre estos orbitales moleculares corresponde a las longitudes de onda del visible (tabla 1). Dichas longitudes de onda se encuentran aproximadamente entre 190 y 780 nm situadas en la zona del ultravioleta visible. En el espectro UV-VIS normalmente sólo se aprecian 2 ó 3 grandes bandas. Las bandas son anchas porque los electrones pueden tener muchos niveles energéticos dependiendo del entorno (vibraciones y/o rotaciones), de manera que lo que se suele representar como un nivel energético en realidad son muchos subniveles y son posibles todas las transiciones..

Tabla 1: Diferentes regiones del espectro Ultravioleta y visible y sus rangos o zonas comprendidas [74]

Rango de longitudes de Onda (nm)	Color absorbido	Color Transmitido (Observado)
100-190	Ultravioleta del vacío	Ninguno
190-380	Ultravioleta Cercano	Ninguno
380-435	Violeta	Amarillo-Verde
435-480	Azul	Amarillo
480-500	Verde-Azul	Naranja-Rojo
500-560	Verde	Púrpura
560-580	Amarillo-Verde	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Verde-Azul
650-780	Rojo	Azul-Verde

El espectrofotómetro recoge todas estas pequeñas variaciones de absorción y da una banda ancha. No se da el valor del intervalo sino de la transmitancia máxima. La transmitancia y la absorbancia se miden en un instrumento llamado espectrofotómetro, la solución del analito se debe contener en algún recipiente transparente, tubo o celda [75].

En un espectrofotómetro, la luz de una fuente continua pasa a través de un monocromador (un prisma, rejilla de difracción o filtro), el cual aísla las radiaciones de las longitudes de onda deseadas a partir de las radiaciones heterocromáticas que inciden o se reflejan desde el objeto, seleccionando así una banda estrecha de longitudes de onda de luz incidente (Figura 6). Esta luz monocromática atraviesa una muestra de espesor conocido, contenida en una celda o cubeta fabricada con material que permite el paso de la radiación en la región espectral que interesa, para luego medir la potencia radiante de la luz que sale por medio de un detector [75].

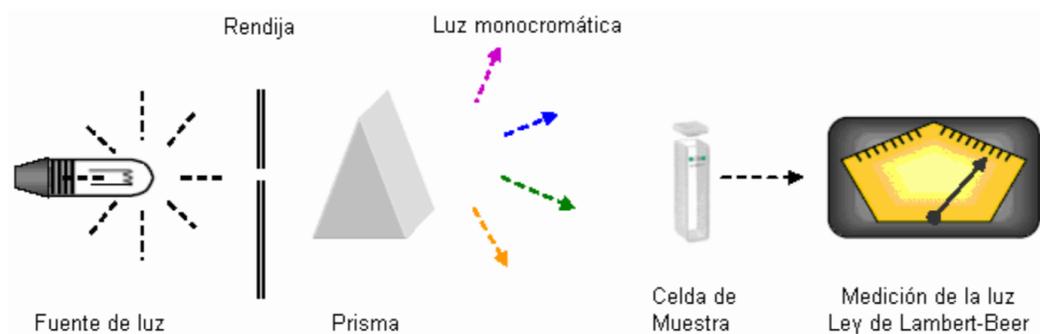


Figura 6: Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante [75]

El objetivo principal de utilizar esta espectroscopia como técnica de caracterización de nuestro material se debe a la propiedad antes mencionada de las nanopartículas, conocida como resonancia plasmónica superficial, la cual consiste en una oscilación colectiva de los electrones que resulta de su interacción con la radiación electromagnética (luz visible) como se muestra en la Figura 7. El campo eléctrico de la radiación electromagnética induce a la formación de un dipolo en la nanopartícula, creándose en esta una fuerza restauradora para compensar el efecto del dipolo producido, resultando en una longitud de onda de resonancia que confiere el color tan característico de las disoluciones coloidales de las nanopartículas metálicas [44].

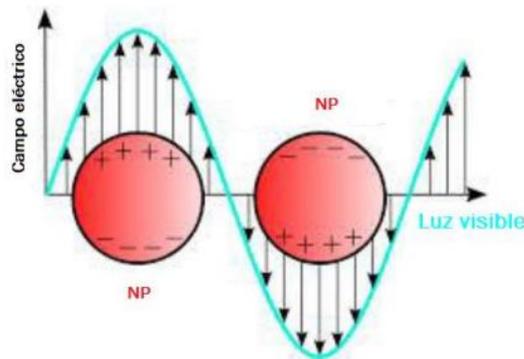


Figura 7: Efecto de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) en las nanopartículas metálicas [76]

Por lo tanto, la oscilación dipolar, está en resonancia con la radiación incidente a una frecuencia específica que dependerá del tamaño y forma de las nanopartículas metálicas.

2.1.2 ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

La espectroscopia vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas, en particular la espectroscopia infrarroja (IR) donde su región correspondiente al espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$. Esta se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000-400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales, aunque desde la década de los 80 la utilización del NIR ha experimentado un innegable auge. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra. Por su parte el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. Es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados y proporciona información útil en estudios estructurales [77].

La Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier, también llamada FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), se desarrolló para solventar las limitaciones de los instrumentos dispersivos, en particular el lento proceso de barrido; por ello se empleó un dispositivo óptico muy simple, llamado interferómetro. El interferómetro produce un tipo de señal único (interferograma) que contiene todas las frecuencias infrarrojas codificadas; la señal se puede medir de forma rápida, en unos cuantos segundos. Un espectrómetro por transformada de Fourier consta de tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector como se muestra en la figura 8.

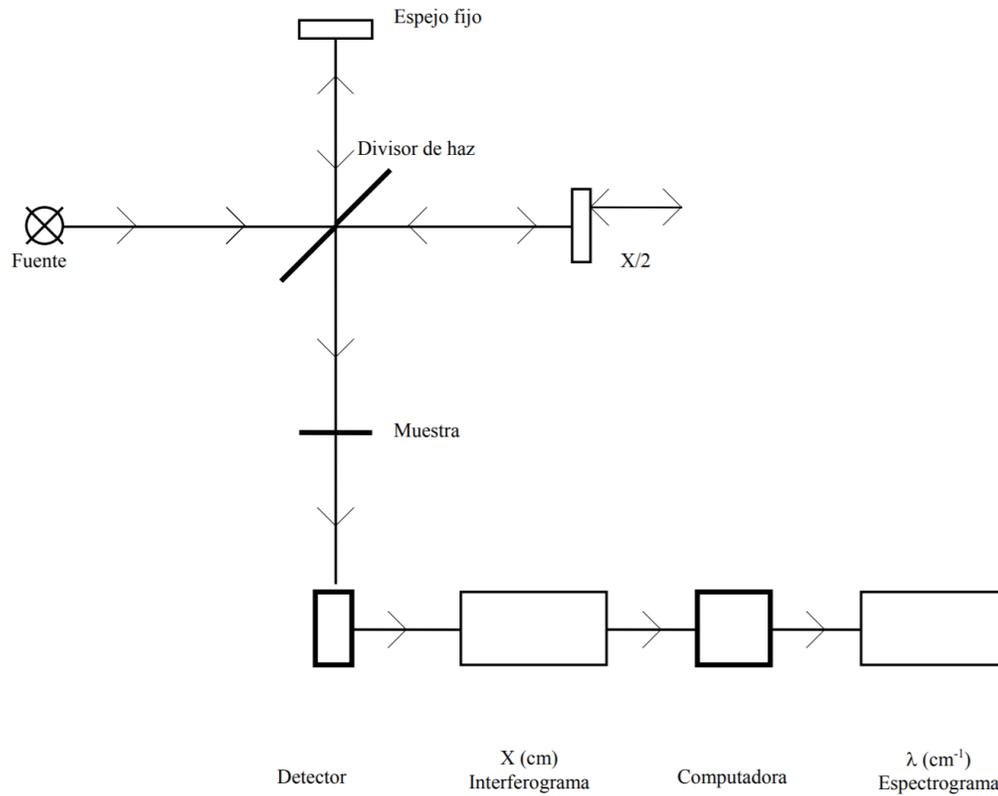


Figura 8: Diagrama de un espectrómetro por transformada de Fourier [78]

Así mismo, el equipo FTIR se subdivide de dos partes; una parte (operación mecánica), codifica y modula la información espectral empleando un interferómetro de Michelson a través del detector; y la otra parte (operación matemática), procede al procesado de la información codificada mediante un procesador (computadora) para producir el espectrograma (decodificación). Como todo el espectro IR se mide de forma continua, todos los analitos activos en IR se pueden identificar y determinar su concentración [78].

2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La posibilidad de observar muestras íntegras y en sus tres dimensiones mediante la microscopía electrónica, fue hecha realidad con la aparición del scanning electron microscope (SEM) o microscopio electrónico de barrido, en el año 1965. Sin embargo, los conceptos básicos para este tipo de microscopía fueron propuestos por Knoll en 1935, tres años después de que Ruska y Knoll lo hicieran para el transmission electron microscope (TEM) microscopio electrónico de transmisión. Mientras que en el desarrollo de este último se hicieron grandes y rápidos progresos hasta el punto de que en 1939 Siemens y Halske comercializaron el primer TEM, la microscopía de barrido tendría que esperar hasta que, en 1965, Cambridge Instrument Co. lanzase el primer SEM. Desde entonces hasta la fecha, este tipo de microscopía ha avanzado rápidamente constituyéndose en una técnica imprescindible en distintos tipos de estudio, tanto sobre material biológico como en el campo inorgánico. A continuación se muestra en la tabla 2 las principales similitudes y diferencias entre el SEM y el TEM [79].

Tabla 2: Principales diferencias y similitudes entre SEM y TEM

TEM	SEM
Necesidad de alto vacío	Necesidad de alto vacío
Haz electrónico estático	Haz electrónico móvil
Haz electrónico no puntual	Haz electrónico puntual
Necesidad de secciones ultrafinas	Muestras íntegras
Electrones transmitidos	Electrones secundarios
Lente proyectora	Ausencia de lente proyectora
Pantalla en el interior de la columna	Pantalla en tubo Brown
Imagen en dos dimensiones	Imagen tridimensional
Resolución de 0,5 nm	Resolución de 10 nm
Aumentos hasta 500.000	Aumentos hasta 140.000
Contraste químico de la muestra	Contraste no químico

2.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DE ENERGÍA DISPERSA (EDS)

El análisis micro elemental SEM-EDS utiliza espectroscopía de rayos x de energía dispersa (EDS por sus siglas en inglés) que analiza los rayos x generado como producto de la interacción del haz de electrones de un microscopio electrónico de barrido con material sometido a análisis para la identificación y cuantificación de rayos x característicos de todos los elementos del número atómico 4 (Be) a 92 (U). El análisis cualitativo implica la identificación de las líneas en el espectro y es bastante sencillo debido a la simplicidad de los espectros de rayos X. El análisis cuantitativo (determinación de las concentraciones de los elementos presentes)

implica medir las intensidades de línea para cada elemento en la muestra y para los mismos elementos en los estándares de calibración de composición conocida.

Al escanear el haz en un **ráster** y mostrar la intensidad de una línea de rayos X seleccionada, se pueden producir imágenes de distribución de elementos o "mapas". Además, las imágenes producidas por los electrones recolectados de la muestra revelan la topografía de la superficie o las diferencias en el número atómico medio según el modo seleccionado. El microscopio electrónico de barrido (SEM), que está estrechamente relacionado con la sonda de electrones, está diseñado principalmente para producir imágenes de electrones (Figura 9), pero también se puede usar para el mapeo de elementos, e incluso para el análisis de puntos, si se agrega un espectrómetro de rayos X [80].

Para la detección se emplea un detector fabricado con silicio (Si) y litio (Li) en estado sólido que capta los rayos x para luego ser enviados a un amplificador de señal y convertidores de señal que envían la información a un analizador o sistema de cómputo que presenta la información (conteos por segundo – cps) contra energía de emisión (keV) [80, 81].

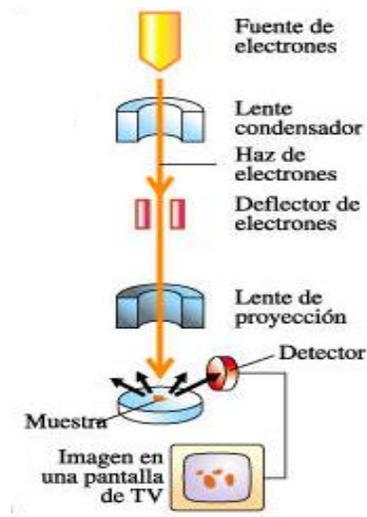


Figura 9: Proceso de formación de la imagen de un microscopio electrónico de barrido

2.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Un microscopio electrónico de transmisión utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, ya que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible, esto se debe a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de luz. El microscopio electrónico de transmisión consiste fundamentalmente de un cañón de electrones (su fuente de iluminación), lentes condensadoras, lentes objetivas, lentes intermedias y lentes proyectoras. El cañón electrónico es la única lente electrostática que tiene el microscopio electrónico; las demás son lentes electromagnéticas.

La amplificación de la imagen es llevada a cabo de la siguiente manera: la imagen producida por la lente objetiva sirve como objeto para la lente intermedia, la cual producirá una segunda imagen, que a su vez es amplificada por la lente proyectora

para producir la imagen final en la pantalla o en una placa fotográfica como se muestra en la Figura 10.

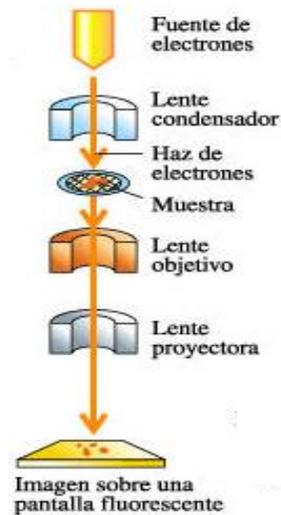


Figura 10: Proceso de formación de la imagen de un microscopio electrónico de transmisión

Cuando un haz de electrones interactúa con la muestra se producen varios tipos de señales, que nos permiten hacer la caracterización estructural y química de ésta. Las señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos. La Figura 11 muestra esquemáticamente la interacción del haz electrónico- muestra y las señales que se originan.

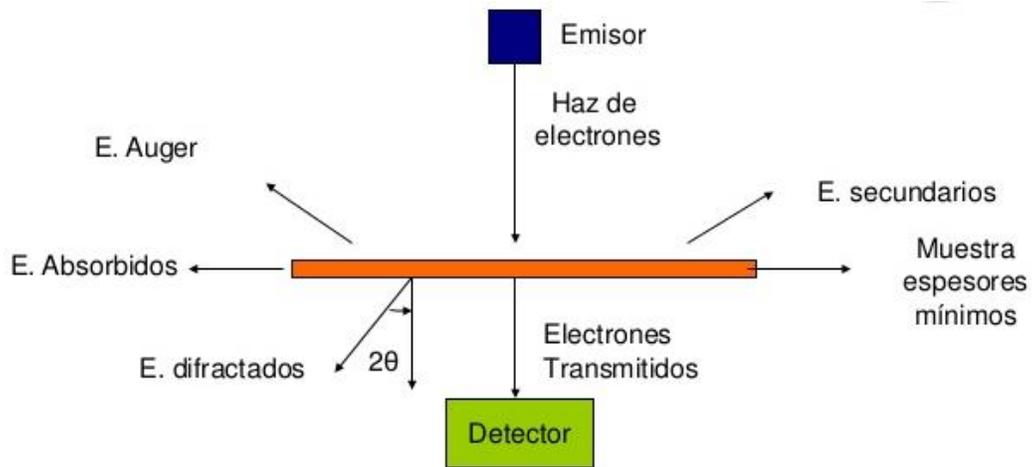


Figura 11: Tipos de señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra

Los electrones retrodispersados y secundarios nos dan información sobre la superficie de la muestra, permitiendo obtener una imagen topográfica de ella. Los electrones absorbidos, con el detector adecuado, nos dan información sobre la resistividad de la muestra. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, permiten hacer un análisis químico de ella. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones directos que han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro/brillante) [82].

En función de lo antes descrito se planteó lo siguiente;

HIPOTESIS

Las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos de *Annona muricata* inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer como MCF-7 y MDA-MB-468.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el porcentaje de inhibición de las nanopartículas de Plata sintetizadas a partir de extractos de *Annona muricata*, en las líneas celulares de cáncer como MCF-7 y MDA-MB-468.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Biosintetizar nanopartículas de Plata a través de extractos de hojas y cáscara de *Annona muricata*, con tamaños menores de 50 nm.
- Caracterizar mediante UV-Vis.
- Caracterizar mediante SEM y TEM las nanopartículas.
- Caracterizar los extractos de hojas y cáscara de *Annona muricata* mediante la técnica FTIR.
- Evaluar la respuesta antiproliferativa de nanopartículas de Plata a través del método MTT (3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil bromuro de tetrazolio), en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468.

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1 Recolección y conservación de hojas y cáscara de *A. muricata*

Las hojas y frutos de *A. muricata* fueron recolectados en el estado de Morelos, en el municipio de Xochitepec (18 ° 46'52''N, 99 ° 12'02''W), el área de recolección se muestra en la figura 12.

Las hojas y los frutos de *A. muricata* se caracterizaron en el Herbario de la Facultad de **Ciencias UAEMex. Respecto** a la fruta, se separó de la cáscara. Dichas hojas y cáscara se lavaron por tres veces con agua destilada para eliminar las impurezas, se dejaron secar al aire durante 15 días, para su posterior molienda.



Figura 12: Área de recolección de las hojas y cascara de A. muricata [Imágenes propias]

3.2 Biosíntesis de las Nanopartículas de plata con extractos de *A. muricata*

3.2.1 Preparación de extracto acuoso de hojas (EH) y cáscara (EC) de *A. muricata*

La solución del extracto se preparó hirviendo 1 g de la cáscara seca en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada durante diez minutos a 100 ° C. El extracto se filtró y se almacenó a 4 ° C para su uso posterior [68]. Se utilizó el mismo proceso para preparar el extracto de hojas (Figura 13).

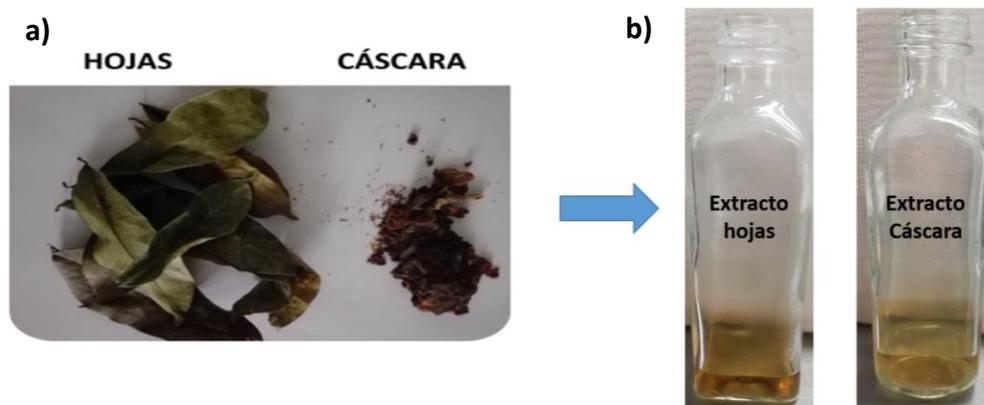


Figura 13: Imágenes de hojas y cascara de *A. muricata*, a) tras el proceso de secado, b) extracto.

3.2.2 Preparación de la solución de nitrato de plata

Se preparó una solución madre de nitrato de plata al 1×10^{-2} M, en 100 ml de agua destilada.

3.2.3 Síntesis de Nanopartículas de Plata:

Se realizó un análisis experimental, donde se hicieron diferentes pruebas variando concentraciones de extractos y de nitrato de plata, las cuales fueron (1:2,1:1,2:1)

como se muestra en la Figura 14, se determinó la mejor concentración mediante UV-Vis y se encontró que en los dos casos las mejores concentraciones fueron 1:1, y se procedió a realizar la síntesis como se describe a continuación.

AgNPs Extracto Cáscara AgNPs Extracto Hojas

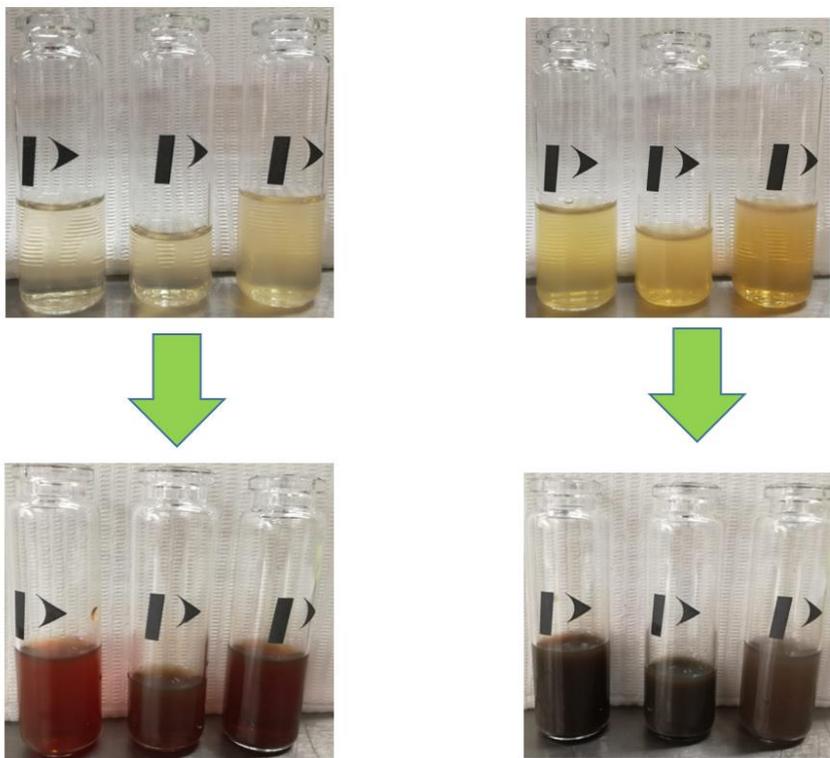


Figura 14: Cambio de coloración de los extractos tras seis horas de agregar el nitrato de plata

Se usó extracto recién obtenido para la reducción de iones Ag^+ a Ag^0 , en donde 5 ml de extracto de cáscara y hojas por separado se agregaron a 5 ml de solución acuosa de nitrato de plata a una concentración de 1 mM. Se realizó el mismo proceso para preparar las nanopartículas de plata utilizando extracto de hojas. Los iones de plata se redujeron a nanopartículas de plata en 6 horas.

3.3 Caracterización

3.3.1 Caracterización de propiedades ópticas de las AgNPs

Las propiedades ópticas de las AgNPs se determinaron empleando la técnica espectroscópica UV-Vis, con el equipo Varian Cary 5000 de doble haz, diluyendo **2 ml** de las Nanopartículas de Plata en H₂O desionizada hasta llenar la celda del equipo. Se analizó en un intervalo de 200-800nm, en modo de absorción.

3.3.2 Caracterización morfológica y estructural de las AgNPs

Se caracterizaron las propiedades estructurales de las nanoestructuras formadas, tales como morfología, tamaño de partícula y distribución de las mismas, para ello se empleó un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) JEOL-2100 de 200 kV con filamento de LaB₆. Colocando una gota de la muestra de AgNPs en una rejilla hasta **sequedad**, posteriormente se introdujo al portamuestras y se ensambló en el equipo.

A si mismo se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) realizando un mapeo químico de los principales elementos presentes, además de realizar un análisis EDS para determinar e identificar los mismos.

3.3.3 Caracterización de los principales grupos funcionales presentes en los extractos de *Annona muricata* y AgNPs

Con ayuda de la técnica FTIR y del equipo Bruker, modelo TENSOR 27. Se reconocieron los principales grupos funcionales que están presentes en el extracto, además de justificar la presencia de las AgNPs, colocando una gota sobre el dispositivo de análisis, **operando en modo transmitancia de 600 a 4000 cm⁻¹.**

3.4 Ensayo de viabilidad celular

Las líneas celulares MCF7, MDA-MB-468 y macrófagos, se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Las células fueron encubadas en placas de 96 pocillos aproximadamente con 5×10^4 células a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Las células se trataron con diferentes concentraciones de nanopartículas biosintetizadas (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 h de incubación. Después, se añadieron 100 microlitros de MTT (a una concentración de 0.2 mg/ml) en cada pocillo y se incubaron durante 4 h (Figura15).

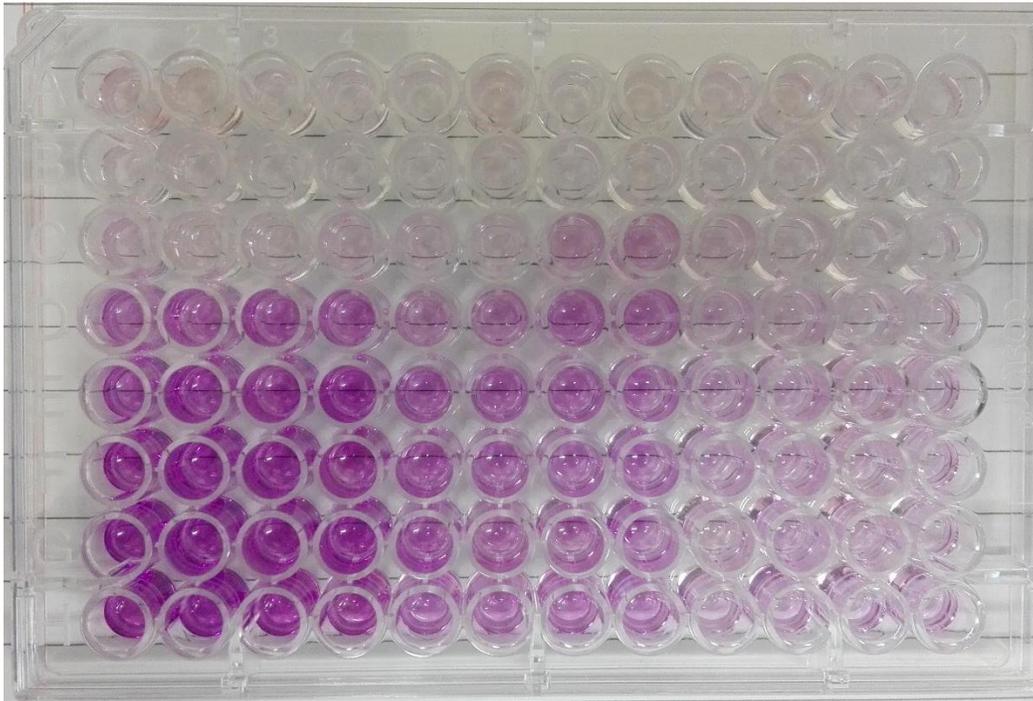


Figura 15: Ensayo de viabilidad celular (Método MTT)

Posteriormente se retiró el MTT junto con el medio de cultivo. Los cristales de color púrpura formados se disolvieron en 100 microlitros de Dimetilsulfóxido y se observaron a 540 nm en un pozo multi-lector de placas de ELISA. La densidad

óptica (OD) se convirtió a porcentaje de viabilidad mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular} = \frac{\text{el valor de la OD experimental de las muestras}}{\text{el valor de la OD experimental del control}} \times 100$$

Así se obtuvo la desviación estándar y el porcentaje de la misma. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.4.1 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo de los datos y de acuerdo a las pruebas de normalidad se decidió si aplican pruebas de estadística paramétrica o en caso contrario con pruebas no paramétricas, como Kruskal-Wallis o Wilcoxon respectivamente, siendo $p \leq 0.05$ para considerarse estadísticamente significativo.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

En el contexto de la generación de nanopartículas y como parte de un método bottom up, se deben reconocer diferentes variables para la formación de AgNPs como: temperatura, tiempo de reacción, concentración de extractos y de precursores de iones metálicos como de AgNO_3 , etc. Por ello se determinó realizar una síntesis verde, lo cual garantiza de muchas formas generar nanopartículas sin necesidad de utilizar reductores químicos, así mismo la síntesis se realizó a temperatura ambiente, además de utilizar una concentración muy baja de la sal precursora, lo cual implica costos bajos, simplicidad y un menor impacto ambiental. Por otro lado, Ramachandran et al., han identificado algunos metabolitos de las plantas como el ácido ascórbico, el ácido cítrico, péptido cíclico, ácido elágico, ácido gálico, ácido retinoico, ácido sórbico y el avina se han identificado como compuestos responsables de la reducción en la síntesis de AgNPs. Además de proporcionar propiedades específicas, con efectos antibacteriales, anticancerígenos y antioxidantes [83].

Es importante reconocer el cambio de color característico de las AgNPs, como se muestra en la Figura 13 los extractos de hojas y de cáscara sufren un cambio de color al reducirse los iones de plata, en este caso de un color amarillento (siendo el extracto de cascara un poco más ámbar que el extracto de hojas) a un marrón intenso, la mayoría de los autores exponen un color amarillento por parte de los extractos, que al reaccionar con el AgNO_3 , cambia de café a café- ámbar [84], en específico, Santhosh et al. ha logrado sintetizar AgNPs a partir de extractos de hojas

de *A. muricata* y describe la reducción de iones de Ag mediante el cambio de coloración del extracto acuoso de un color amarillento a marrón en un tiempo determinado [84].

4.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

4.2.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA UV-Vis

Como bien es sabido las AgNPs ofrecen una respuesta óptica conocida como resonancia plasmónica superficial (RPS), al mismo tiempo se sabe que de alguna manera se puede inferir la distribución de tamaños y la forma de las AgNPs a través de la amplitud de la banda y la posición de la banda máxima de absorción [85]. En base a este fundamento se realizó la selección de la mejor concentración tanto de AgNO₃, así como de los extractos, como se muestra en la Figura 14, siendo en ambos casos la mejor concentración 1:1, se monitoreo la reacción hasta observar la banda máxima de absorción respecto al tiempo, lo cual llevó a identificar un periodo de formación de nanopartículas de seis horas en ambos casos como se muestra en la Figura 16, en el caso de las AgNPs-EH (Figura 16a) la banda máxima de absorción se registró en 447 nm, mientras que las AgNPs-EC (Figura 16b) tienen una banda máxima de absorción en 448 nm. Las nanopartículas de plata suelen registrar una banda máxima de absorción (RPS) que puede aparecer desde 370 nm cuando son muy pequeñas [86] y hasta los 500 nm. Algunos autores como Mallirkajuna et al. obtuvieron AgNPs a partir de extractos naturales como *Ocimum sanctum*, registrando una banda máxima de absorción (RPS) en los 436 nm [87], por otra parte Kumar et al. sintetizo AgNPs a partir de extractos de cáscara de

Annona squamosa y reporta una banda (RPS) en 422 nm [88], así mismo Vivek et al. obtuvo AgNPs usando extractos de hojas de *Annona squamosa* reportando una banda (RPS) en 444 nm [89].

Además se puede observar como aumenta la absorbancia al transcurrir el tiempo de reacción, esto porque se generan más AgNPs, existen diferencias notables entre las AgNPs-EC y AgNPs-EH, la banda de absorción de las AgNPs-EC es más ancha que la AgNPs-EH, sin embargo la absorbancia es menor en las AgNPs-EH, debido a la distribución de tamaños que se encuentra en ambas soluciones coloidales. Así mismo los resultados concuerdan con lo establecido con la literatura [88][89], se puede esperar una morfología cuasi-esférica y nanopartículas con tamaños menores a 50 nm en ambos casos, debido a la posición de la banda máxima de posición transcurridas las 6 horas de reacción.

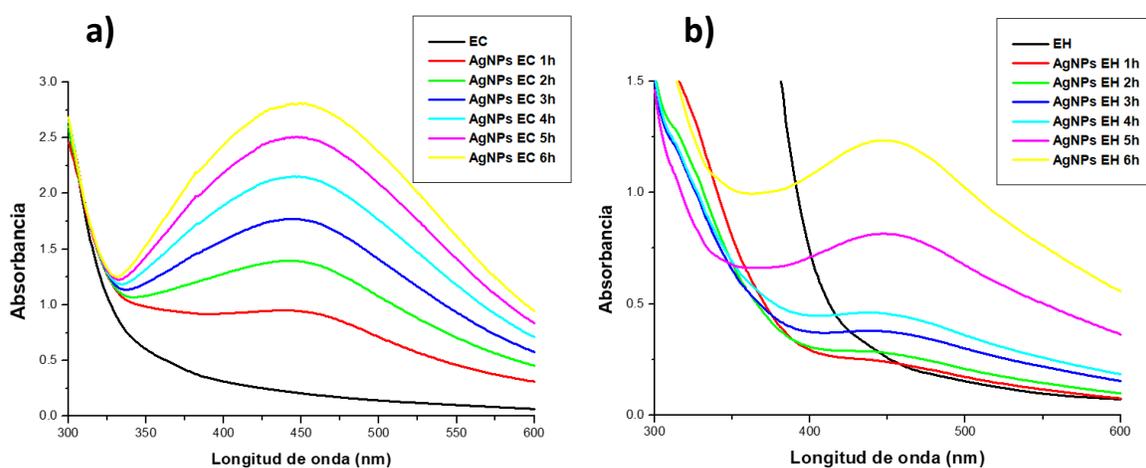


Figura 16: Espectros UV-Vis de a) AgNPs-EC y b) AgNPs-EH, a diferentes tiempos durante la reacción.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA FTIR

El espectro FT-IR la Figura 17 muestra una banda de absorción característica en 1744 cm^{-1} (EC) y 1739 cm^{-1} (EH) característico de un grupo C=O conjugado, sugiriendo la presencia de una γ -lactona- α,β - insaturada que distingue a la gran mayoría de las acetogeninas, demostrando mayor intensidad en el pico del espectro del extracto de cáscara, lo cual podría indicar mayor presencia de acetogeninas en este extracto [90, 91].

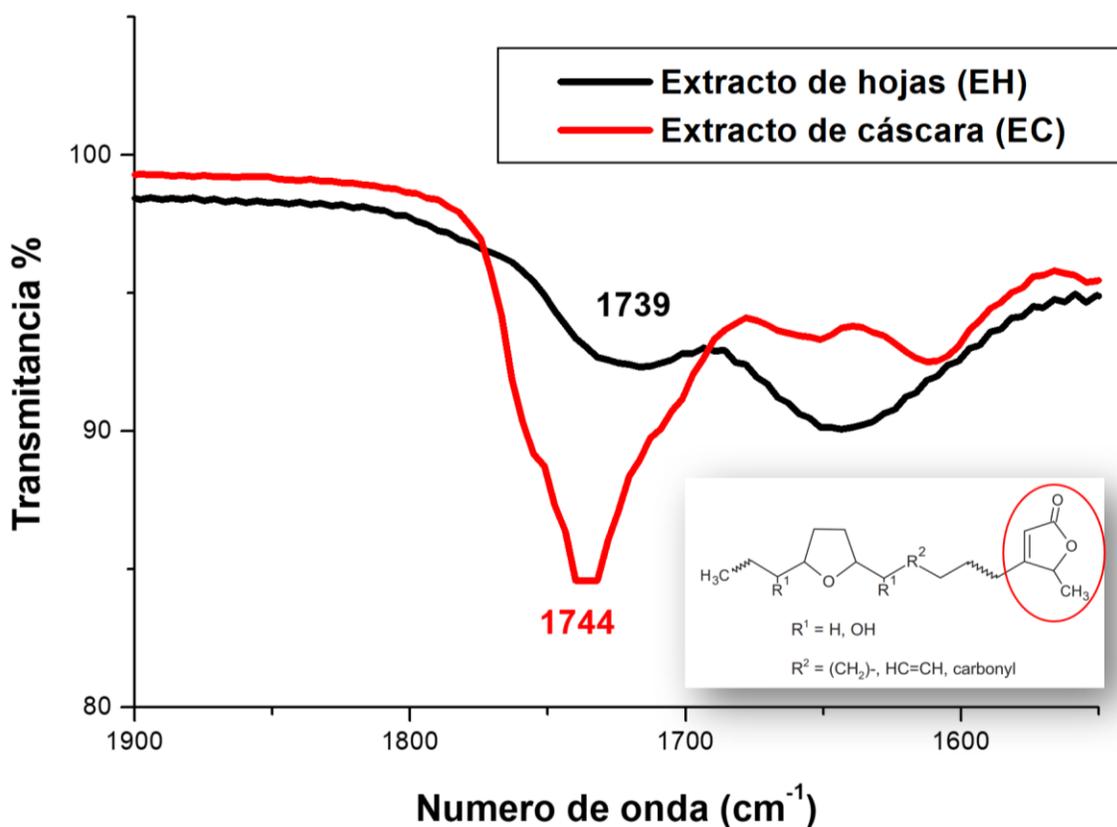


Figura 10: Espectro FTIR de los extractos de hojas (EH) y cascara (EC) de *A. muricata*

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL

4.3.1 ANALISIS ELEMENTAL MEDIANTE SEM-EDS

Se llevó a cabo un análisis SEM/EDS para corroborar la presencia del elemento plata en las AgNPs (EH Y EC) obtenidas a partir de extractos de hojas y cáscara de *A. muricata*, a continuación, se muestra un comparativo de las gráficas de análisis elemental, mapeo químico de las micrografías y el line scan (como se muestra en las Figuras 18 Y 19).

Respecto a las micrografías, se pueden observar diferentes aglomerados (cúmulos más claros y brillantes) de nanopartículas en ambas imágenes (Figuras 18a y 18b). En el análisis por espectroscopia de dispersión de energía (EDS) se logró corroborar la presencia del elemento Plata en la muestra cómo se puede observar en el espectro de las mismas figuras, mientras que en la tabla de composición se señala que el porcentaje de plata es significativo en ambas micrografías, tanto para las AgNPs-EC, así como para las AgNPs-EH, esto debido a la concentración de AgNO_3 con la que se generaron las AgNPs. Así mismo se muestra el Espectro EDS line scan en ambas, sin embargo, se refleja una mayor intensidad en el espectro de las AgNPs-EC (Figura 18a) pero esto podría ser debido a la cantidad de nanopartículas presentes en el aglomerado seleccionado.

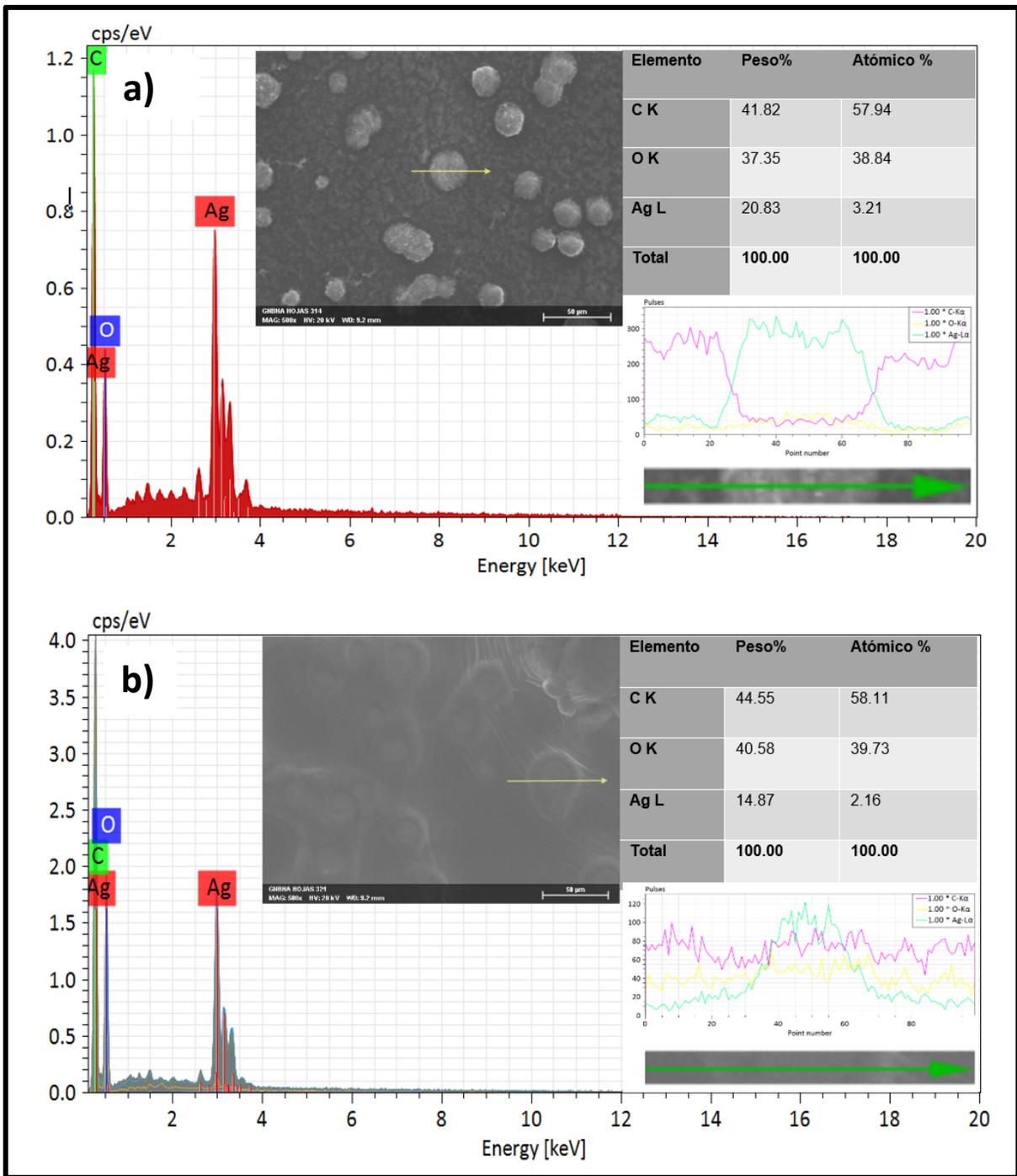


Figura 11: Análisis EDS: comparativo de las gráficas de análisis elemental y line-scan de las nanopartículas generadas, a) AgNPs-EC y b) AgNPs-EH.

Respecto al mapeo químico se obtuvieron los siguientes mapas elementales de ambas nanopartículas (AgNPs-EC y AgNPs-EH). Como se muestra en la Figura 18. Se puede observar que en ambos casos se revela que la superficie de la muestra completa consta de Ag, C y O, como presumiblemente se demostró en los espectros de EDS (Figura 17). El mapa de carbono, oxígeno y plata apoya la interpretación del escaneo **de la línea** mostrado en la Figura 17, concordando con que existe una mayor intensidad del elemento Plata en las AgNPs-EC. Sin embargo, es más que evidente que la mayor presencia de Ag está presente en los aglomerados. Así mismo se observa que las áreas donde hay más presencia de Ag hay menor cantidad de C y O (Figura 18). Otros autores, demuestran **el mismo** comportamiento en sus muestras [92, 93], esto podría ser debido a la preparación de la muestra, ya que al dejar secar la muestra se deben aglomerar las AgNPs.

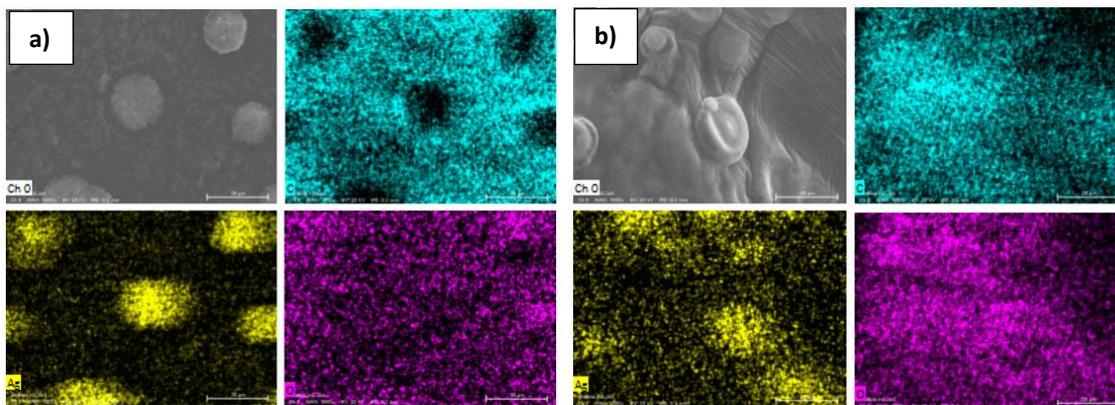


Figura 12: Mapeo químico de los elementos Carbón (color azul), Plata (color amarillo) y Oxígeno (color morado), a)AgNPs-EC y b)AgNPs-EH.

4.3.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO MEDIANTE TEM

Mediante la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se logró elucidar el tamaño y la forma de las AgNPs sintetizadas previamente con hojas y cáscara de *A. muricata*, como se observan en las Figuras 20a y 20b, es evidente que en ambos casos se obtuvieron AgNPs con tamaños menores a 50 nm, cumpliendo con uno de los principales objetivos de esta investigación, ya que ofrece mejores propiedades ópticas [94] y biocompatibilidad [1, 95]. Actualmente Santhosh et al [84] ya ha sintetizado AgNPs con extractos de hojas de *A. muricata*. Sin embargo obtienen un tamaño promedio de nanopartícula de hasta 103 nm, lo cual no es favorable para la aplicación objetivo de esta investigación, por ello se decidió experimentar con diferentes concentraciones tanto de la sal precursora como de los extractos, así mismo Kumar et al. sintetizó AgNPs a partir de extractos de cáscara de *A. squamosa* reportando una gran polidispersidad que va desde los 20 a los 60 nm [88], lo cual sale de los límites permisibles de biocompatibilidad [1, 95].

De igual manera cabe destacar que se obtuvieron AgNPs-EC y AgNPs-EH cuasi esféricas como se muestra en las micrografías de las Figuras 20a.2 y 20b.1. Otros autores lo reportan como formas esféricas irregulares o simplemente esféricas [49, 83], así mismo se observa poca aglomeración, lo cual es importante para el tratamiento en líneas celulares de cáncer de mama, puesto que se podrán dispersar de manera eficaz en el medio.

Por otra parte, se llevó a cabo la medición del diámetro de las nanopartículas observadas en las micrografías tanto de las AgNPs-EC así como de las AgNPs-EH mediante el software imageJ, obteniéndose un tamaño de diámetro promedio de

19.63 ± 3.7 nm para las AgNPs-EH (Figura 20a.1) y, con una polidispersidad de tamaños que van desde los 10 hasta 28 nm. Así mismo se obtuvo el tamaño de diámetro promedio de las AgNPs-EC (Figura 20b.2) el cual resultó ser de 16.56 ± 4.1 nm, observándose una polidispersidad de mayor alcance que va desde los 8 hasta los 26 nm, es evidente que las AgNPs-EC poseen tamaños más uniformes incluso se muestra una menor polidispersidad tanto en los histogramas como en las mismas micrografías respecto a las AgNPs-EH, además se reconoce muy poca aglomeración de AgNPs en ambos casos al mismo tiempo que se observan tamaños menores a 50 nm **refutando** la viabilidad para la aplicación deseada.

Adicionalmente se realizó un análisis con HRTEM tanto de las AgNPs-EC así como de las AgNPs-EH, esto con el fin de corroborar que ambas AgNPs estuvieran conformadas por Ag⁰. Se determinaron los espacios inter-planares con una distancia de 2.339 Å para las AgNPs-EC (Figura 20a.3), que corresponde a la familia de planos (111), de igual manera se midieron las distancias inter-planares de las AgNPs-EH obteniéndose una distancia de 2.040 Å, la cual corresponde a la familia de planos (200) como se muestra en la Figura 20b.3, tomando como referencia la tarjeta JCPDS 00-004-0783.

Micrografías obtenidas por TEM de a.2) AgNPs-EH, a.2) histograma de frecuencias y a.3) HRTEM. b.1) AgNPs-EC; b.2) histograma de frecuencias y b.3) HRTEM.

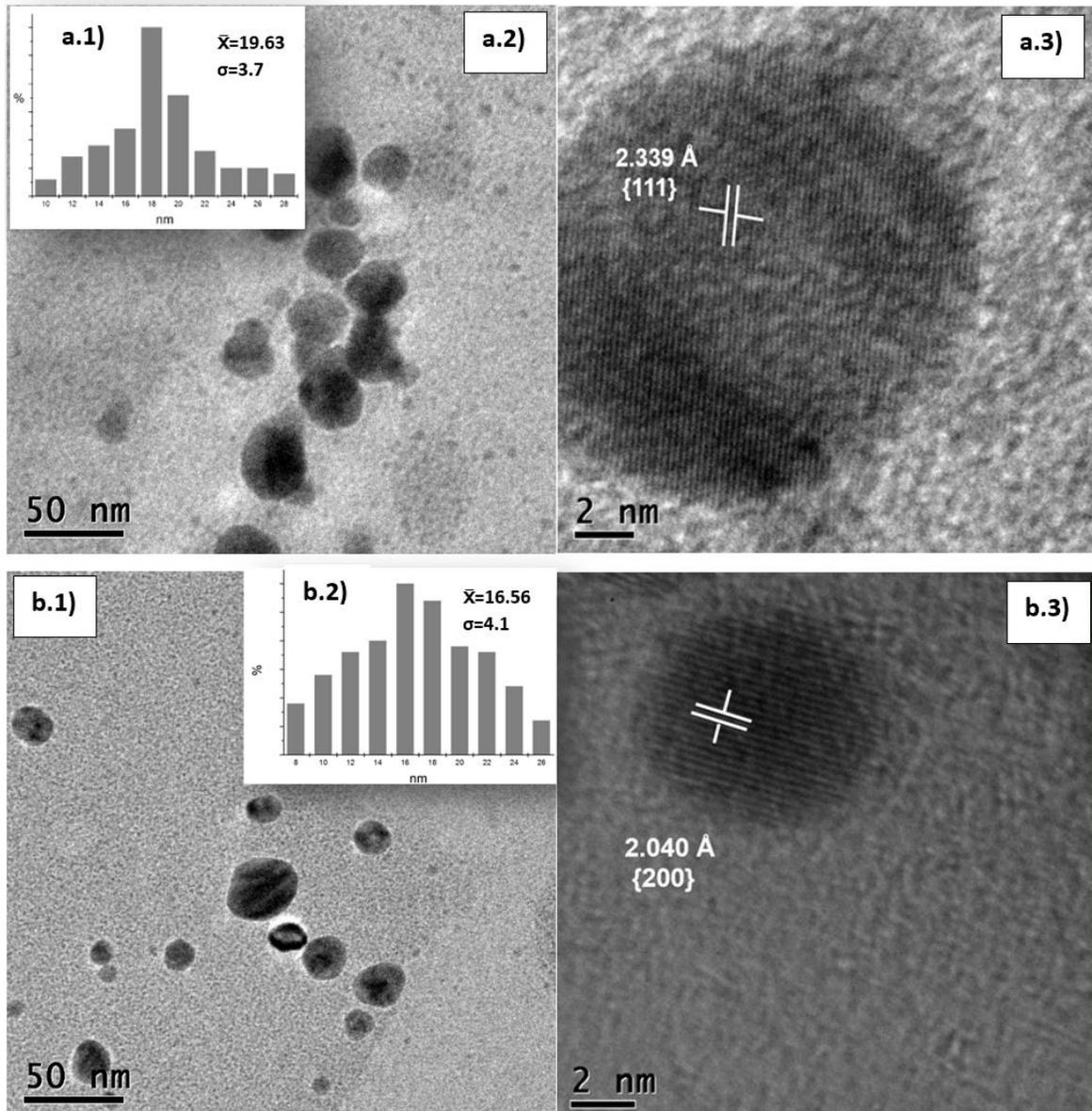


Figura 13: Micrografía obtenida por MET de AgNPs-EH, así como grafica de distribución de tamaños de las mismas

4.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO MTT.

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-468 y macrófagos (RAW- 264.7 ATCC), frente a diferentes concentraciones de AgNPs, mediante el ensayo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, bromuro de 5 difenil-2Htetrazoilo] (MTT). El ensayo con MTT indica cuál de las concentraciones de AgNPs inhibe mayor cantidad de células de cáncer de mama, así como utilizar como referencia selectiva Macrófagos (Tabla 3), evaluando mediante el mismo ensayo (MTT).

Tabla 3: Resultados del ensayo MTT de viabilidad celular frente a las AgNPs y extractos.

Línea Celular Dosis (µm/ml)	MCF-7		MDA-MB-468		MACRÓFAGOS			
	AgNPs-EH	AgNPs-EC	AgNPs-EH	AgNPs-EC	AgNPs-EH	AgNPs-EC	Extracto H	Extracto C
Control	100.0±0.5	100.0±1.3	100.0±16.1	100.0±0.2	100±14.1	100±8.0	100±10.2	100±24.9
1.5625	68.5±2.8 ^{Aa}	52.3±17.2 ^{Ab}	68.8±3.1 ^c	72.1±44.2	85.7±5.7 ^{ac}	88.0±15.6 ^b	73.9±44.7	76.2±13.5
3.125	48.4±6.0 ^a	47.5±23.4 ^b	66.5±0.8 ^{Bc}	42.0±19.9 ^{Bd}	93.2±25.9 ^{ac}	107.5±14.5 ^{bd}	69.4±41.6	117.2±32.2
6.25	44.3±8.7 ^a	37.1±9.3 ^b	46.3±16 ^{Bc}	15.3±0.9 ^{Bd}	116.0±26.9 ^{ac}	106.8±10.8 ^{bd}	113.3±17.4 ^D	134.7±5.2
12.5	40.4±8.1	35.3±0.1	18.8±4.4 ^c	15.9±0.9 ^d	99.1±52.4 ^c	83.0±34.8 ^d	101.9±11.1 ^D	130.4±12.8
25	25.5±1.1	32.4±14.3 ^b	8.1±1.4 ^B	11.1±2.2 ^{Bd}	10.0±3.1	6.5±1.9 ^{bd}	95.1±12.3 ^D	120.5±14.0
50	19.9±5.4 ^a	26.1±4.1 ^b	6.1±1.2 ^{Bc}	11.3±1.0 ^{Bd}	8.0±0.8 ^{ac}	6.8±0.3 ^{Cbd}	76.9±9.1 ^D	115.2±11.2
100	15.7±1.8 ^{Aa}	22.4±2.5 ^{Ab}	5.5±0.6 ^c	5.3±1.0	10.5±3.5 ^{ac}	6.2±0.8 ^b	37.9±4.5	56.4±15.8

*Mayúsculas y minúsculas indican diferencias significativas, de $p \leq 0.05$

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT (Figura 20), podemos inferir que la actividad antiproliferativa de las AgNPs frente a las dos líneas

celulares de cáncer de mama aumenta respecto al incremento de la concentración, por ende, la viabilidad celular disminuye cuando aumenta la concentración de AgNPs. Sin embargo, es importante reconocer que tanto los extractos como las AgNPs frente a los macrófagos, son casi desapercibidas ya que no se encuentran porcentajes significativos hasta las concentraciones más altas.

Estadísticamente se reconoció mediante la prueba U de Mann-Whitney que las AgNPs-EC frente a la línea celular MCF-7 presentan diferencias significativas ($z=-2.366$, $p=0.018$) y alta actividad antiproliferativa a bajas concentraciones, sin embargo las AgNPs-EH tienen un efecto antiproliferativo a altas concentraciones ($z=-2.366$, $p=0.018$). Respecto a la línea celular MDA-MB-468 ocurre el mismo comportamiento, a la segunda y tercera dosis bajas [$(z=-2.366$, $p=0.018)$, $(z=-2.366$, $p=0.018)$], presentan una mayor actividad antiproliferativa las AgNPs-EC, sin embargo, a las dos penúltimas dosis tienen mayor actividad antiproliferativa las AgNPs-EH [$(z=-2.366$, $p=0.018)$, $(z=-2.366$, $p=0.018)$]. Mientras que en las AgNPs-EH y AgNPs-EC frente a los macrófagos no se encuentran diferencias significativas hasta la penúltima dosis siendo más citotóxicas las AgNPs-EC ($z=-2.309$, $p=0.021$). En cuanto a los extractos EC y EH frente a macrófagos, resulta ser más citotóxico el EH ya que a las cuatro penúltimas concentraciones muestra diferencias significativas [$(z=-2.309$, $p=0.021)$, $(z=-2.309$, $p=0.021)$, $(z=-2.021$, $p=0.043)$, $(z=-2.309$, $p=0.021)$].

De igual manera se identificó estadísticamente la existencia de diferencias significativas de las AgNPs-EH frente a la línea celular MCF-7 y los macrófagos, resultado ser las tres primeras dosis (las dosis menores) más significativas contra

la línea celular MCF-7 [(z=-2.337,p=0.019),(z=-2.337,p=0.019),(z=-2.337,p=0.019)], en contraste observamos que frente a macrófagos son más significativas las dos últimas dosis “concentraciones más altas” [(z=-2.337,p=0.019),(z=-2.352, p=0.019)]. Se realizó el mismo análisis para las AgNPs-EC, encontrándose el mismo comportamiento frente a la línea celular MCF-7[(z=-2.337, p=0.019), (z=-2.337p=0-019),(z=-2.337,p=0.019)], **sin embargo, en el caso de la línea celular de los macrófagos son más citotóxicas a las** “concentraciones más altas” [(z=-2.337, p=0.019), (z=-2.337,p=0-019), (z=-2.337,p=0.019)].

El resultado del análisis estadístico de las AgNPs-EH respecto a la línea celular MDA-MB-468 y macrófagos, demostraron que muestran actividad antiproliferativa y citotoxicidad frente a la línea celular MDA-MB-468 en todas las dosis excepto en la penúltima dosis más baja [(z=-2.337, p=0.019), (z=-2.337, p=0-019), (z=-2.337,p=0.019),(z=-2.337, p=0.019),(z=-2.337, p=0.019).(z=-2.352, p=0.019)]. En el caso de las AgNPs-EC se realizó el mismo análisis comparativo y dio como resultado que las AgNPs-EC presentan actividad antiproliferativa y citotoxicidad frente a la segunda, tercera y cuarta, dosis menores [(z=-2.337,p=0.019),(z=-2.337,p=0-019),(z=-2.337, p=0.019)], al contrario de las dosis mayores, excepto a la dosis máxima, donde son más citotóxicas frente a los macrófagos [(z=-2.337, p=0.019), (z=-2.337,p=0.019)].

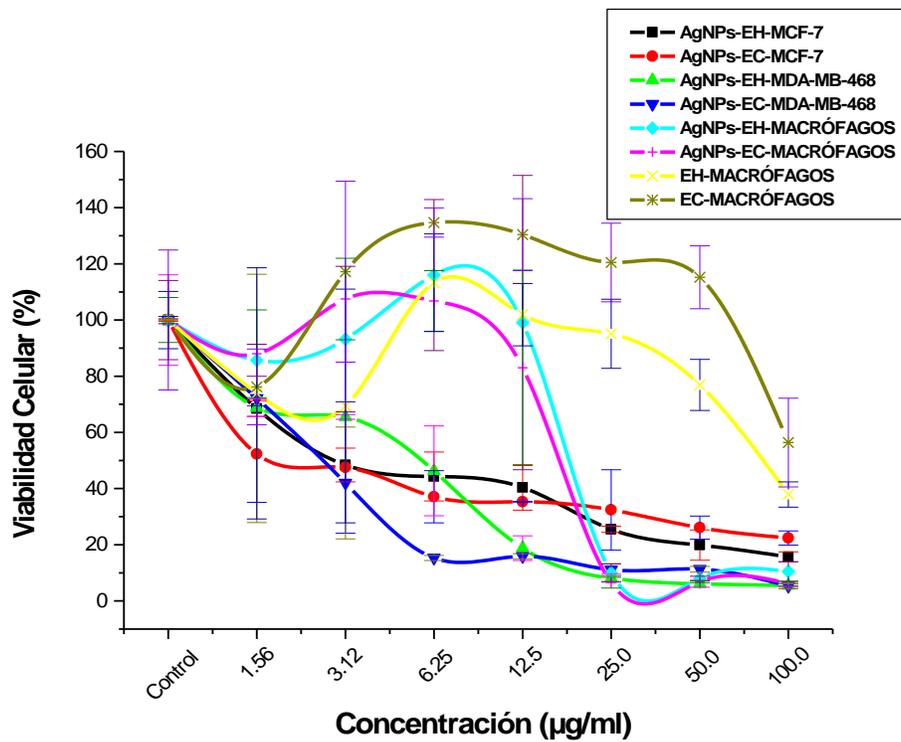


Figura 14: Gráfica del porcentaje de viabilidad celular respecto a diferentes dosis de AgNPs-EH y AgNPs-EC sobre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468 y macrófagos.

Así mismo se obtuvo la concentración citotóxica media (CC50), la cual representa la concentración que reduce el número de células viables al 50% [96], en el caso de la viabilidad con la línea celular MCF-7 se obtuvieron los siguientes resultados; respecto a la línea celular MCF-7 en la cual el tratamiento fue con AgNPs-EH (CC50=2.9 µg/ml) demostró ser moderadamente citotóxico respecto al tratamiento con AgNPs-EC (CC50=1.5 µg/ml) donde se infiere un efecto severamente citotóxico, además de demostrar que las AgNPs-EC son más citotóxicas que las AgNPs-EH,

así mismo se requiere menor concentración de AgNPs-EC que de AgNPs-EH para inhibir al 50% la viabilidad celular.

Por otra parte, respecto a la línea celular MDA-MB-468, se obtuvieron los siguientes resultados del tratamiento con las AgNPs; las AgNPs-H (CC50=5.2 µg/ml) demostrando un efecto moderadamente citotóxico frente a las AgNPs-EC (CC50=2.3 µg/ml) que tienen una actividad severamente citotóxica, en esta línea celular logra ser más sensible al tratamiento con las AgNPs-EC.

Sin embargo, es importante reconocer que frente a la línea celular de macrófagos la CC50 está muy por encima de los valores correspondientes a la CC50 del tratamiento en líneas celulares de cáncer de mama, cabe señalar que los macrófagos son células del sistema inmunitario que se localizan en los tejidos, que sirven de protección ante agentes externos, teniendo así los siguientes resultados para las AgNPs-EH (CC50=13.77 µg/ml) siendo ligeramente citotóxico, al igual que las AgNPs-EC (CC50=10.78 µg/ml), respecto a los extractos, el EH (CC50=68,97 µg/ml) resulto ser no citotóxico y el EC no presenta valores para la CC50 ya que no se logra observar una inhibición celular menor del 50 %.

Aunado a ello logramos observar que la línea celular MCF-7 es más sensible al tratamiento con AgNPs, respecto a la línea celular MDA-MB-468, además de que las AgNPs logran tener un mejor efecto a bajas concentraciones en ambas líneas celulares, pero a altas concentraciones logran inhibir más el crecimiento las AgNPs-EH en ambos casos. Por ello reconocemos que ambos tratamientos no muestran citotoxicidad importante ante los macrófagos lo cual muestra una buena selectividad del tratamiento.

A nivel celular las responsables de inducir un daño al ADN que conduce a la muerte celular son las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Otros autores reportan estudios donde las AgNPs biosintetizadas a partir de extractos naturales mediante una reacción redox utilizando como agente reductor polifenoles de plantas, provocan estrés oxidativo que conduce a la muerte celular a través de la mitocondria [97]. Así mismo, se sabe que el posible mecanismo involucrado en la toxicidad celular inducida por AgNPs desencadenan especies reactivas de oxígeno (ROS) inhibiendo la síntesis de antioxidantes intracelulares.

Cabe señalar que la actividad anticancerígena de los extractos de *A. muricata* es atribuida directamente a las acetogeninas, en específico al grupo funcional “lactona” ya que son las encargadas de bloquear el complejo I a nivel mitocondrial en las células cancerígenas, que convierte el NADH a NAD⁺, y crea la acumulación de protones a través de la membrana mitocondrial, dejando de producir ATP, obligando la apoptosis selectiva [14].

CAPITULO V: CONCLUSIONES

- Las AgNPs-EH y AgNPs-EC se sintetizaron satisfactoriamente con tamaños promedios de diámetro de nanopartícula menores a 50 nm, siendo de 19.63 ± 3.7 nm y 16.56 ± 4.1 nm respectivamente.
- Se lograron caracterizar y seleccionar las mejores bandas en los espectros (concentraciones) de AgNPs, mediante la técnica UV-Vis, siendo la mejor concentración 1:1 (tanto de EH así como de EC respecto a AgNO_3) para ambos casos (AgNPs-EH y AgNPs-EC), resultando una respuesta óptica conocida como resonancia plasmónica superficial (SPR) en 447 y 448 nm, respectivamente.
- Se identificó mediante la técnica FTIR el grupo funcional Lactona presente en los extractos EH y EC, siendo más alta la concentración en el EC.
- Se reconoció la presencia del elemento Ag en las AgNPs-EH (14.87%) y AgNPs-EC (20.83%).
- De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT, podemos inferir que la citotoxicidad y la respuesta antiproliferativa de las AgNPs aumenta frente a las diferentes líneas celulares de cáncer de mama respecto al incremento de la concentración, por ende, la viabilidad celular disminuye cuando aumenta la concentración de AgNPs. Sin embargo, es importante reconocer que tanto los extractos como las AgNPs frente a los macrófagos no presentan citotoxicidad significativa, respecto a los tratamientos en las líneas celulares cancerígenas, donde si se observa actividad antiproliferativa importante a las mismas dosis, esto porque las AgNPs generadas y los extractos, son aceptados y desapreciados por el sistema inmunológico, siendo así altamente biocompatibles.

BIBLIOGRAFIA

1. El-Sayed, I.H., X. Huang, and M.A. El-Sayed, *Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles*. Cancer letters, 2006. **239**(1): p. 129-135.
2. Sokolov, K., et al., *Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles*. Cancer research, 2003. **63**(9): p. 1999-2004.
3. Chowdhury, S., et al., *An overview of drug delivery vehicles for cancer treatment: Nanocarriers and nanoparticles including photovoltaic nanoparticles*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016. **164**: p. 151-159.
4. Oh, J.K. and J.M. Park, *Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: design, preparation, and biomedical application*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(1): p. 168-189.
5. Polak, P. and O. Shefi, *Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2015. **11**(6): p. 1467-1479.
6. Saratale, R.G., et al., *A comprehensive review on green nanomaterials using biological systems: Recent perception and their future applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018.
7. Alonso-Castro, A.J., et al., *Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies*. Journal of Ethnopharmacology, 2011. **133**(3): p. 945-972.
8. Kitamura, M.C. and E.E.P. Lemos, *Enxertia precoce da gravioleira (Annona muricata L.)*. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 2004. **26**(1): p. 186-188.
9. Moghadamtousi, S., et al., *Annona muricata (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(7): p. 15625-15658.
10. Fuentes, L.M.H., et al., *El Chacuatete, Idiarthron subquadratum, en Guanábana, Annona muricata*. Southwestern Entomologist, 2016. **41**(3): p. 855-864.
11. Correa-Gordillo, J., et al., *Antioxidant activity in soursop (Annona muricata L.): A literature review*. BLACPMA, 2012. **11**(2): p. 111-26.
12. George, V.C., et al., *Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of Annona muricata (soursop) extracts*. Journal of food science and technology, 2015. **52**(4): p. 2328-2335.
13. Mittal, A.K., Y. Chisti, and U.C. Banerjee, *Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts*. Biotechnology advances, 2013. **31**(2): p. 346-356.
14. SCHLIE-GUZMÁN, M.A., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, and L.M. LUNA-CAZÁRES, *Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2009. **8**(4).
15. Moghadamtousi, S.Z., et al., *Annona muricata leaves induce G 1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells*. Journal of ethnopharmacology, 2014. **156**: p. 277-289.
16. Gajalakshmi, S., S. Vijayalakshmi, and R.V. Devi, *Phytochemical and pharmacological properties of Annona muricata: a review*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012. **4**(2): p. 3-6.

17. Gavamukulya, Y., et al., *Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of Annona muricata (Graviola)*. Asian Pacific journal of tropical medicine, 2014. **7**: p. S355-S363.
18. López-Téllez, G., et al., *Removal of hexavalent chromium in aquatic solutions by iron nanoparticles embedded in orange peel pith*. Chemical engineering journal, 2011. **173**(2): p. 480-485.
19. Poole Jr, C.P. and F.J. Owens, *Introduction to nanotechnology*. 2003: John Wiley & Sons.
20. Ramírez Cabrera, M.A., *Evaluación de la cinética de distribución y toxicidad de las nanopartículas de plata*. 2010, Universidad Autónoma de Nuevo León.
21. Savage, N., T.A. Thomas, and J.S. Duncan, *Nanotechnology applications and implications research supported by the US Environmental Protection Agency STAR grants program*. Journal of Environmental Monitoring, 2007. **9**(10): p. 1046-1054.
22. Borm, P.J., et al., *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Particle and fibre toxicology, 2006. **3**(1): p. 1.
23. Staniszewski, A., et al., *Slow cation transfer follows sensitizer regeneration at anatase TiO₂ interfaces*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(35): p. 11586-11587.
24. El-Shall, M., et al., *Nanomaterials: synthesis, properties and applications*. Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, PA, 1996: p. 13-54.
25. Narayanan, R. and M.A. El-Sayed, *Changing catalytic activity during colloidal platinum nanocatalysis due to shape changes: electron-transfer reaction*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(23): p. 7194-7195.
26. Mateo, D., et al., *Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro*. Acta toxicológica argentina, 2013. **21**(2): p. 102-109.
27. Yang, M., et al., *Affibody modified and radiolabeled gold-iron oxide hetero-nanostructures for tumor PET, optical and MR imaging*. Biomaterials, 2013. **34**(11): p. 2796-2806.
28. Lim, J. and S.A. Majetich, *Composite magnetic-plasmonic nanoparticles for biomedicine: Manipulation and imaging*. Nano Today, 2013. **8**(1): p. 98-113.
29. Santos-Hernández D, G.-G.B.e.a., (2002) Electroanalysis 14-18.
30. Daniel, M.-C. and D. Astruc, *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chemical reviews, 2004. **104**(1): p. 293-346.
31. Wiley B, S.Y., Chen J, Chang H, Li Z Y, Li X, and Xia Y (2005) Mrs Bulletin 30,356.
32. Buzea, C., I.I. Pacheco, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity*. Biointerphases, 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
33. Safety, O. and H. Administration, *Introduction to nanomaterials and occupational safety and health*. William Marsh Rice University). SH-21008-10-60-F, 2010. **48**.
34. Zhou, J., et al., *Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **331**(2): p. 251-262.
35. España, C.M.M.T.N.A.y.f.
36. Sasikumar, R. and R. Arunachalam, *Synthesis of nanostructured aluminium matrix composite (AMC) through machining*. Materials Letters, 2009. **63**(28): p. 2426-2428.
37. Noguez, C., *Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(10): p. 3806-3819.
38. Ma, W., et al., *High-strength composite fibers: realizing true potential of carbon nanotubes in polymer matrix through continuous reticulate architecture and molecular level couplings*. Nano letters, 2009. **9**(8): p. 2855-2861.
39. Ito, A., et al., *Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*. Journal of bioscience and bioengineering, 2005. **100**(1): p. 1-11.

40. Huang, X., et al., *Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles*. Lasers in medical science, 2008. **23**(3): p. 217-228.
41. Chen, X. and H. Schluesener, *Nanosilver: a nanoproduct in medical application*. Toxicology letters, 2008. **176**(1): p. 1-12.
42. Ramírez, R.M., *El uso de la Plata en los antibióticos del futuro*. Nature Medicine, 1999. **5**: p. 183-188.
43. el caso de la Nanomedicina, E., *Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud*. Rev. Hosp. Niños (B. Aires), 2016. **58**(260): p. 19-28.
44. Monge, M. *Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas*. in *Anales de Química*. 2014.
45. Ávalos, A., et al., *NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA LA SALUD HUMANA Y EL MEDIO AMBIENTE/SILVER NANOPARTICLES: APPLICATIONS AND TOXIC RISKS TO HUMAN HEALTH AND ENVIRONMENT*. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 2013. **7**(2): p. 1.
46. Rafiquee, M., et al., *Synthesis, characterization and kinetics of formation of silver nanoparticles by reduction with adrenaline in the micellar media*. Bioprocess and biosystems engineering, 2015. **38**(4): p. 711-719.
47. Li, S.-M., et al., *Cellulose–silver nanocomposites: Microwave-assisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(2): p. 441-447.
48. Gama-Lara, S.A., et al., *Synthesis, characterization, and catalytic activity of platinum nanoparticles on bovine-bone powder: A novel support*. Journal of Nanomaterials, 2018. **2018**.
49. Ahmed, S., et al., *A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise*. Journal of advanced research, 2016. **7**(1): p. 17-28.
50. Morales-Díaz, A.B., et al., *Biofabricación de nanopartículas de metales usando células vegetales o extractos de plantas*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2016. **7**(5): p. 1211-1224.
51. Huang, J., et al., *Bio-inspired synthesis of metal nanomaterials and applications*. Chemical Society Reviews, 2015. **44**(17): p. 6330-6374.
52. Owolabi, M.S., et al., *The cytotoxic activity of Annona muricata leaf oil from Badagary, Nigeria*. The American Journal of Essential Oil and Natural Product, 2013. **1**(1): p. 1-3.
53. Popenoe, W., *Manual of tropical and subtropical fruits: Excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive, and fig*. 1920: Macmillan.
54. Ruehle, G.D., et al., *Miscellaneous tropical and subtropical Florida fruits*. Revised by Ruehle GD. Fla Agric Exp Station Bull A, 1958. **156**: p. 116.
55. Badrie, N. and A. Schauss, *Soursop (Annona muricata L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology*. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables. Watson RR, Preedy VR [Eds]. Elsevier Inc. Oxford, UK, 2010: p. 621-643.
56. PETERS, M., N. BADRIE, and E. COMMISSIONG, *Processing and quality evaluation of soursop (Annona muricata L) nectar*. Journal of food quality, 2001. **24**(5): p. 361-374.
57. Tsado, E., *QUALITY OF POSTHARVEST HANDLING OF MARKETABLE OKRA FRUITS SOLD IN MINNA, NIGER STATE, NIGERIA*. European Journal of Agriculture and Forestry Research, 2015. **3**(5): p. 33-45.

58. Onimawo, I., *Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (Annona muricata)*. Plant foods for human nutrition, 2002. **57**(2): p. 165-171.
59. Ventura, M. and I.H. Lima, *Orni-thine Cycle Amino Acids and Other Free Amino Acids in Fruits of Annona squamosa and A. muricata*. Phyton (Buenos Aires), 1961. **17**(1): p. 39-47.
60. Kader, A.A., L.L. Morris, and M.I. Cantwell, *Postharvest handling and physiology of horticultural crops: a list of selected references*. 1986: Department of Pomology, University of California.
61. Rahuman, A.A., *Efficacies of medicinal plant extracts against blood-sucking parasites, in Nature Helps...* 2011, Springer. p. 19-53.
62. Coria-Téllez, A.V., et al., *Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity*. Arabian Journal of Chemistry, 2016.
63. Martínez-Tlahuel, J.L., C. Arce, and U. Lara, *Cáncer de mama en el hombre*. Cancerología, 2006. **4**: p. 201-10.
64. Rivera Granda, C.R., *Conocimiento y prácticas del autoexamen de mamas en pacientes atendidas en el servicio de gineco obstetricia del Hospital de la Amistad Perú-Corea, Santa Rosa II-2 Piura en el mes de noviembre 2018*. 2018.
65. Coleman, M., M. Quaresma, and F. Berrino, *De supervivencia al cáncer en los cinco continentes: un estudio en todo el mundo basado en la población (CONCORD)*. Lancet Oncol, 2008. **9**: p. 730-756.
66. Organization, W.H., *Diagnóstico y tratamiento*. 2007.
67. <https://www.gob.mx/salud/articulos/cada-90-minutos-en-mexico-muere-una-mujer-por-cancer-de-mama>.
68. Gajendran, B., et al., *Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from Datura innoxia and its apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7*. Materials Letters, 2014. **122**: p. 98-102.
69. El-Aneed, A., *An overview of current delivery systems in cancer gene therapy*. Journal of Controlled Release, 2004. **94**(1): p. 1-14.
70. Martinez Carpio PA, N.M.M.C.c.i.b.b.c.r.R.O.J.-.
71. Alberts, B., et al., *Biología molecular de la célula*. Omega SA, Espana, 1996. **3**.
72. Guimarães, A., et al., *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
73. Tominaga, H., et al., *A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay*. Analytical Communications, 1999. **36**(2): p. 47-50.
74. Gerlier, D. and N. Thomasset, *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation*. Journal of immunological methods, 1986. **94**(1-2): p. 57-63.
75. Ramírez, S.A. and A.M.P. GÓMEZ, *Montaje y estandarización de un método para la determinación de hidrocarburos totales en matrices de agua por medio de las técnicas de infrarrojo y ultravioleta*. 2012, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Química Industrial.
76. SKOOG, D.A.L.J.J., Holler F. James; PRINCIPIOS DE ANÁLISIS and e.E.M.-H. INSTRUMENTAL, págs. 353-367.
77. https://www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf.
78. Gómez, R. and R. Murillo, *Espectroscopia infrarroja*. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, 2006.
79. Renau-Piqueras, J. and M. Faura, *Principios básicos del microscopio electrónico de barrido*. 1994.

80. Newbury*, D.E. and N.W. Ritchie, *Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative?* Scanning, 2013. **35**(3): p. 141-168.
81. Goldstein, J.I., et al., *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. 2017: Springer.
82. Yacamán, M. and J. Reyes, *Microscopía Electrónica: Una Visión del Microcosmos*, Edit. 1995, Fondo de Cultura Económica-Conacyt 1a. Edición, México.
83. Rajan, R., et al., *Plant extract synthesized silver nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials*. Industrial Crops and Products, 2015. **70**: p. 356-373.
84. Santhosh, S., R. Yuvarajan, and D. Natarajan, *Annona muricata leaf extract-mediated silver nanoparticles synthesis and its larvicidal potential against dengue, malaria and filariasis vector*. Parasitology research, 2015. **114**(8): p. 3087-3096.
85. Jain, P.K., I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed, *Au nanoparticles target cancer*. nano today, 2007. **2**(1): p. 18-29.
86. Morales-Luckie, R.A., et al., *Facile solventless synthesis of a nylon-6, 6/silver nanoparticles composite and its XPS study*. International Journal of Polymer Science, 2013. **2013**.
87. Mallikarjuna, K., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum leaf extract and their characterization*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2011. **6**(1): p. 181-186.
88. Kumar, R., et al., *Agricultural waste Annona squamosa peel extract: biosynthesis of silver nanoparticles*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012. **90**: p. 173-176.
89. Vivek, R., et al., *Green biosynthesis of silver nanoparticles from Annona squamosa leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells*. Process Biochemistry, 2012. **47**(12): p. 2405-2410.
90. García Aguirre, K.K., *Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de annona cherimolia y annona muricata. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico*. 2009.
91. Rieser, M.J., et al., *Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of Annona muricata*. Journal of Natural products, 1996. **59**(2): p. 100-108.
92. Durán, N., et al., *Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment*. Journal of biomedical nanotechnology, 2007. **3**(2): p. 203-208.
93. Kubo, A.M., et al., *Heterogeneous Microtubules of Self-assembled Silver and Gold Nanoparticles Using Alive Biotemplates*. Materials Research, 2018. **21**(4).
94. Auffan, M., et al., *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. Nature nanotechnology, 2009. **4**(10): p. 634-641.
95. Liu, X., et al., *SPR quantitative analysis of direct detection of atrazine traces on Au-nanoparticles: nanoparticles size effect*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **218**: p. 1-7.
96. Aslantürk, Ö.S. and T.A. Çelik, *Potential Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Extracts from Dracunculus vulgaris Schott. Tubers on MCF-7 Breast Cancer Cells*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2013. **4**(2): p. 394-402.
97. Sathishkumar, G., et al., *Dendrophthoe falcata (Lf) Ettingsh (Neem mistletoe): A potent bioresource to fabricate silver nanoparticles for anticancer effect against human breast cancer cells (MCF-7)*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **128**: p. 285-290.

ANEXOS

ANEXO 1.0 Certificado taxonómico de *A.Muricata*



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México



**FACULTAD DE CIENCIAS
HERBARIO**

DICTAMEN

DATOS DE USUARIO

M. en C. Ma. Guadalupe González Pedroza
Dr. Raúl Alberto Morales Luckie

DATOS DE LA PLANTA

Fecha de recepción: 19 de Septiembre de 2018
Fecha de entrega: 25 de septiembre 2018
Nombre común: Guanábana
Lugar de recolecta: Estado de Morelos

TIPO DE ANÁLISIS

Identificación taxonómica

TÉCNICAS O MÉTODOS EMPLEADOS

Observación macroscópica y al microscopio estereoscópico simple, de características diagnósticas de género y especie; empleo de clave dicotómica: Romero-soler, K. y W. Cetzal-Ix 2015. Las especies del género *Annona* (Annonaceae) cultivadas de la Península de Yucatán, México. Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY).

DIAGNOSIS

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata*

ATENTAMENTE



Dr. Luis Isaac Aguilera Gómez

Responsable del Herbario FACULTAD DE CIENCIAS