



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

Programa de Doctorado en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales

TESIS:

“Síntesis biogénica de nanoestructuras de Au para su aplicación electroquímica y en las líneas celulares MCF-7 y B16F0 de melanoma murino”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

PRESENTA

M.C. Minerva Frutis Murillo

DIRECTOR

Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo

IIMM-UMSNH

CO-DIRECTOR

Dr. Joel Edmundo López Meza

CMEB-UMSNH

MORELIA, MICH.

ABRIL 2025



Morelia Mich., 01 de abril de 2025

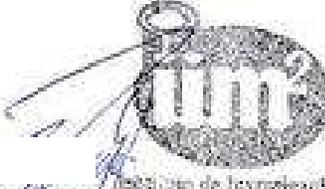
M. C. MINERVA FRUTIS MURILLO

Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Doctor en Ciencias Metalurgia y Ciencias de los Materiales con la tesis titulada "*Síntesis biogénica de nanoestructuras de Au para su aplicación electroquímica y en las líneas celulares MCF-7 y B16F0 de melanoma murino.*", le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

91002524	Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo	Presidente
98004719	Dr. Joel Edmundo López Meza	Co-Presidente
17010279	Dr. Rodrigo Alonso Esparza Muñoz	Vocal
02000334	Dr. Ariosto Medina Flores	Vocal
01000489	Dr. Jorge Alejandro Verduzco Martínez	Vocal
01001531	Dr. José Lemus Ruiz	Suplente

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

UMSNH

Dr. Ariosto Medina Flores
Director

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profunda gratitud al Instituto de Investigaciones en Materiales y Metalurgia, al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo y al SECIHTI por darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo, por aceptarme como su estudiante, su guía y dedicación durante todo este proceso. Sus valiosas observaciones y su apoyo lo que fue esencial para la finalización de este proyecto.

Extiendo mi profundo agradecimiento al Dr. Joel Edmundo López Meza, quien me ha guiado durante más de 10 años en mi formación académica. Le agradezco por recibirme en su grupo de trabajo, sus observaciones, paciencia, consejos, por apoyarme en cada idea y meta que me plantee, por su amistad, le expreso mi profunda admiración y cariño, sin usted mi proceso de formación académica no hubiera sido posible.

Del mismo modo, le agradezco a cada uno de los investigadores que a lo largo de la investigación me recibieron en sus laboratorios, aportándome comentarios y sugerencias que mejoraron significativamente este proyecto de tesis Doctoral, en especial al Dr. Rodrigo Alonso Esparza Muñoz y a mis sinodales el Dr. Ariosto Medina Flores y Dr. Jorge Verduzco Martínez.

Agradezco a mis amigos y colegas. Dra. Marisol Báez, Dr. Fabian Mares, M.C. Luis Gerardo García, Dra. Amalia Del Moral, M.C. Antonio Rodríguez, Dra. Nayeli Alva, M.C. Guadalupe Pérez Esquivel, Ing. Gladys Romero, Ing. Laura Vázquez, Dra. Elba Falcón, por los por todos los momentos que hemos vivido, las risas, el estrés y colaboraciones académicas a lo largo de este tiempo.

A mis padres Yesica y Alberto, hermanos Alberto, André y Celeste, mis cuñadas Eve y Janet, a mis tías Alma, Sofí y Lupe, les estoy profundamente agradecida por su amor incondicional, por apoyar mis sueños, y por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Mis éxitos siempre van de la mano y son por todos ustedes. A mi pareja, Luis Alberto, gracias por su paciencia, comprensión y por estar siempre a mi lado durante las largas noches de estudio. Tu amor ha sido mi mayor fortaleza.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	vii
CAPITULO I	1
INTRODUCCION	1
1.1 Justificación	2
1.2 Objetivo General.....	3
1.2.1 Objetivos específicos	4
1.3 Hipótesis	4
CAPITULO II	5
REVISION BIBLIOGRAFICA	5
2.1 Nanociencia y nanotecnología	5
2.2 Nanoestructuras.....	6
2.2.1 Propiedades de las nanoestructuras.....	8
2.2.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras	9
2.3 Nanoestructuras de oro	10
2.3.1 Toxicidad de AuNEs.....	11
2.4 Extractos	12
2.4.1 Decocción	12
2.4.2 Extracción de Soxhlet	13
2.5 Características y constituyentes fotoquímicos de la planta <i>Satureja macrostema</i>	13
2.6 Extracto lipídico de la semilla de aguacate (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	14
2.7 Aplicaciones de nanomateriales de oro.....	15
2.7.1 Electroquímicas.....	15
2.7.2 Tratamiento contra el cáncer.....	16
2.7.3 Cáncer de mama.....	17
2.7.4 Melanoma	18
2.8 Estado del arte.....	19
2.8.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con extractos.....	19
2.8.2 Propiedades electroquímicas en la valorización de glicerol.....	20

2.8.3 Aplicaciones en células de cáncer MCF-7	22
2.8.4 Aplicaciones en células B16-F0 de melanoma murino.....	24
CAPITULO III.....	26
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	26
3.1 Síntesis de nanopartículas de Au con el extracto de <i>Satureja macrostema</i>	26
3.2 Síntesis de nanoflores de Au con el extracto de <i>Satureja macrostema</i>	27
3.3 Síntesis de nanopartículas de Au con el extracto lipídico de la semilla de aguacate	27
3.4 Caracterización morfológica y estructural de las nanoestructuras	28
3.4.1 Espectroscopía de UV-Vis.....	28
3.4.2 Difracción de rayos X	28
3.4.3 Espectroscopía de infrarrojo	28
3.4.4 Cromatografía de gases acoplada a masas	29
3.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido	29
3.4.6 Microscopía Electrónica de Trasmisión.....	29
3.4.7 Fotoluminiscencia.....	29
3.4.8 Potencial Z y DLS.....	29
3.5 Caracterización y evaluación electroquímica de nanoflores de Au	30
3.6 Preparación de muestras de células para microscopía electrónica de barrido (SEM).....	30
3.7 Funcionalización de AuNPs con quimioterapéuticos	31
3.7.1 Evaluación de la citotoxicidad por ensayos de exclusión con azul tripano	31
3.7.2 Células B16-F0	31
3.7.3 Células MCF -7.....	31
CAPITULO IV.....	32
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	32
4.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de Au con el extracto de <i>Satureja macrostema</i>	32
4.1.1 Obtención de micrografías de SEM de células de cáncer MCF-7 con AuNPs.....	38
4.1.2 Funcionalización de las AuNPs con quimioterapéuticos y su evaluación en células MCF-7.....	43
4.2 Síntesis y caracterización de nanoflores de Au con extracto de <i>Satureja macrostema</i>	44
4.2.1 Evaluación de AuNFs en la valorización del glicerol.....	49
4.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con el extracto de la semilla de aguacate.....	55
4.3.1 Aplicaciones de nanopartículas de Au sintetizadas con el extracto de LEAS	57
CAPITULO V.....	60
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS.....	61
ANEXOS	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nanomateriales.....	6
Figura 2. Esquema de la síntesis verde de las nanoestructuras representando las principales etapas y materiales empleados.....	10
Figura 3. Condiciones de toxicidad de las nanoestructuras de oro.....	12
Figura 4. Planta <i>Satureja macrostema</i> en su habitat natural.	14
Figura 5. Extracto de la semilla de aguacate rico en lípidos (LEAS).....	15
Figura 6. Esquema del inicio, desarrollo del cáncer y metástasis.....	17
Figura 7. Esquema de cáncer de mama y principales quimioterapéuticos empleados	18
Figura 8. Esquema de la metodología experimental empleada.	26
Figura 9. Esquema mostrando la metodología de síntesis de las nanopartículas (AuNPs).	27
Figura 10. Esquema que muestra la metodología de síntesis de las nanoflores (AuNFs).	27
Figura 11. Esquema de metodología de síntesis de AuNPs con el extracto de aguacate LEAS.	28
Figura 12. Evaluación del tiempo de reacción modificando las concentraciones del extracto de <i>Satureja macrostema</i> y la concentración del precursor de oro en la síntesis de nanopartículas. ..	32
Figura 13. Espectroscopía de Uv-Vis de nanopartículas de oro obtenida de la síntesis con el extracto de la planta <i>Satureja macrostema</i>	33
Figura 14. Micrografías de SEM de AuNPs sintetizadas con el extracto acuoso de hojas frescas de <i>S. macrostema</i>	34
Figura 15. Caracterización de las AuNPs.	35
Figura 16. Micrografías obtenidas por TEM de las AuNPs.	36
Figura 17. Análisis Termográfico de las AuNPs.	37
Figura 18. Fotoluminiscencia de AuNPs.	38
Figura 19. Micrografías representativas de células MCF-7.....	39
Figura 20. Micrografías de SEM de Células MCF-7 con AuNPs..	41
Figura 21. Micrografías de SEM de células B16-F0 con AuNPs.....	42
Figura 22. Micrografías de SEM de bacterias bacilares.	43
Figura 23. Efecto de las AuNPs funcionalizadas con quimioterapéuticos sobre la viabilidad y la proliferación de las células MCF-7.....	44
Figura 24. Micrografías de SEM de AuNFs sintetizadas con el extracto acuoso de hojas secas de <i>Satureja macrostema</i>	45
Figura 25. Caracterización química elemental de las AuNFs.....	45
Figura 26. Caracterización estructural de AuNFs sintetizadas con el extracto de <i>Satureja macrostema</i>	47
Figura 27. Espectro FT-IR.....	48
Figura 28. Voltarograma cíclico de AuNFs.....	51
Figura 29. Gráficos de Nyquist para AuNFs/C hacia la reducción de electro oxidación de glicerol analítico y crudo.....	53

Figura 30. Voltarograma cíclico de AuNPs.....	54
Figura 31. Caracterización de las AuNPs:LEAS.....	56
Figura 32. Caracterización de las AuNPs:LEAS.....	56
Figura 33. Caracterización de las AuNPs:LEAS.....	57
Figura 34. Efecto de las AuNPs:LEAS sobre la viabilidad y la proliferación de las células B16-F0.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de propiedades y características de los materiales en bulto y nanomateriales.	7
Tabla 2. Comparación entre métodos químicos y biológicos para la síntesis de nanomateriales..	9
Tabla 3. Estado del arte de AuNPs obtenidas por síntesis verdes para aplicaciones biomédicas.	19
Tabla 4. Estado del arte de AuNEs en estudios electroquímicos.....	21
Tabla 5. Estado del arte de estudios de AuNEs con el modelo de células MCF-7.....	22
Tabla 6. Estado del arte de estudios de AuNEs con el modelo de células B16F0.....	24
Tabla 7. Principales compuestos identificados y cuantificados en el extracto acuoso de <i>Satureja macrostema</i> mediante cromatografía de gases, espectrometría de masas (GC-MS).....	49
Tabla 8. Resultados de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).....	51

RESUMEN

En la presente investigación se sintetizaron nanoestructuras de oro empleando los extractos de plantas de *Satureja macrostema* y de semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) denominado “LEAS”, a partir del precursor HAuCl_4 , las cuales fueron caracterizadas por medio de Ultravioleta Visible, Espectroscopía de infrarrojo, Difracción de Rayos X, DLS, potencial Z, Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Transmisión. Posteriormente las nanoflores y nanopartículas sintetizadas con *S. macrostema* se aplicaron en electroquímica para la valorización de glicerol crudo, las cuales exhibieron una densidad de corriente máxima de 1510 mA mg^{-1} y 819 mA mg^{-1} para la electro oxidación de glicerol analítico y crudo en un medio alcalino, respectivamente. Se encontró que las nanoflores eran estables después de 60 minutos de pruebas de cronoamperometría, lo que puede atribuirse a su morfología, planos preferenciales (111) y las moléculas de superficie restantes del extracto de la planta. En las aplicaciones biológicas las nanopartículas sintetizadas con *S. macrostema* se desarrolló una técnica sencilla para la observación de células cancerosas y nanopartículas de oro por microscopía electrónica de barrido. Esta metodología permite diferenciar entre células vivas y muertas, además de las diferencias de concentración y distribución en el interior de las células. Estas mismas nanopartículas se funcionalizaron con doxorubicina, cisplatino y la combinación a los fármacos. Se evaluó la citotoxicidad en la línea de cáncer de mama MCF-7. Las nanopartículas funcionalizadas con cisplatino sensibilizaron a las células MCF-7 y se redujo la proliferación celular $\sim 47\%$, mientras que la doxorubicina y la combinación de los fármacos solo redujeron $\sim 15\%$ la proliferación celular. Finalmente, se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas con el extracto de aguacate, AuNps: LEAS (3 – 42.3 $\mu\text{g/ml}$) en la línea celular de melanoma murino B16-F0 durante 24 h, mediante el ensayo de azul tripano. Los resultados mostraron que las AuNps: LEAS a 14.1 $\mu\text{g/ml}$ disminuyeron la proliferación celular $\sim 35\%$ respecto a LEAS 14.1 $\mu\text{g/ml}$. En conclusión, es posible sintetizar nanoestructuras de oro con los extractos de *Satureja macrostema* y LEAS. Las nanoflores de oro debido a su alta área superficial favorecen el electro oxidación de glicerol crudo y analítico. Las nanopartículas de oro potenciaron los efectos citotóxicos de quimioterapéuticos en células MCF-7 y el efecto citotóxico de LEAS en células B16F0.

Palabras clave: Nanomateriales de oro, *Satureja macrostema*, LEAS, cáncer, citotoxicidad

ABSTRACT

In the present investigation, gold nanostructures were synthesized using plant extracts of *Satureja macrostema* and avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) called “LEAS” from the precursor HAuCl_4 , which were characterized using Ultraviolet Visible, Infrared Spectroscopy, X-Ray Diffraction, DLS, Z-potential, Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy. Subsequently, the nanoflowers and nanoparticles synthesized with *S. macrostema* were applied in electrochemistry for the valorization of crude glycerol, which exhibited a maximum current density of 1510 mA mg^{-1} and 819 mA mg^{-1} for the electrooxidation of analytical

and crude glycerol in an alkaline medium, respectively. The nanoflowers were found to be stable after 60 min of chronoamperometry tests, which can be attributed to their morphology, preferential planes (111), and the remaining surface molecules of the plant extract. In the biological applications of nanoparticles synthesized with *S. macrostema*, a simple technique was developed for observing cancer cells and gold nanoparticles by scanning electron microscopy. This methodology allows differentiation between living and dead cells and differences in concentration and distribution within the cells. These same nanoparticles were functionalized with doxorubicin, cisplatin and a combination of the drugs. Cytotoxicity was evaluated in the MCF-7 breast cancer line. Nanoparticles functionalized with cisplatin sensitized MCF-7 cells, and cell proliferation was reduced ~ 47%, while doxorubicin and the combination of the drugs only reduced ~15% cell proliferation. Finally, nanoparticles synthesized with avocado extract, AuNps: LEAS (3 - 42.3 µg/ml) were evaluated in murine melanoma cell line B16-F0 for 24 h and were analyzed by trypan blue assay. The results showed that AuNps: LEAS at 14.1 µg/ml decreased cell proliferation ~35% relative to LEAS 14.1 µg/ml. In conclusion, it is possible to synthesize gold nanostructures with the extracts of *S. macrostema* and LEAS. The gold nanoflowers due to their high surface area favor the electro oxidation of crude and analytical glycerol. Gold nanoparticles potentiate the cytotoxic effects of chemotherapeutics in MCF-7 cells and the cytotoxic effect of MCF-7 cells and the cytotoxic effect of LEAS in B16F0 cells.

Keywords: Gold nanomaterials, *Satureja macrostema*, avocado, LEAS, cancer, cytotoxicity.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La nanotecnología es un área de la ciencia que ha generado grandes avances en el desarrollo de la ingeniería y funcionalidad de las nanopartículas. Las nanoestructuras de oro (AuNEs) y las nanopartículas de oro (AuNps) han sido empleadas como liberadores de fármacos, bio sensores, bio marcadores, terapias fototérmicas, SERS, electro-oxidación, remoción de contaminantes, entre otros [1–4]. Estas aplicaciones derivan de sus propiedades ópticas, térmicas, catalíticas y a su tamaño pequeño en relación tamaño-volumen [5]. Los métodos de obtención de las AuNEs y AuNps suelen ser por síntesis química o por métodos verdes. En los segundos, se emplean extractos de plantas con diferentes solventes (acuosos, alcohólicos, entre otros) los cuales presentan moléculas reductoras y estabilizadoras para reducir sales precursoras (HAuCl_4) y hacer la conversión de iones Au^{3+} a Au^0 , sintetizando así las AuNES [6]. Estos métodos presentan facilidad en el proceso de síntesis, baja toxicidad y son económicos. Los nanomateriales presentan gran estabilidad y al funcionalizarse con las moléculas bioactivas pueden aumentar los efectos propios de cada extracto, además tienen ventajas en comparación con la síntesis química, donde los productos químicos de desecho afectan al ambiente y causan riesgos para su administración en organismos vivos, limitando sus aplicaciones biológicas. Así los métodos verdes para la síntesis de nanomateriales son una alternativa fácil y ecoamigable [7]. En los métodos verdes es posible obtener diversas morfologías como esferas, platos, triángulos, estrellas, dendritas y morfologías autoensambladas como dendritas y flores [8–10], lo cual depende estrechamente de los agentes estabilizadores del extracto.

Algunas nanoestructuras de tipo AuNFs tienen una relación superficie-volumen más alta que las AuNps sólidas [11]. Por lo cual han tomado gran relevancia debido a sus propiedades, como mayor transferencia de carga, alta capacidad de adsorción, actividad electrocatalítica y fototérmica, efectividad en las reacciones superficiales y estabilidad, las cuales están determinadas por las diferentes capas de las flores [12]. Se han reportado nanoflores de Ag utilizando extractos de *kalanchoe* con actividad antibacteriana y fotocatalítica [13]. Del mismo modo, las AuNFs se han sintetizado utilizando extractos medicinales con un tamaño de 20-130 nm y 15-90 nm, respectivamente, también con propiedades antibacterianas de amplio espectro [14] y AuNFs sintetizadas con extracto de té verde con tamaños de 9 a 80 nm dependiendo de la concentración de la sal precursora del oro, y éstas nanoflores se utilizaron como parte de un sistema de desalinización de agua de mar [15]. Otra aplicación es en la electro-oxidación del glicerol, el cual es un subproducto de desecho del biodiesel con la cual derivado de su oxidación se pueden obtener productos de valor añadido como el ácido glicérico, la dihidroxiacetona, el gliceraldehído, el ácido glicólico, el ácido oxálico, mesoxalato y el ácido fórmico. Estos productos se utilizan ampliamente en química fina, farmacia, recubrimientos y otros campos [16]. En recientes estudios se ha propuesto el uso de AuNPs/AuNEs para la electro-oxidación de glicerol, en donde, reportaron un

modelo de catálisis soportando en carbón nanopartículas de Pt, Pd y Au en condiciones básicas (KOH) [17]; del mismo modo, recientemente se evaluó la electro-oxidación del glicerol con AuNES donde determinaron que la actividad de oxidación es atribuida a la abundancia en facetas $\{100\}$ [18].

Otra aplicación de las AuNEs es en la biomedicina en el tratamiento del cáncer, la cual es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial ya que es la principal causa de muerte en el mundo. El cáncer es un conjunto de enfermedades de un origen multifactorial que altera las células causando una disfunción en la regulación de genes vitales que afectan el ciclo celular lo que conduce a una proliferación anormal [19]. El diagnóstico y la administración de fármacos han sido unas de las principales estrategias de las aplicaciones de las AuNEs en cáncer. Por lo tanto, es importante conocer su acumulación y su dispersión óptica en las células. Se ha reportado que el rango ideal para las AuNps en aplicaciones biológicas es de entre 10 a 100 nm para aumentar los tiempos de circulación y la administración efectiva al sitio diana; sin embargo, el tamaño óptimo es de 20 nm para la internalización y retención en las células tumorales. Del mismo modo la forma de la AuNPs es importante en la circulación sanguínea, las nanopartículas que no son esféricas tienen mayor tiempo de circulación y pueden acumularse en sitios no deseados [20]. Recientemente estudios en cáncer han demostrado que las nanopartículas de oro no sólo se infiltran en los vasos sanguíneos para llegar al lugar del tumor, sino que también entran en el interior de los orgánulos, lo que sugiere que pueden emplearse como eficaces portadoras de fármacos. Además, al alcanzar el lugar de destino, las nanopartículas de oro pueden liberar su carga útil tras un estímulo externo o interno [21]. Asimismo, se han empleado AuNPs sintetizadas por métodos verdes funcionalizadas con fármacos quimioterapéuticos y han potencializado sus efectos citotóxicos [22].

Por lo tanto, la idea central de esta investigación fue sintetizar AuNES, empleando los extractos de *Satureja macrostema* y el extracto de la semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) (LEAS) como agentes reductores y estabilizantes para la formación de los nanomateriales. Los cuales se caracterizaron por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (DRX), dispersión de luz dinámica (DLS), potencial Z, microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET). Como aplicaciones se evaluó mediante electro-voltamperometría cíclica las AuNPs y AuNFs sintetizadas con el extracto de *S. macrostema* para la electro-oxidación del glicerol. Por otro lado, en las aplicaciones biológicas se evaluó la citotoxicidad las AuNPs libres y funcionalizadas con doxorubicina y cisplatino en células MCF-7 de cáncer de mama. Con las AuNPs:LEAS se evaluó la citotoxicidad en concentraciones menores a la IC_{50} previamente reportada del extracto en células B16F0 de melanoma murino.

1.1 Justificación

Las nanoestructuras de oro se caracterizan por presentar una alta biocompatibilidad, propiedades ópticas y catalíticas que comparadas con sus materiales bulto, resultan diferentes y mucho más interesantes para una gran diversidad de aplicaciones ambientales y biomédicas. Estas AuNEs

pueden sintetizarse por diversos métodos, donde destacan los métodos verdes con extractos de plantas porque son de bajo costo, es ecoamigable con los productos de desecho, no requiere altas temperaturas, altamente reproducibles, presentan biocompatibilidad y pueden funcionalizarse con una gran diversidad de moléculas de manera directa, lo que hace a estos materiales candidatos para la resolución de problemas biotecnológicos; sin embargo, en este tipo de método de síntesis verde es común encontrar variaciones en las morfologías por lo que es necesario diseñar y emplear extractos verdes más estandarizados para controlar de una mejor manera el tamaño y la morfología de las AuNEs.

Una aplicación de los nanomateriales es la electro-oxidación con AuNEs en la valorización del glicerol crudo, el cual resulta como producto de desecho del biodiesel. El glicerol es una molécula importante de biomasa, con la cual derivado de su oxidación se pueden obtener productos de valor añadido como el ácido glicérico, la dihidroxiacetona, el gliceraldehído, el ácido glicólico, el ácido oxálico, mesoxalato y el ácido fórmico. Estos productos se utilizan ampliamente en química fina, farmacia, recubrimientos y otros campos. El oro es el metal más electronegativo, tiene un potencial redox Au^+/Au^0 muy elevado de +1,691 V y puede existir en los estados de oxidación +1 y +3 por lo que presenta una especial afinidad por la oxidación de CO por lo que el oro es considerado un catalizador muy eficaz, es por esto que AuNEs como las nanoflores al tener una gran área superficial, son un material prometedor para la electroquímica.

Actualmente, se consideran a los nanomateriales como una alternativa viable para la detección y tratamiento del cáncer, en el caso de tratamientos por radiación las morfologías más destacadas son los rodillos y estrellas, mientras que las esferas han sido mayormente empleadas funcionalizadas con fármacos como quimioterapéuticos, para potenciar los efectos citotóxicos, ya que éstos son poco específicos causando una gran cantidad de efectos secundarios y complicaciones médicas como la muerte, por lo que al disminuir la concentración de los fármacos y hacerlos más específicos, los tratamientos resultarían ser más eficaces y tolerables para los pacientes.

De este modo, los enfoques de este proyecto son sintetizar AuNEs por métodos verdes, con diferentes morfologías y tamaños, las cuales serán aplicadas en cuestiones ambientales como la valorización del glicerol crudo y aplicaciones biomédicas como evaluación de la citotoxicidad de las AuNES libres y funcionalizadas con quimioterapéuticos y extractos con efectos citotóxicos previamente reportados. Además, de buscar métodos alternativos para la detección de las AuNPs, por microscopía electrónica de barrido en muestras biológicas.

1.2 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanoestructuras de Au empleando los extractos verdes de *Satureja macrostema* (Té de nurite) y un extracto de la semilla aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) y evaluar sus propiedades electroquímicas y de toxicidad en las líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama y B16F0 de melanoma murino.

1.2.1 Objetivos específicos

1. Sintetizar AuNps y AuNFs a partir de los extractos de *Satureja macrostema* y de la semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) variando su concentración y la concentración de la sal precursora
2. Caracterizar estructuralmente las nanoestructuras de Au mediante las técnicas: espectroscopía ultravioleta visible (Uv-Vis), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y espectroscopía Raman.
3. Determinar morfológica y estructuralmente los nanomateriales mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (TEM).
4. Evaluar las propiedades electrocatalíticas de las AuNFs obtenidas con el extracto de *Satureja macrostema* mediante voltarometría cíclica en la detección de glicerol.
5. Evaluar la citotoxicidad de los nanomateriales-funcionalizados en las líneas celulares de melanoma de ratón B16F0 y células de cáncer de mama MCF-7 mediante ensayos de exclusión por azul tripano.

1.3 Hipótesis

A partir de los agentes reductores y estabilizantes del extracto de la planta *Satureja macrostema* y el extracto de la semilla aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) de manera independiente y con variaciones estratégicas de síntesis se obtienen nanoestructuras de Au como nanopartículas, y nano flores funcionalizadas con los extractos que potencializan las propiedades citotóxicas en las líneas celulares cancerosas B16F0 (melanoma de ratón) y MCF-7 (cáncer de mama), además teniendo aplicaciones ambientales para la valorización del glicerol por métodos electroquímicos.

CAPITULO II

REVISION BIBLIOGRAFICA

En este capítulo se presenta la información relacionada con la síntesis de nanoestructuras de Au, composición de los extractos verdes, aplicaciones biotecnológicas de los nanomateriales de Au. Además, se presentan los antecedentes y el estado del arte de las aplicaciones, apoyados en la literatura actual.

2.1 Nanociencia y nanotecnología

El prefijo 'nano' proviene del griego que significa 'enano' o algo muy pequeño, y representa una milmillonésima parte de un metro (10^{-9} m). La diferencia entre nanociencia y nanotecnología es que la primera se refiere a la unión de la física, la ciencia de los materiales y la biología para poder manipular los materiales en escala atómica y molecular (1 - 100 nm) (Fig. 1a). En esta escala los materiales presentan propiedades cuánticas que no son observables en escalas de longitudes macroscópicas. Por otro lado, la nanotecnología es la capacidad de manipular la nanociencia en diversas aplicaciones por medio de la observación, medición, manipulación, ensamblaje, control y fabricación de materia a escala nanométrica [23]. Dando así la nanotecnología aplicaciones de los nanomateriales como dispositivos, nanosensores, liberación de fármacos, entre otros.

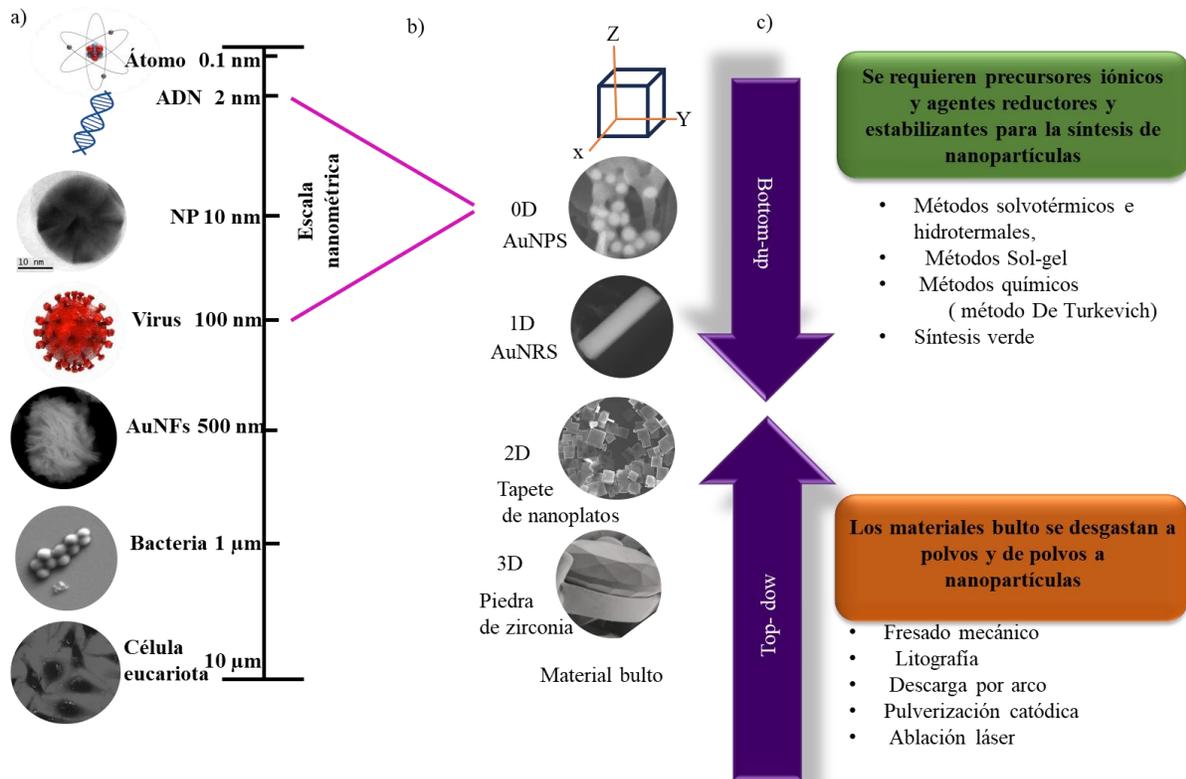


Figura 1. Nanomateriales. a) Escala nanométrica, b) clasificación de nanoestructuras y c) enfoques de síntesis.

Actualmente, existen un gran número de estudios donde la nanotecnología juega un papel importante, lo más relevante se destaca en el campo de la biomedicina para el diagnóstico y terapia de varias enfermedades humanas. Es por esto que la bionanotecnología es considerada uno de los campos más relevantes en la aplicación de la nanociencia [24]. Los nanomateriales han mostrado la capacidad de actuar como nanoacarreadores para liberar moléculas terapéuticas, como fármacos, proteínas, ácidos nucleicos y agentes inmunológicos. Además, los nanomateriales han presentado actividad antimaterial, citotóxica y se han empleado nanoestructuras funcionales como biomarcadores, nanobiochips, nanoelectrodos o biosensores. Así el estudio de estos nanomateriales resulta de gran importancia en el área biológica.

2.2 Nanoestructuras

Las nanoestructuras son materiales con tamaños dentro de la escala nanométrica en una, dos o tres dimensiones. El término "nanoestructura" se define normalmente por las dimensiones de las nanoestructuras que deben estar entre 1 y 100 nm [25]. De esta manera las nanoestructuras pueden clasificarse por su tamaño (Fig. 1b), como:

a) Dimensión cero: Es el tipo de nanomaterial más común que tiene tres dimensiones (x, y, z) a nano escala. Estos materiales se pueden representar con nanopartículas esféricas [25]. Por ejemplo, puntos cuánticos, esferas huecas, cúmulos atómicos, nanolentes.

b) Unidimensional: Este nanomaterial tiene dos dimensiones (x e y) en el rango nanométrico, mientras que la otra dimensión (z) es mayor que la nano escala, lo que da como resultado nanomateriales con forma de aguja. Tienen una relación de aspecto alta [25]. Por ejemplo, nanotubos de carbono, nano cables, nano varillas, espirales de nano fibras, resortes y multicapas.

c) Bidimensionales: Estos nanomateriales tienen una dimensión en la nanoescala mientras que las otras dos dimensiones son más grandes que la nanoescala. Se trata de estructuras en forma de placa [25]. Por ejemplo, nanopelículas, nanocapas, nanorecubrimientos, nanodiscos, heteroestructuras.

d) Tridimensionales: Estos nanomateriales tienen las tres dimensiones que son más grandes que la nanoescala, pero contienen granos equiaxiales de tamaño nanométrico. Tienen tres dimensiones arbitrarias que son >100 nm. Sin embargo, estos materiales tienen estructuras nanocristalinas e implican la presencia de características a nanoescala [25]. Por ejemplo, nanocompuestos, estructura multinanocapa, películas delgadas con porosidad a escala atómica, nanoflores.

Diferenciar los materiales por su tamaño resulta relevante debido a que sus propiedades fisicoquímicas se ven afectadas, por lo que considerarlo para futuras aplicaciones es esencial. En la tabla 1 se muestran las características de un material en bulto en comparación de nanomaterial.

Tabla 1. Comparación de propiedades y características de los materiales en bulto y nanomateriales.

Material en bulto	Nanomaterial
Área superficial pequeña	Amplia área superficial
Menor reactividad química	Mayor reactividad química
Materiales pesados	Materiales más ligeros
Caros	Mas baratos en comparación de su material bulto
Poca eficiencia en energía	Mayor eficiencia energética

2.2.1 Propiedades de las nanoestructuras

a) La superficie del material

A medida que el tamaño del material se reduce a nanoescala, la cantidad de átomos de superficie aumenta lo que resulta en una mayor reactividad de los sitios de la superficie. Por ejemplo: consideremos un cubo de $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ de tamaño. Si cortamos este cubo en partes iguales que terminan en $0,1\text{ mm} \times 0,1\text{ mm} \times 0,1\text{ mm}$, entonces el volumen total del cubo es similar al original, pero la superficie de todos los cubos tiene 100 veces más área que el original [26]. Por lo tanto, estos materiales tienen una alta relación de área de superficie sobre volumen. Muchas propiedades como el punto de fusión y la adhesión están controladas por los átomos de la superficie.

b) Estabilidad y carga de superficie

La carga de la superficie es esencial para definir la agregación, estabilidad y la afinidad de los materiales con el ambiente y los grupos funcionales. Esta carga superficial es medida en términos de potencial Z ; la cual es una magnitud que representa el grado de repulsión electrostática entre partículas adyacentes y cargadas similarmente en la dispersión [26]. La magnitud del potencial Z está directamente relacionada con el tamaño de la partícula, su composición y el pH del medio. Este valor de potencial Z puede ser positivo o negativo y mientras más alto, mayor estabilidad en las partículas [27].

c) Actividad catalítica

Los nanomateriales se consideran catalizadores heterogéneos debido a su alta relación superficie-volumen. Los nanomateriales tienen muchos átomos en su superficie, por lo tanto, estas partículas tienen una energía superficial muy alta y son altamente activas, y se dice que los átomos de superficie están en un estado de inestabilidad física y son químicamente activos, y son propensos a realizar muchas reacciones químicas [28].

d) Fenómeno de resonancia de plasmón superficial

La resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés “surface plasmon resonance”) es un fenómeno óptico que presentan algunas nanopartículas metálicas más pequeñas que la longitud de onda de la luz [29]. El fenómeno resulta de las interacciones entre la luz incidente y los electrones de la superficie en una banda de conducción, lo que produce oscilaciones de plasmón localizadas coherentes con una frecuencia de resonancia que depende en gran medida de la composición, el tamaño, la geometría, el entorno dieléctrico y la distancia de separación partícula-partícula de las NP [30]. Los materiales comunes utilizados para la producción de NP son metales nobles como Ag y Au, que debido a los niveles de energía de las transiciones d-d exhiben SPR en el rango visible del espectro. Por ejemplo, el oro ya no exhibe el amarillo característico del oro a granel cuando el tamaño de las partículas de oro está en el rango nanométrico (es decir, las nanopartículas esféricas de oro de 13 nm aparecen en rojo brillante) [24]. Para la detección del SPR se realiza típicamente un instrumento UV-vis para NPs en solución [31].

2.2.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras

Los métodos de síntesis de nanoestructuras se pueden clasificar en dos grupos: descendente y ascendente, y por sus siglas en inglés se denominan “top-down y bottom up” (Fig. 1c). En el método descendente el material a granel se descompone en moléculas más pequeñas y una descomposición adicional da como resultado la formación de la nanopartícula. Las técnicas que se emplean son la molienda mecánica, litografía, descarga por arco, grabado, pulverización catódica, ablación láser, electro explosión y deposición física de vapor [32]. Por otro lado, los métodos ascendentes forman las nanopartículas a partir de una sustancia más simple o desde los átomos. Donde se emplean los métodos solvotérmicos e hidrotermales, métodos sol-gel, métodos de plantillas blandas y duras, micela inversa, el hilado, también se incluyen los métodos químicos y biológicos [32]. Comúnmente los métodos químicos y biológicos son ampliamente comparados debido a las similitudes en la obtención de materiales, por lo que en la tabla 2 se muestran las principales características de ambos métodos [25].

Tabla 2. Comparación entre métodos químicos y biológicos para la síntesis de nanomateriales.

Síntesis química	Síntesis biológica
Técnica simple. Variedad de formas y tamaños	Síntesis simple y tiene una mejor eficiencia de energía
Requiere agentes reductores y estabilizantes de alto costo	Menor costo de producción
Síntesis con menor temperatura y buena calidad de material obtenido	Menor control en el proceso de síntesis del material
Empieza químicos tóxicos. Peligrosos para la salud y el ambiente	Síntesis biológica, por lo que los residuos son eco-amigables
Es posible el dopaje <i>In-situ</i>	Mayor variedad de morfologías

La síntesis verde de nanoestructuras tiene la ventaja de ser de bajo costo, alta reproducibilidad, eco-amigable con el ambiente y el proceso de purificación de las nanoestructuras es simple comparado con otros métodos [33]. Este método usa extractos de plantas a partir de las hojas, tallos, flores y semillas donde se extraen agentes reductores y estabilizantes para la preparación de las nanoestructuras. Las biomoléculas que participan en las síntesis son polifenoles, flavonoides, polisacáridos, alcaloides, aminoácidos, vitaminas, cetonas, fenoles y proteínas. En conjunto con la concentración de estas moléculas, el pH, la temperatura y el tiempo de contacto tienen efectos sobre el tamaño y la forma de las nanoestructuras [34]. Dentro de las morfologías mayormente encontradas por síntesis verde se encuentran las esferas, rodillos y triángulos, los cuales se describirán a continuación.

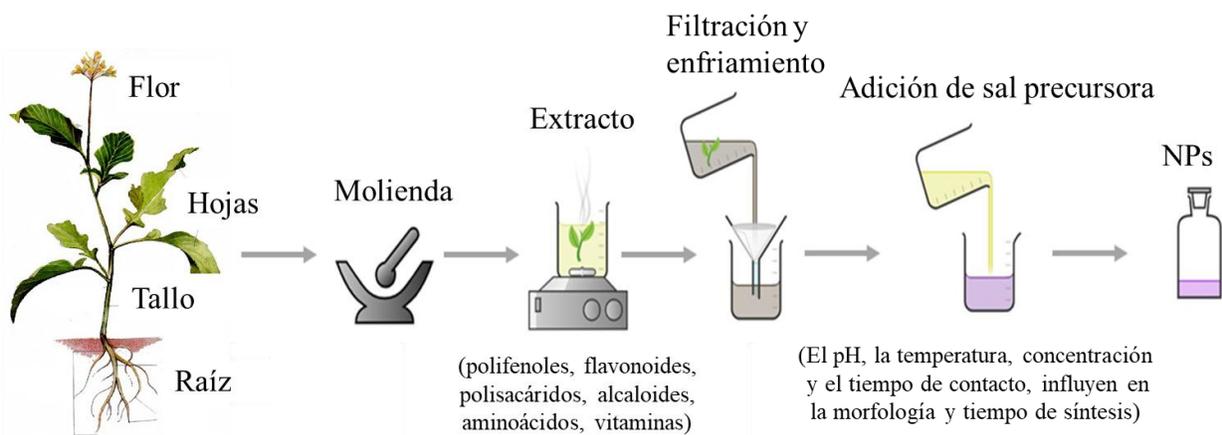


Figura 2. Esquema de la síntesis verde de las nanoestructuras representando las principales etapas y materiales empleados. NPs=nanopartículas.

2.3 Nanoestructuras de oro

Las nanoestructuras metálicas se utilizan cada vez más en los campos biomédicos debido a su pequeña relación tamaño-volumen, funcionalización, estabilización y facilidad de detección [24]. Entre los nanomateriales metálicos inorgánicos, destacan las nanopartículas de oro, cuyas distintas propiedades físicas y químicas las hacen ideales para diversas aplicaciones, especialmente en terapia, detección y diagnóstico, o administración precisa de fármacos [35]. Las AuNEs pueden tener diversas morfologías y como se ha mencionado, propiedades y sus aplicaciones dependen estrechamente de ellos, por consiguiente, se describirán las morfologías comúnmente usadas en el área biológica.

Las AuNPs esféricas poseen atributos útiles como propiedades optoelectrónicas relacionadas con el tamaño y la forma, una gran relación superficie-volumen, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad [36]. Las propiedades físicas importantes de las AuNPs incluyen la SPR y la capacidad de apagar la fluorescencia. Las AuNPs esféricas exhiben una gama de colores (por ejemplo, marrón, naranja, rojo y morado) en solución acuosa a medida que el tamaño aumenta de 1 a 100 nm, generalmente muestran un pico de absorción relativo al tamaño de 500 a 550 nm [37]. Las AuNPs esféricas en el rango de tamaño de 20 a 50 nm, poseen propiedades ajustables que mejoran la administración de fármacos y la terapia fototérmica. Además, la modificación de la superficie mejora la biocompatibilidad y permite dirigirse activamente a las células enfermas. La focalización activa consiste en unir moléculas como anticuerpos y péptidos a la superficie de las AuNPs para unirse a los receptores específicos del tumor, lo que facilita un tratamiento eficaz contra el cáncer [38]. La terapia fototérmica emplea la irradiación láser para elevar la temperatura del tejido tumoral, a niveles letales sin afectar a las células sanas, por lo que resultan de gran interés en estas aplicaciones [39].

Las nanorodillos de oro (AuNR) debido a su anisotropía, se caracterizan por tener dos bandas SPR, la banda transversal y la banda longitudinal. Estos AuNR generalmente son sintetizados por electroquímica, reducción fotoquímica y síntesis verde [40]. Una ventaja de los AuNR es su alta relación entre el área de superficie y el volumen, que proporciona más espacio para unir las moléculas. Sus aplicaciones más destacadas son en el tratamiento del cáncer, ya que presentan una mejor permeabilidad y retención en el tejido tumoral, además, las AuNR tienen un tiempo de circulación más largo en comparación con las nanoesferas, que son absorbidas por los macrófagos cuatro veces más. Aunque los AuNR más pequeños se eliminan más rápidamente, aquellos con una relación de aspecto alta y un volumen pequeño son candidatos ideales en la administración de fármacos en tumores. Los estudios han demostrado que los AuNRs con una relación de aspecto de 3 a 5 exhiben mayor éxito en la acumulación en el sitio del tumor [41]. Por otro lado, gracias a su excelente conversión fototérmica, los AuNR sirven como excelentes agentes para la liberación controlada de fármacos y eliminación de tumores. Su tamaño ajustable y relación de aspecto permite controlar sus propiedades SPR para la terapia de ablación térmica o la liberación fototérmica controlada [40].

Los nanotriángulos de oro (AuNT) se caracterizan por extensiones puntiagudas que irradian desde un núcleo esférico. Existe una variedad de métodos de síntesis y el más utilizado es el método mediado por semillas; sin embargo, la reproducibilidad siempre es un reto [42]. Dentro de las aplicaciones de los AuNT se asocian con un mayor nivel de absorción celular, atribuido a los bordes y vértices que tienen una mayor curvatura. Los estudios han demostrado que las AuNT demuestran una mayor absorción celular que las AuNPs, y las que tienen una longitud lateral de 50-150 nm exhiben la mayor absorción celular debido a sus fuertes fuerzas de adhesión [43]. La estabilidad, la compatibilidad biológica y la alta conversión fototérmica de los AuNT los convierten en excelentes candidatos para la liberación de fármacos en estudios fototérmicos, ya que han demostrado resultados prometedores en la investigación del tratamiento del cáncer [44].

2.3.1 Toxicidad de AuNEs

Las características de las AuNPs que las hacen especialmente atractivas en biomedicina son su excelente estabilidad y biocompatibilidad, su facilidad para funcionalizar sus superficies, su baja toxicidad y su transferibilidad al fármaco [38]. De este modo, con el creciente interés en el uso de AuNPs en biomedicina, también aumentan las preocupaciones sobre la seguridad humana. Se ha vuelto crucial comprender las interacciones nano-biológicas y la toxicidad resultante de los nanomateriales, y comprender los efectos adversos de la exposición a estos nuevos materiales. Algunos de los factores más importantes que influyen en la toxicidad de las NP son su tamaño, forma, vía de administración, tiempo de exposición, dosis, superficie de carga y funcionalización del material [45] (Fig. 3).

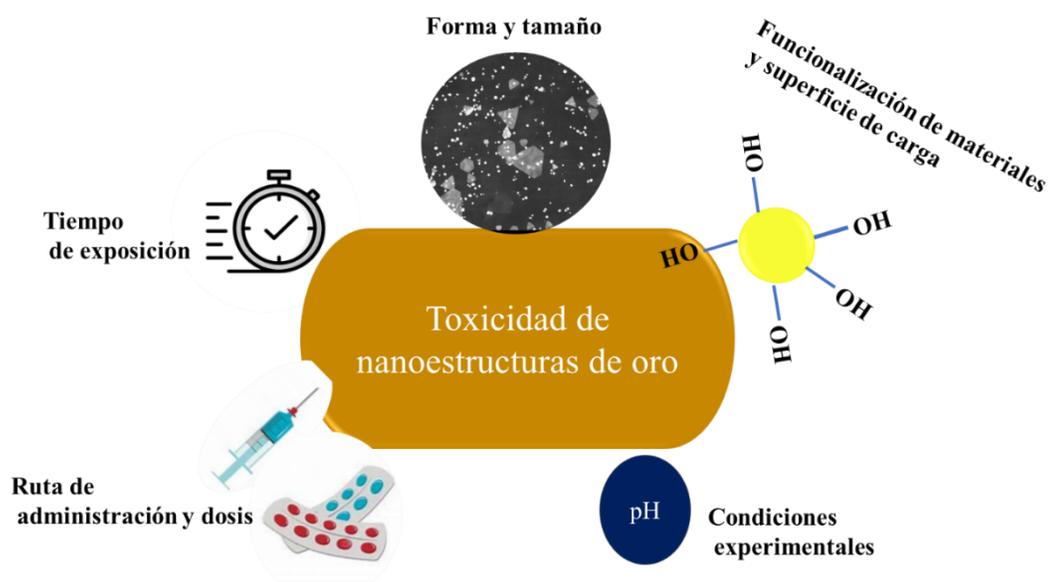


Figura 3. Condiciones de toxicidad de las nanoestructuras de oro, se muestran las principales condiciones que afectan la biocompatibilidad de las nanoestructuras. Figura modificada de Milan et al., 2022.

2.4 Extractos

Los extractos de plantas son compuestos bioactivos concentrados por diferentes técnicas de extracción. Estos compuestos bioactivos pueden dividirse en metabolitos primarios, los cuales son necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de la planta, los cuales incluyen ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y las moléculas presentes en todas las plantas para su crecimiento y desarrollo, como los reguladores del crecimiento y los componentes de la pared celular. Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por las plantas que permiten que esta se adapte a su entorno local [46]. Cualquier especie de planta que se propague en un nicho desfavorable, como los bosques tropicales tibios y acuáticos, se esforzará por preservarse mediante la producción de biomoléculas que pueden tener propiedades insecticidas, fungicidas, antibacterianas o antivirales. Los compuestos que generalmente se consideran metabolitos secundarios son glucósidos, ácidos orgánicos, compuestos terpénicos, sustancias aromáticas no nitrogenadas, antocianinas, nitrogenados (aminas, betaínas, alcaloides, compuestos de cianuro) [47]. Dependiendo de tipo de compuestos que se requieren extraer se aplican diferentes técnicas, en los apartados siguientes se explicarán dos de ellos, la decocción y la extracción Soxhlet.

2.4.1 Decocción

Esta técnica de extracción es empleada para los fitoquímicos que no se descomponen ni se modifican con el aumento de la temperatura. En una decocción por lo general se utilizan partes

como las hojas, raíces, tallos tiernos y flores, estos se hierven en agua (100 °C) durante 15 a 60 minutos para la extracción de fenoles y flavonoides. En cambio, en las partes más duras de la planta como las ramas o la corteza, las decocciones pueden durar más de una hora. Después de hervir, la mezcla se enfría y luego se cuela [46]. Finalmente, el extracto puede ser empleado o resguardado fuera de la luz y en refrigeración (4 °C).

2.4.2 Extracción de Soxhlet

La extracción Soxhlet es una extracción continua de fitoquímicos utilizando un disolvente caliente. El material vegetal molido se coloca en un dedal (bolsa porosa) hecho de un papel de filtro firme o celulosa. El dedal lleno de material vegetal molido se coloca en el compartimento de la parafernalia Soxhlet. El disolvente de extracción, como el etanol o el metanol, se coloca en el matraz inferior. A continuación, el disolvente se calienta y vaporiza en el dedal de muestra, se condensa en el condensador situado en la parte superior del aparato y luego vuelve a gotear, lo que da lugar a la extracción de fitoquímicos [48].

2.5 Características y constituyentes fotoquímicos de la planta *Satureja macrostema*

En México, existe una gran variedad de plantas empleadas en la medicina tradicional, las cuales son ampliamente usadas en decocciones, maceraciones, emplastos entre otras para en tratamiento de diversas enfermedades. Una planta interesante para su estudio es *Satureja macrostema*, perteneciente a la familia Lamiacea y también conocida como “nurite” (Fig. 4) [49]. Esta planta se emplea en decocciones e infusiones para el tratamiento de diversas enfermedades, como el dolor de estómago y las enfermedades hepáticas e intestinales. El aceite esencial obtenido por extracción de hexano de las partes aéreas de esta planta contiene principalmente terpenos como el limoneno, la pulegona y el timol, lo que sugiere que algunos de sus efectos farmacológicos podrían atribuirse a la presencia de estos valiosos constituyentes. El limoneno y el timol son algunos de los terpenos con mayor actividad antioxidante en las plantas [50]. Con diferentes especies de *Satureja* se han realizado estudios donde se le han destacado propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antiproliferativas, efectos antidiarreicos, vasos relajantes, antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antiespasmódico y anticoagulantes [51], por lo que por sus propiedades y los compuestos que posee, resulta una planta interesante para su aplicación en la síntesis de nanopartículas.



Figura 4. Planta *Satureja macrostema* en su habitad natural.

2.6 Extracto lipídico de la semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*)

El aguacate (*Persea americana* Mill) es una angiosperma de la familia Lauraceae y del género *Persea* [52]. El aguacate incluye tres variedades botánicas: el aguacate guatemalteco (*P. americana* var. *guatemaltensis*), el antillano (*P. americana* var. *americana*) y el mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*). El aguacate mexicano es pequeño y contiene un alto porcentaje de aceite, mientras que el aguacate antillano es más grande y tienen un menor contenido de aceite, además la semilla de aguacate nativo mexicano contiene una gran cantidad de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos a los cuales presentan propiedades beneficiosas para la salud [53]. Es por esto que recientemente se reportó un extracto de la semilla de aguacate rico en lípidos (LEAS), el cual contiene ácidos grasos de cadena larga y acetogeninas alifáticas como avocatinas, pahuatinas, persinas y alcoholes grasos polihidroxilados [54]. Las acetogeninas del aguacate tienen cadenas alifáticas con un número impar de carbonos (17, 19 y 21), con insaturaciones y un grupo acetoxi en el carboxilo terminal, otra característica distintiva es la presencia de grupos hidroxilo a lo largo de la cadena (Fig. 5) [54]. A este extracto se le han reportado efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y citotóxicos en líneas celulares de cáncer de colon, cáncer de mama, melanoma murino a través de la inducción de apoptosis [55,56]. Sin embargo, la concentración del extracto puede ser citotóxica en tejidos sanos, por lo que con ayuda de la nanotecnología se propone disminuir la concentración del extracto, manteniendo sus efectos citotóxicos.

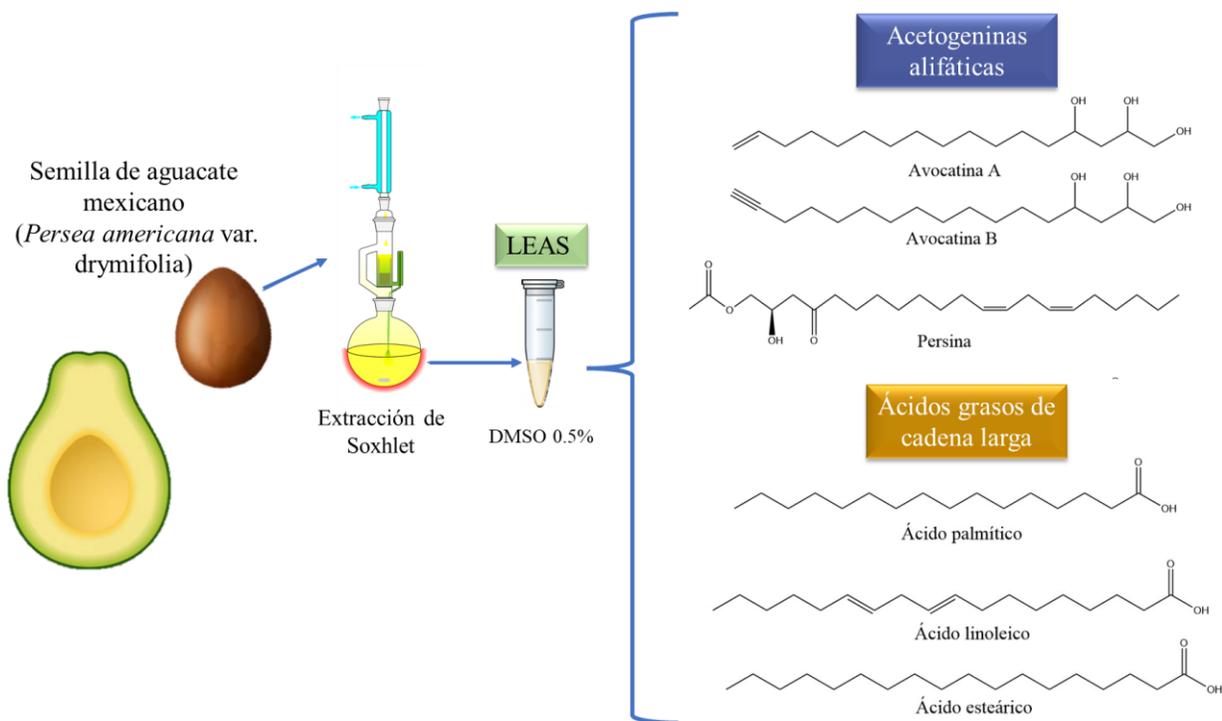


Figura 5. Extracto de la semilla de aguacate rico en lípidos (LEAS). Esquema del método de extracción y los principales componentes de LEAS.

2.7 Aplicaciones de nanomateriales de oro

2.7.1 Electroquímicas

La caracterización electroquímica es una serie de técnicas dentro del campo de la electroquímica que se utilizan para analizar y comprender las propiedades y comportamientos de los materiales o sistemas. Estas técnicas incluyen la aplicación de estímulos eléctricos y la medición de las señales eléctricas o electroquímicas resultantes para obtener información sobre diversas propiedades, como la conductividad, la reactividad de la superficie, la resistencia a la corrosión, la actividad catalítica y el transporte iónico. Las técnicas de caracterización electroquímica son herramientas valiosas para el análisis de las especies en solución y en estado sólido. Con estas técnicas se puede dar solución a problemas como el control de contaminación de aguas, la eliminación de metales pesados, la degradación de contaminantes orgánicos y la valorización de subproductos de desecho [57]. Dentro de las técnicas más empleadas en electroquímica se encuentra la voltamperometría cíclica, cronoamperometría e impedancia que serán explicadas a continuación.

La voltamperometría cíclica (CV) es un método comúnmente utilizado para explorar los procesos de reducción y oxidación de especies moleculares. La voltamperometría cíclica caracteriza los sistemas electroquímicos midiendo la respuesta de la corriente (i) como función de la tensión

aplicada (E) (ivs. E), proporcionando información sobre las reacciones redox, la cinética de transferencia de electrones y la estabilidad electro activa de las especies [57]. Esta técnica consiste en barrer lineal y cíclicamente la tensión mientras se supervisa la respuesta de corriente resultante, permitiendo determinar los potenciales máximos, las corrientes máximas y otros parámetros electroquímicos.

Por otro lado, la cronoamperometría es una técnica electroquímica que mide la corriente eléctrica (i) en función del tiempo (i vs. t) cuando se aplica un potencial eléctrico constante (E) a un electrodo. A diferencia de la voltamperometría cíclica, que implica la aplicación de un potencial que varía cíclicamente, la cronoamperometría mantiene un potencial constante y mide la corriente eléctrica resultante a lo largo del tiempo [57].

La medición de impedancia (Z) es una técnica utilizada para caracterizar el comportamiento eléctrico de un sistema en respuesta a una señal eléctrica alterna (para un rango de frecuencia fijo). La impedancia es una medida de la resistencia de un circuito eléctrico a la corriente alterna (según la ley de Ohm) y puede incluir componentes de resistencia, capacitancia e inductancia [57]. Existen varias técnicas de medición de impedancia, como la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), que se usa ampliamente para estudiar procesos electroquímicos en baterías, sensores y otros sistemas electroquímicos.

2.7.2 Tratamiento contra el cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizada por la pérdida del ciclo celular y la diseminación de las células afectadas a otras partes del cuerpo. Cuando se genera una proliferación inapropiada se genera una masa de células denominadas tumor, si este tumor comienza a invadir tejidos cercanos se le denomina cáncer invasivo, finalmente cuando los tumores liberan células al torrente sanguíneo y se establecen nuevos tumores se le denomina metástasis [57], como se representa en la Figura 6. Los tumores amenazan la vida de una persona cuando su crecimiento altera los tejidos y órganos necesarios para la supervivencia.

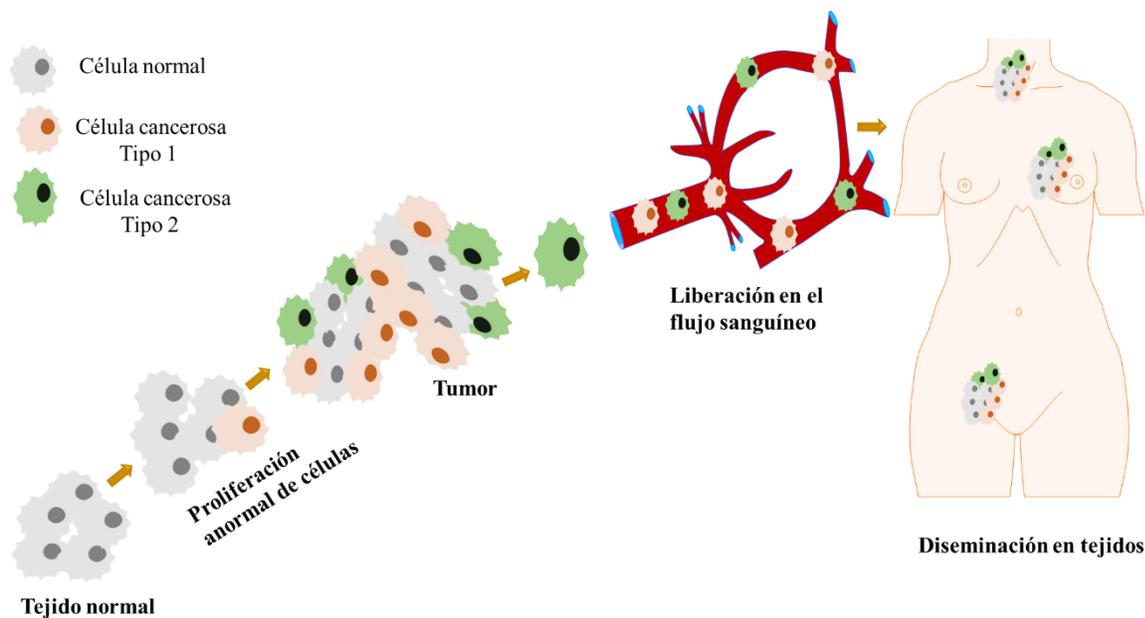


Figura 6. Esquema del inicio, desarrollo del cáncer y metástasis.

El cáncer puede desarrollarse en casi cualquier tipo de tejido; sin embargo, cada tipo de cáncer tiene sus características únicas, por lo que su tratamiento cada vez es más específico, pero durante muchas décadas solo hubo unas pocas opciones de tratamiento para los pacientes, que incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia como tratamientos únicos o en combinación. Actualmente los nuevos enfoques buscan la investigación genómica y proteómica, que están ayudando en la identificación de nuevos objetivos moleculares específicos de tumores que ayudarán en la síntesis de una molécula de fármaco de "ajuste específico" con una actividad terapéutica delicada y efectos secundarios mínimos [59]. Otros enfoques que se evalúan es la administración de fármacos que incluyen nanopartículas, liposomas, polímeros, micelas, dendrímeros, micro emulsión, etc. Estos sistemas pueden proporcionar especificidad tumoral, mantener la concentración terapéutica del fármaco durante largos períodos de tiempo y reducir las toxicidades relacionadas con el fármaco. Sin embargo, estos novedosos sistemas de administración de fármacos también adolecen de uno o más inconvenientes; específicamente, baja eficiencia de encapsulación y poca estabilidad de almacenamiento de liposomas, capacidad de carga limitada del fármaco y capacidad solo para moléculas pequeñas en el caso de polimerosomas y micelas [60].

2.7.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama es un cáncer desarrollado en la mama, y dependiendo del tipo de tejido en la glándula mamaria donde se desarrolla se denominan cáncer invasivo lobular, carcinoma *in situ* ductal y cáncer invasivo ductal [58]. En algunos casos un solo tumor de mama pueden ser una

combinación de estos tipos de cáncer. La carcinogénesis no está bien establecida, pero existen factores de riesgo como el sexo, factores hormonales, edad, factores genéticos, dieta, consumo de alcohol y la exposición a la radiación para el desarrollo de cáncer de mama [61].

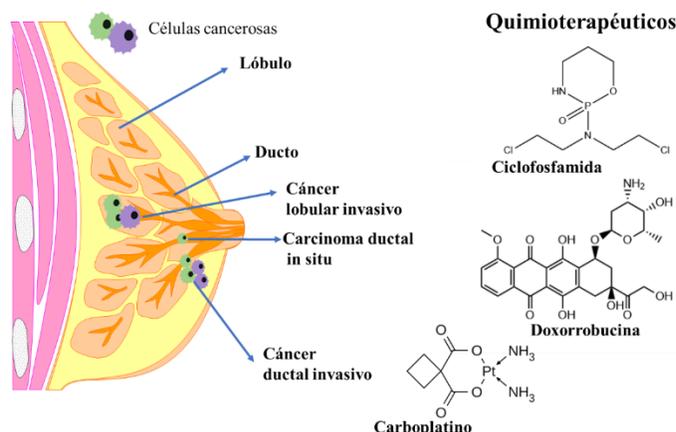


Figura 7 Esquema de cáncer de mama y principales quimioterapéuticos empleados. Modificado de Isha Shah et al 2021, [57].

El tratamiento del cáncer de mama depende de la etapa del cáncer y del riesgo. Después de la remoción quirúrgica de mama, uno de los tratamientos más utilizados es la quimioterapia, que es un tratamiento con medicamentos que matan a las células cancerosas y se administran por vía oral e intravenosa. Los medicamentos viajan a través del torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo. La quimioterapia se administra en ciclos, y cada período de tratamiento va seguido de un período de recuperación. El tratamiento suele durar varios meses. Es más eficaz cuando se utilizan combinaciones de más de un fármaco [62]. Los quimioterapéuticos mayormente empleados son la ciclofosfamida, el metotrexato, la epirubicina, la doxociclina, el carboplatino y la combinación de estos [58]. A pesar de que la quimioterapia se considera eficaz, su uso muy a menudo provoca varios efectos secundarios, como pérdida del cabello, náuseas/vómitos, diarrea, llagas en la boca, fatiga, mayor susceptibilidad a las infecciones, supresión de la médula ósea, combinada con leucopenia, anemia, hematomas o sangrado más fáciles, leucemias secundarias, daño cardíaco, deterioro de las funciones mentales, interrupciones del ciclo menstrual (en el caso de mujeres) y problemas de fertilidad [63]. Es por esto que se deriva la necesidad de encontrar nuevos enfoques, que podrían ser nanotecnológicos en el tratamiento del cáncer de mama.

2.7.4 Melanoma

El melanoma es la formación o crecimiento descontrolado de tejidos derivado de la transformación maligna de los melanocitos. Los melanocitos se derivan de la cresta neural [64]. Por lo tanto, los melanomas, aunque surgen de la piel, pueden desarrollarse en otros lugares como el cerebro y el

estómago. La tasa de supervivencia relativa a 5 años para los pacientes con melanoma en estadio I o melanoma *in situ* es del 97%, en comparación con el 30% para los pacientes con enfermedad en estadio IV. El tratamiento del melanoma suele consistir en la resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fototérmica entre otros, que dependen de la ubicación del tumor, la profundidad, la ulceración, la afectación de los ganglios linfáticos y la metástasis [65]. El melanoma avanzado, definido como enfermedad irresecable o metastásica, se ha asociado históricamente con un mal pronóstico [66]. A pesar de estos avances, persisten desafíos, incluido el tratamiento de las metástasis cerebrales, los subtipos raros de melanoma, además de la aparición de resistencia a las terapias actuales, por lo que terapia fototérmica y la dirección de fármacos con nanopartículas pueden ser una alternativa de tratamiento.

2.8 Estado del arte

2.8.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con extractos

Existe una gran variedad de protocolos de síntesis para la obtención de AuNEs; sin embargo, la mayoría de estos métodos químicos pueden utilizar reactivos tóxicos y elevadas temperaturas durante el proceso, lo que puede ser peligroso para el ser humano y para el ambiente [67]. No obstante, la síntesis verde es muy prometedora para la obtención de AuNEs, se ha reportado el uso de bacterias, hongos y plantas los cuales poseen moléculas reductoras y estabilizantes que favorecen las reacciones de síntesis [68]. Particularmente, los métodos que usan plantas utilizan la semilla, hojas, tallo y frutos. Al ser obtenidas mediante extractos acuosos es fácil su purificación por centrifugación o filtrado. Para el mecanismo de síntesis se aprovechan los grupos funcionales ($-C-O-C-$, $-C-O-$, $-C=C-$, y $-C=O-$) presentes en los flavonoides, alcaloides, polifenoles y fenoles, para reducir una sal metálica precursora ($HAuCl_4$) de Au^{3+} a Au^0 , en donde el proceso puede durar desde unos minutos hasta horas [69].

Las AuNps sintetizadas por métodos verdes, presentan actividades biológicas como antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerosa. La tabla 3 muestra diversos estudios recientes de síntesis de AuNps, donde se utilizaron diferentes extractos de plantas para su aplicación en el campo biomédico. En estos estudios se obtienen tamaños de nanopartícula entre 3 - 100 nm y diferentes morfologías. Cabe destacar que en su mayoría no se ha elucidado el mecanismo por el cual se tiene la actividad antimicrobiana o anticancerosa lo que es un nicho de oportunidad para su estudio.

Tabla 3. Estado del arte de AuNPs obtenidas por síntesis verdes para aplicaciones biomédicas.

Planta o extracto utilizado	Morfología /Tamaño	Aplicación	Puntos destacados	Referencia
-----------------------------	--------------------	------------	-------------------	------------

Ananas comosus (piña) y Passiflora edulis (fruta de la pasión)	Esféricas 20.71 ± 7.44 nm y 18.68 ± 5.55 nm.	Posibles aplicaciones biomédicas	Demostraron que no son citotóxicas	[70]
Hylocereus undatus (Fruta dragón)	Esféricas 40-100 nm	Tratamiento en heridas	Las AuNps potencializan la actividad antibacteriana del extracto	[71]
Moringa oleifera (semilla de moringa)	Esféricas y hexagonales 35- 51 nm	Anticancerosas en MFC- 7 67.92 µg/ml de IC 50.	Posible actividad de las AuNps – antioxidantes. Antidiabéticas y anticancerosas.	[72]
Linum usitatissimum (linaza)	Esféricas y triangulares 3.4-6.9 nm	Evaluación de las AuNps en actividad anticancerosa	Las AuNps tienen actividad antioxidante IC ₅₀ =73 mg/ml	[73]
Acai berry (fruto de palma de acai)	Esféricas, rodillos y triángulos 12 – 19 nm	Evaluación en cáncer de próstata y pancreático	No identifican el mecanismo por el cual se tiene la actividad anticancerosa	[74]
Salvia officinalis (salvia)	Esféricas 6 y 24 nm aproximadamente	Alta eficiencia catalítica para la reducción de p-nitrofenol y azul de metileno	Las partículas más pequeñas tienen mayor capacidad catalítica	[75]

2.8.2 Propiedades electroquímicas en la valorización de glicerol

El glicerol es una molécula importante de biomasa, de la cual se pueden obtener productos de valor añadido como el ácido glicérico, la dihidroxiacetona, el gliceraldehído, el ácido glicólico, el ácido oxálico, el mesoxalato y el ácido fórmico [76]. Estos productos se utilizan ampliamente en química

fina, farmacia, revestimientos y otros campos. Para la valorización del glicerol crudo se ha propuesto el uso de nanomateriales de oro, debido a que es el metal más electronegativo, teniendo un potencial redox Au^+/Au^0 muy elevado de +1,691 V, puede existir en los estados de oxidación +1 y +3, por lo que tiene una afinidad especial por la oxidación del CO, considerando al oro un catalizador muy eficaz [77]. Generalmente los nanomateriales de oro son soportados en carbón para ser evaluados en la oxidación de glicerol, se ha reportado que las partículas de oro pequeñas en términos de masa se activan a potenciales más bajos, lo que da lugar a potenciales de inicio más bajos para la oxidación del glicerol, mientras las partículas de oro grandes tienen potenciales de inicio mucho más altos, una mayor actividad específica y son menos estables durante la oxidación del glicerol. Además, se ha observado que las facetas del Au, también influyen en los potenciales de inicio, por ejemplo, en facetas Au(110) se tienen potenciales más bajos y en alta proporción de facetas Au(111) potenciales de inicio más altos[78]. En la tabla 4 se muestran los estudios electroquímicos sobre la valorización de glicerol con nanoestructuras de oro.

Tabla 4. Estado del arte de AuNEs en estudios electroquímicos.

Morfología / tamaño	Método de síntesis	Condic ión para electro oxidación	Glicer ol analíti co $E_{\text{onset}}/ \text{V vs. NHE}$	Densid ad de corrien te	Glice rol crudo $E_{\text{onset}}/ \text{V vs. NHE}$	Densid ad de corrien te	Condic ión	Refere ncia
Esférica/ 2.5-4.5 nm	PVA método de protección	0.1 M KOH y 0.1 M glicerol	-0.26	188 mA mg-1	--	--	--	[79]
Esférica / 3.94 nm	PVA método de protección	0.1 M KOH y 0.1 M glicerol	-0.6	4.35 mA cm-2	--	--	--	[80]
Esférica / 3.5 nm	Método de reducción de fase	1.0 M KOH y 0.5 M glicerol	-0.058	117 mA cm-2	--	--	--	[81]
Semiesférica / >300 nm	Amperometría de pulso diferencial (DPA)	3M KOH y 0.3 M glicerol	-0.05	251.4 mA cm-2	-0.13	56.2 mA cm-2	3 MKOH y 0.5 M glicerol crudo	[82]

Semiesférica/ 17.1 nm ± 2.4 nm	Síntesis verde – zanahoria negra	1.5 M KOH y 0.5 M glicerol	-0.25	278.39 mA mg-1	-0.18	446. mA mg-1	1.5 M KOH y 1M glicerol crudo	[83]
Partículas triangulares, rodillos, alambres y semiesféricas/ 23.5 ± 9.7 nm	Método de Turkevich	1 M KOH y 0.5 M glicerol	-0.1	229.56 mA mg-1	0.02	244 mA mg-1	1M KOH y 1 M glicerol crudo	
Semiesféricas / 16.2 ± 1.4	Electrocatalisi s	1M KOH y 0.5 M glicerol	-0.12	77.39 mA mg-1	-0.12	50.28 mA mg-1	1M KOH y 1 M glicerol crudo	[84]

2.8.3 Aplicaciones en células de cáncer MCF-7

La línea celular MCF-7 (Michigan Cancer Foundation –7) se aisló en 1970 a partir del derrame pleural de una mujer caucásica de sesenta y nueve años con adenocarcinoma de mama metastásico. MCF-7 es un subtipo Luminal A de cáncer de mama que expresa receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides. Las MCF-7 son células de cáncer de mama dependientes de hormonas. Estas células del epitelio mamario tienen un bajo potencial metastásico y son poco agresivas en comparación con las células MDA-MB-231 independientes de las hormonas [85,86]. En la tabla 5 se muestran estudios actuales con las células MCF-7 y nanoestructuras donde se evaluó su citotoxicidad, funcionalización con quimioterapéuticos y mecanismos de distribución.

Tabla 5. Estado del arte de estudios de AuNEs con el modelo de células MCF-7.

Tipo de síntesis	Morfología y composición	Tamaño	Puntos destacados	Referencia
------------------	--------------------------	--------	-------------------	------------

Síntesis química	Esferas y flores AuNPs AuNFs	14.76 nm 77.21 nm	Evaluaron la distribución de las nanoestructuras a una concentración de 19.7 µg/ml de AuNEs, modifican proteínas que regulan proliferación celular, heat shock y metabolismo causando daño celular	[87]
Síntesis coloidal	Semiesféricas AuNPs AgNPs Au/AgNPs	10-30 nm	Presentan actividad citotóxica AuNPs IC ₅₀ : 3184 µM Au/AgNPs IC ₅₀ :180 µM Las bimetalicas inducen especies reactivas de oxígeno (ROS)	[88]
Síntesis química	Esferas AuNPs	10-20 nm	Realizaron una combinación de 5 mM de metformina y 10 mM de AuNPs encontrando que inhiben proliferación celular, inducen citotoxicidad y apoptosis	[89]
Síntesis química con resveratrol y kaemferol y funcionalizadas con doxorubicina	Esferas k-AuNps-doxo r-AuNps-doxo	75 nm 44 nm	AuNPs se absorben por endocitosis. Los conjugados k-AuNps-doxo IC ₅₀ : 24 µg/ml y r-AuNps-doxo IC ₅₀ : 15 µg/ml disminuyen más viabilidad celular en comparación de la doxorubicina libre	[90]
Síntesis verde semilla de <i>Euphorbia acaulis</i>	AuNPs AgNPs	1-100 nm	Tienen actividad anticancerosa, inducen apoptosis, antibacteriana, antilarvica y fotocatalítica con AuNPs IC ₅₀ : 59 µg/ml y AgNPs	[91]

			IC ₅₀ :91 µg/ml	
--	--	--	----------------------------	--

2.8.4 Aplicaciones en células B16-F0 de melanoma murino

El modelo de melanoma subcutáneo murino es empleado en la evaluación de modelos de tumores, donde se emplean las células B16-F0. Con esta línea celular se realiza una inyección subcutánea y entre 5 a 20 días se puede observar un tumor palpable. El tratamiento de melanomas depende de su estadio; sin embargo, los tratamientos más empleados son la cirugía, quimioterapia y radiación [92]. Es interesante el uso de esta línea celular para la aplicación de nanomateriales con potencial uso en radio terapia, terapia fototérmica e hipertermias. En la siguiente tabla se muestran estudios relevantes de las células B16-F0 con diversos enfoques de aplicación de nanomateriales.

Tabla 6. Estado del arte de estudios de AuNEs con el modelo de células B16-F0.

Tipo de síntesis	Morfología y composición	Tamaño	Puntos destacados	Referencia
Síntesis verde β-d-glucosa	Esférica AuNPs, Glu-AuNPs, Au-lípidos	49.5 nm 53.6 nm 123 nm	Evaluaron diferentes concentraciones (20 y 40 µg/ml) y morfologías encontrando que reducen la viabilidad celular. Glu-AuNPs, Au-lípidos aumentan la sensibilidad a la radiación se induce apoptosis con Glu-AuNPs, Au-lípidos y radiación	[93]
Reemplazamiento galvánico de AgNC	Jaula AuNC AuNC-DOX-PDA	170 nm	La aplicación de un recubrimiento de biopolímero termosensible en la plataforma AuNC DOX permitió una terapia combinada fototérmica y de quimioterapia eficaz. El uso de un modelo tumoral B16-F0 demostró una mayor penetración tumoral y actividad	[94]

			anticancerígena de la nanoplataforma dirigida	
Síntesis química y reacción de reemplazamiento galvánico	Esferas Estrellas y rodillos GNPs, GNSs, and GNRs	53 nm 54 nm 50 nm	La viabilidad celular disminuye a partir de los 200 µg/ml de las nanoestructuras. Se mostraron efectos sensibilizantes de la radiación dependientes de la dosis y de morfología de nanoestructuras de Au, el efecto citotóxico fue por la regulación de ROS y la inducción de apoptosis.	[31]

CAPITULO III

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Este capítulo presenta la propuesta experimental de la investigación. En la figura 8 se incluye de manera general las etapas principales del proceso, desde la obtención de los extractos para la síntesis y caracterización de los nanomateriales hasta las aplicaciones que se le dio a cada uno de ellos.

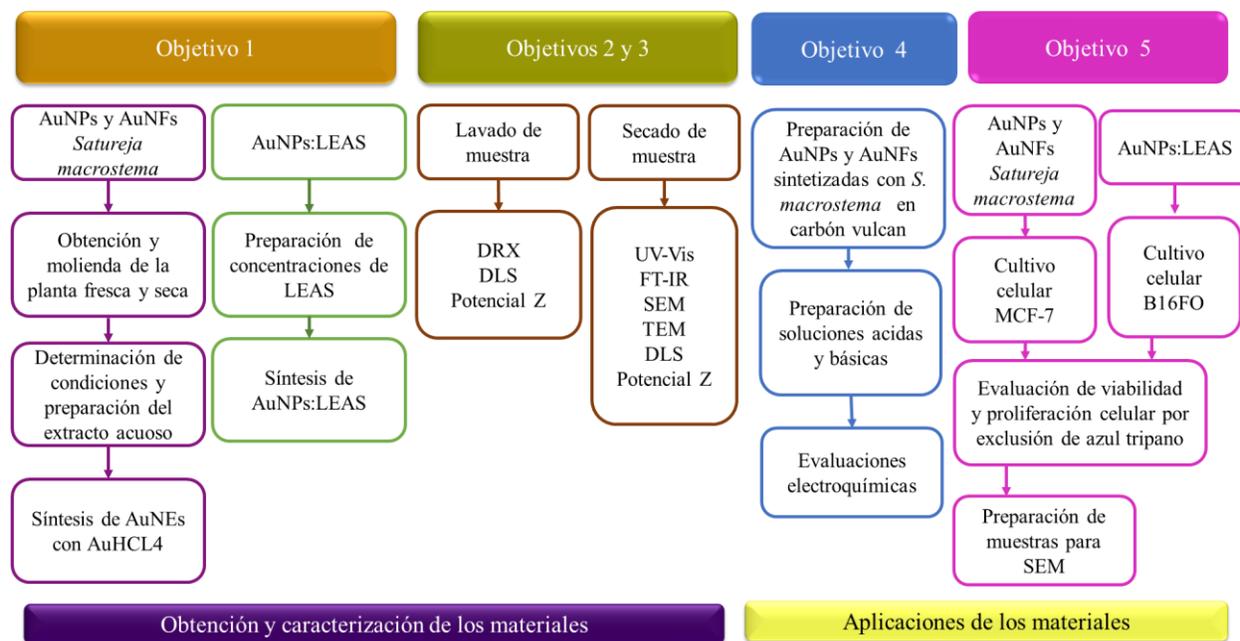


Figura 8. Esquema de la metodología experimental empleada.

3.1 Síntesis de nanopartículas de Au con el extracto de *Satureja macrostema*

La planta *S. macrostema* se obtuvo de un mercado local de la ciudad de Morelia, Mich. La planta se dejó secar por 1 día tapada de la luz, para la síntesis de AuNPs con morfología esférica es necesario que las hojas no tengan más de 15 días cortadas de la planta. Posteriormente las hojas se sometieron a un proceso de molienda mecánica hasta formar un polvo fino homogéneo y sin un tamaño de partícula en específico.

Para la infusión se empleó el extracto acuoso de las hojas de la planta *S. macrostema* a una concentración final de 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 g/ml a temperatura ambiente, para hacerla reaccionar con 5 ml de la solución de sal precursora HAuCl₄ (Sigma Aldrich, 99.9%) a 5 mM, 10 mM y 15 mM para formar una relación volumétrica 1:1, como se observa en la figura 9.

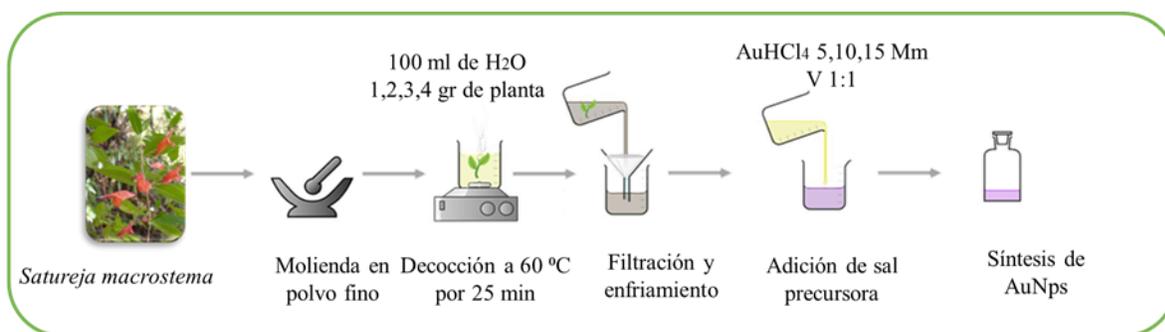


Figura 9. Esquema mostrando la metodología de síntesis de las nanopartículas (AuNPs).

3.2 Síntesis de nanoflores de Au con el extracto de *Satureja macrostema*

Del mismo modo del apartado anterior se obtuvo la planta *S. macrostema* en un mercado local de la ciudad de Morelia, Mich. Para la síntesis de AuNFs es necesario que la planta sea cortada y almacenada y secada por 15 días, posteriormente las hojas de la planta se sometieron a un proceso de molienda mecánica hasta formar un polvo fino homogéneo y sin un tamaño de partícula en específico.

Se preparó el extracto acuoso de las hojas de la planta *S. macrostema* a una concentración final 0.04 g/ml a temperatura ambiente, para hacerla reaccionar con 5 mL de la solución de sal precursora HAuCl₄ (Sigma Aldrich, 99.9%) a 5 mM para formar una relación volumétrica 1:1. Después de 30 min se observó el cambio de coloración a marrón-dorado.



Figura 10. Esquema que muestra la metodología de síntesis de las nanoflores (AuNFs).

3.3 Síntesis de nanopartículas de Au con el extracto lipídico de la semilla de aguacate

Se empleó el extracto de la semilla de aguacate (LEAS), obtenido como lo describe Báez-Magaña [54] a una concentración de 705 µg/ml en DMSO 5% y una solución de sal precursora HAuCl₄ (Sigma Aldrich, 99.9%) a 5 mM. Se mezclaron en una relación volumétrica 1:1 y se dejó reaccionar en agitación (80 rpm) por 24 h. La figura 11 presenta el mecanismo de síntesis de las AuNPs: LEAS.

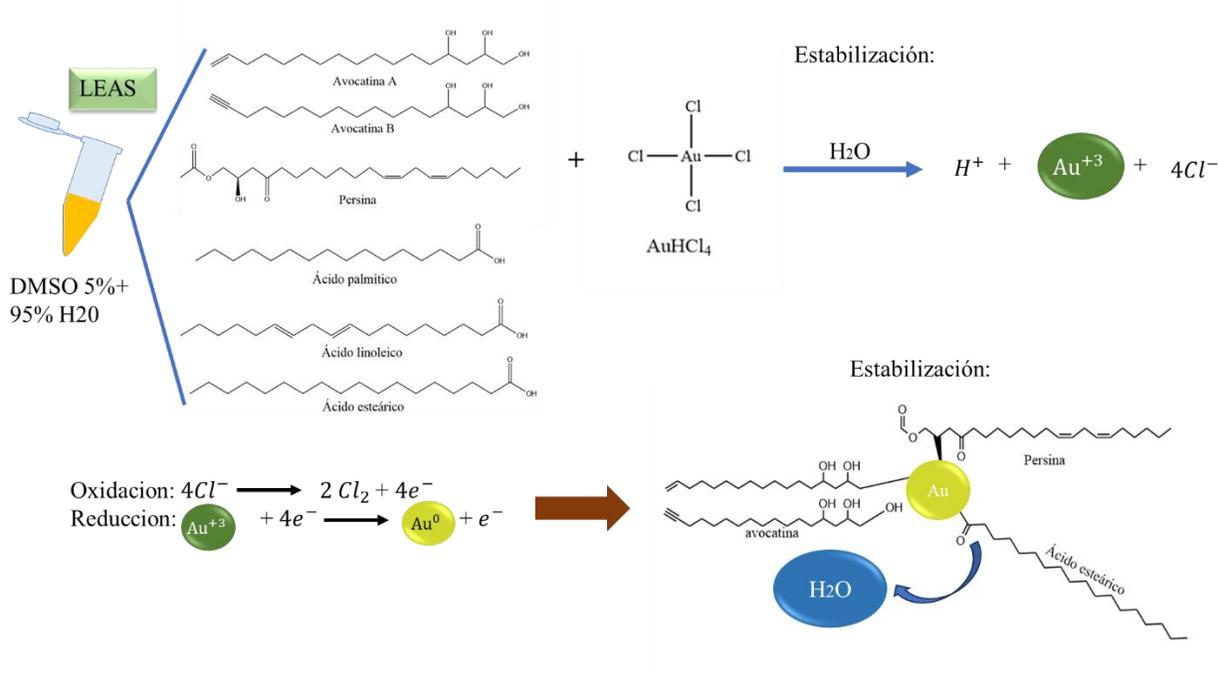


Figura 11. Esquema de metodología de síntesis de AuNPs con el extracto de aguacate LEAS.

3.4 Caracterización morfológica y estructural de las nanoestructuras

3.4.1 Espectroscopía de UV-Vis

Las propiedades ópticas se estudiaron mediante la técnica de espectrofotometría de ultravioleta – visible (UV-Vis), los análisis fueron realizados con un equipo VELAB (VE-5100UV) con el Software MetaSpec pro. Se utilizó una celda de cuarzo con un volumen de 2.5 ml. Se realizó un barrido de 200 a 800 nm. Se utilizó como blanco agua desionizada, extracto acuoso de las hojas de la planta *Satureja macrostema* o DMSO al 5% y el extracto de LEAS en las nanopartículas sintetizadas con este extracto. Esta técnica permitió obtener los espectros de absorción del material, a fin de determinar la región de absorbancia.

3.4.2 Difracción de rayos X

Utilizando el equipo de difracción de rayos X D8 Advance-Bruker, con un ánodo de Cu y una radiación de $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, se determinó la estructura cristalina de los nanomateriales sintetizados. Se utilizó un rango angular $2\theta = 20-80^\circ$, con un tiempo de paso de 0.6 e incremento de 0.2. Los picos de difracción se indexaron por la comparación de las posiciones angulares 2θ de acuerdo a las cartas cristalográficas ICDD. Los datos se analizaron con Origin 8.

3.4.3 Espectroscopía de infrarrojo

Se examinaron los grupos funcionales del extracto de *Satureja macrostema* puro y de las AuNPs sintetizadas con el extracto de *S. macrostema* mediante espectroscopía infrarroja. Se secaron las

muestras en una estufa (LINDBERG/BLUE) a 60 °C por 24 h, posteriormente se hicieron pastillas con KBr (Sigma -Aldrich) y se utilizó un equipo Bruker Tensor 27, en transmitancia evaluando de 4000 a 400 cm^{-1} . Esta evaluación se realizó con la finalidad de determinar los grupos funcionales involucrados en la síntesis y estabilización de los materiales al observar la comparación de los grupos funcionales del extracto puro con el extracto donde se sintetizaron las AuNps.

3.4.4 Cromatografía de gases acoplada a masas

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies (7 890A) equipado con un detector de masas (Agilent 5 975C). Los tiempos de retención y los espectros de masas de cada compuesto se compararon utilizando la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST08). Se cuantificaron por relación directa con el patrón interno del tetradecano (Sigma Aldrich®). Las condiciones utilizadas fueron tomadas de lo reportado por Torres-Martínez [94].

3.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido

Se examinó la morfología, el tamaño y la dispersión de las AuNps mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (SEM). Se secaron las muestras en vidrios de silicio orientado y se colocaron al vacío por 6 h. Se utilizó un equipo JEOL JSM-7600F y Hitachi SU8230, un microscopio de campo frío (CFE-SEM, Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan). El análisis químico puntual de las muestras se obtuvo mediante un EDS usando un detector BRUKER XFlash 6-30.

3.4.6 Microscopía Electrónica de Trasmisión

Se observó la morfología, tamaño y estructura de los nanomateriales. Las muestras en polvo se re suspendieron en isopropanol, se colocó una gota de las soluciones líquidas en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y se secó la gota a temperatura ambiente. Se analizaron los nanomateriales por medio de imágenes de campo claro, difracción de electrones y alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés), en un equipo FEI-Titán G2 80-300.

3.4.7 Fotoluminiscencia

Se evaluó la fotoluminiscencia en un equipo Varioskan Flash, con una longitud excitación de 250 nm en un barrido de 270 a 600 nm. Se utilizó una placa de 96 pozos Corning de fondo plano con paredes blancas.

3.4.8 Potencial Z y DLS

El análisis del potencial zeta se llevó a cabo para evaluar la estabilidad coloidal de las muestras utilizando el Litesizer 500 de Anton Paar (Graz, Austria) y celdas reutilizables con un volumen 300 μL a 25 °C. Las muestras fueron dispersadas en agua. El tamaño de las partículas se estimó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un analizador de partículas Litesizer 500 Anton Paar (Graz, Austria), con un diodo láser semiconductor (λ 658 nm) y una celda desechable.

3.5 Caracterización y evaluación electroquímica de nanoflores de Au

Se utilizó una celda electroquímica de tres electrodos empleando un potenciostato/galvanostato Biologic SP-50. Se utilizaron como electrodo de referencia y contraelectrodo un electrodo de calomel saturado (0.241 V frente a NHE) y una varilla de grafito, respectivamente. La tinta de AuNFs se colocó en carbón Vulcan® en una relación 80:20 (C/AuNFs), además se le adicionó a la tinta 7 $\mu\text{l mg}^{-1}$ de Nafion® y 70 $\mu\text{l mg}^{-1}$ de 2-propanol utilizados como aglutinante y dispersante. La cantidad total del electrocatalizador fue de 10.4 $\mu\text{g Au}$. Para la voltametría cíclica se utilizó un medio alcalino de 2 M de KOH (pH 14) como electrolito acuoso, y una ventana de potencial de -0.45 a 0.95 V vs NHE. Además, se usó un medio ácido de 0.5 M de HSO₄ (pH 1) con una ventana 0.49 a 1.7 V vs NHE y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (0.199 V frente NHE). Estas soluciones fueron desoxigenadas con N₂ (99,999%, Infra) previamente. Todos los experimentos fueron realizados a una velocidad de barrido de 50 mV/s. La actividad electrocatalítica se evaluó con glicerol analítico (0.1, 0.5, 1.5 M) y glicerol crudo (0.5, 1.2 M) se aplicó un potencial entre -0.45 y 0.93 V frente a NHE con una velocidad de barrido de 20 mV/ s.

El glicerol crudo empleado era una mezcla de diferentes pruebas de síntesis de biodiesel a nivel piloto donde se empleó metanol y KOH grado industrial, lo que convierte al glicerol en una muestra representativa real; además, el glicerol crudo, la solución de trabajo a 1 M en KOH 2 M, y el remanente se analizó por espectroscopía Raman y se compararon con el glicerol de grado analítico (Sigma Aldrich 99,5%). Se empleó un espectroscopio HORIBA XploRA (Jobin Yvon) y un láser de 90 mW a 785 nm como línea de excitación. Los espectros Raman se procesaron con el software LabSpec6®.

Las pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se realizaron en un potenciostato/ galvanostato GAMRY Reference 3000 y se analizó al potencial de inicio (E1) y al potencial de media onda (E2). El rango de frecuencia fue de 30 000 Hz a 0.2 Hz, con 10 puntos por década y un voltaje de CA de 10 mV rms. Los espectros de impedancia se analizaron con el programa gratuito Zview®.

3.6 Preparación de muestras de células para microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las células MCF-7 se cultivaron en placas de 5 ml en medio F12-K (Sigma) suplementadas con 5% de suero fetal bovino (Corning), 5% de suero de ternera y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células B16-F0 se cultivaron en placas de 5 ml en medio DMEM (Sigma) suplementadas con 5% de suero fetal bovino (Corning), 5% de suero de ternera y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Ambas células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células se montaron en vidrios de silicona orientada (previamente tratados con colágeno de cola de rata (1 mg/ml) y se esterilizaron durante 30 min con luz UV). Las células se mantuvieron al 70% de confluencia. A continuación, se les colocó 60, 120, 240, 480 y 960 $\mu\text{g/ml}$ de AuNPs sin lavar suspendidos en medio F12-K durante 24 h. Las células no tratadas se utilizaron como control positivo, y las células tratadas con actinomicina 16 μM para las células MCF-7 o 3

μM para las células B16-F0 se utilizaron como controles. Para la observación en SEM, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se secaron durante 4 h en un horno a 60°C . Se utilizó un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-7600F, utilizando 15 kV, LABE, y una distancia de trabajo de 10.9-9.1 mm.

3.7 Funcionalización de AuNPs con quimioterapéuticos

Se empleó el extracto acuoso de las hojas frescas de la planta *Satureja macrostema* a una concentración final 0.02 g/ml a temperatura ambiente, para hacerla reaccionar con 5 ml de la solución de sal precursora HAuCl_4 (Sigma Aldrich, 99.9%) a 5 mM para formar una relación volumétrica 1:1. Después de 30 min se observó un cambio de coloración a púrpura. Posteriormente, se agregaron 400 μM de cisplatino, doxorubicina y la combinación de los fármacos para dejar en agitación 150 rpm por 24 h.

3.7.1 Evaluación de la citotoxicidad por ensayos de exclusión con azul tripano

3.7.2 Células B16-F0

Se cultivaron 2,000 células/pozo de la línea B16-F0 (melanoma murino) en placa de 96 pozos, en 100 μl de medio DMEM. Se colocaron las AuNps: LEAS a una concentración final de 42.33, 35.22, 28.22, 21.16, 14.1, 7.05, y 3.52 $\mu\text{g/ml}$, además se empleó como control las mismas concentraciones de LEAS, AuNps obtenidas por síntesis química con el mismo tamaño de nanopartícula y como control de muerte la actinomicina D (2.5 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. A continuación, se despegaron las células y se tiñeron con azul tripano (Gibco) en una mezcla 1:1, y se colocó 10 μl de la suspensión en el hemocitómetro y se contaron con la ayuda de un microscopio. Las células vivas se observan de color gris brillante y las células muertas de color azul. El análisis de resultados se realizó de 3 experimentos independientes por triplicado empleando un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) mediante la prueba de Tukey-Kramer. Los resultados se reportan como las medias \pm los errores estándar (SE), y el nivel de significancia se estableció en $P \leq 0,05$.

3.7.3 Células MCF -7

Se cultivaron 10,000 células/pozo de la línea MCF-7 de cáncer de mama en placa de 96 pozos, en 100 μl de medio F12-K. Se colocaron las AuNps con los quimioterapéuticos a una concentración final 20 μM además se empleó como control las mismas concentraciones de AuNps obtenidas por síntesis química con el mismo tamaño de nanopartícula, el extracto de *Satureja macrostema*, los quimioterapéuticos a una concentración final de 20 μM y como control de muerte la actinomicina D (20 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. A continuación, se despegaron las células y se tiñeron con azul tripano (Gibco) en una mezcla 1:1, y se colocó 10 μl de la suspensión en el hemocitómetro y se contaron con la ayuda de un microscopio. Las células vivas se observan de color gris brillante y las células muertas de color azul. El análisis de resultados se realizó de 3 experimentos independientes por triplicado empleando un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) mediante la prueba

de Tukey-Kramer. Los resultados se reportan como las medias \pm los errores estándar (SE), y el nivel de significancia se estableció en $P \leq 0,05$.

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En este apartado, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de los extractos de *Satureja macrostema* y LEAS, los nanomateriales obtenidos, además de las aplicaciones en electroquímica y la evaluación de la actividad citotóxica en células B16-F0 y MCF-7.

4.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de Au con el extracto de *Satureja macrostema*

Para determinar las condiciones ideales de síntesis, se realizaron pruebas a diferentes concentraciones del extracto (0.01 - 0.04 g/ml) y del precursor de oro (HAuCl_4) de 5 - 15 mM a temperatura ambiente (Fig. 12). El extracto cambia de color ámbar claro hasta marrón dependiendo de la concentración, presentando un olor a menta. Al añadir el precursor de oro al extracto correspondiente se registraron los tiempos de reacción y se observó el cambio de color a café oscuro; sin embargo, únicamente en la concentración de 5 mM con 0.02g/ml de extracto se obtuvo un cambio de color a púrpura a los 10 min, lo que es característico de la formación de las nanopartículas. Este tiempo es relativamente rápido y dentro del rango, ya que se han reportado tiempos de reacción desde los 10 min hasta las 24 h con extractos de plantas ricas en compuestos antioxidantes [96,97]. En el caso de las demás concentraciones, el cambio de coloración se debió a la obtención de nanoestructuras tipo flor de oro, que se discutirán en otra sección.

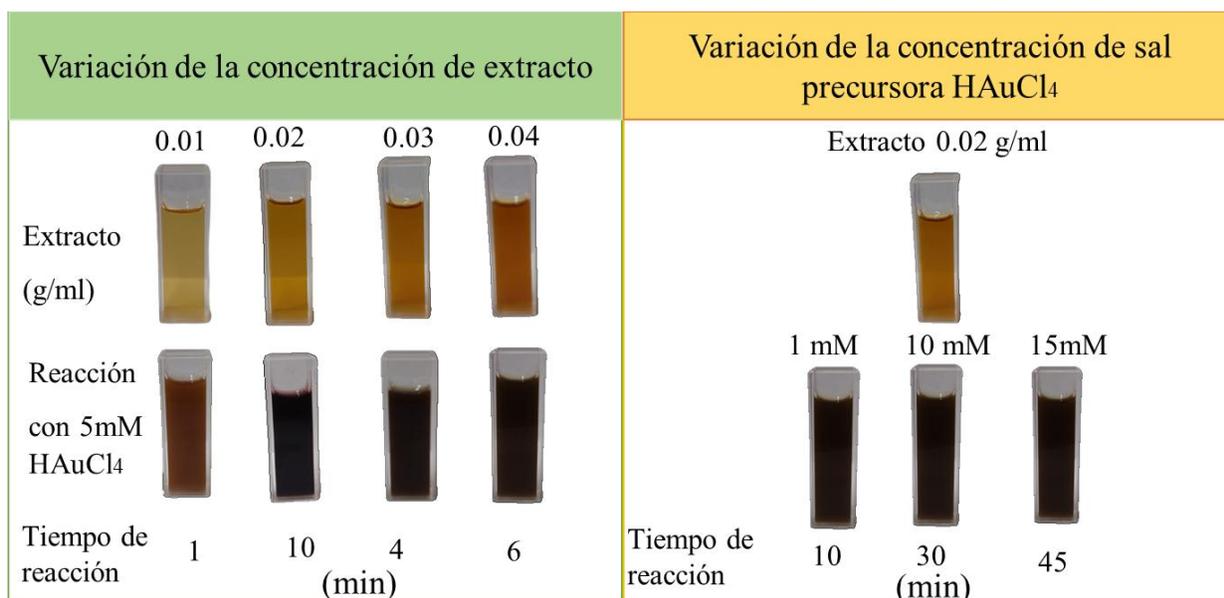


Figura 12. Evaluación del tiempo de reacción modificando las concentraciones del extracto de *Satureja macrostema* y la concentración del precursor de oro en la síntesis de nanopartículas.

Se continuó con la caracterización óptica de las muestras, evaluando la absorbancia por espectroscopía de Uv-Vis (Fig. 13) en un rango de longitud de onda de 350 a 800 nm. En el panel de la figura 13a se muestran las bandas de absorción de la modificación de concentraciones del extracto manteniendo la sal precursora HAuCl_4 a 5 mM; se observó el plasmón de resonancia más estrecho y definido a la concentración de 0.02 g/ml del extracto, obteniendo el máximo del pico en 536 nm. Sin embargo, también se observó un pico con menor intensidad y con mayor amplitud en 566 nm a la concentración de 0.01 g/ml del extracto. Estos resultados indican que cuando aumenta la concentración del extracto se intensifica el pico SPR hasta 0.02 g/ml, después de esta concentración el pico de plasmón desaparece, siendo atribuido a la formación de agregados de las AuNps. Esto quiere decir que a medida que aumenta la concentración del extracto aumentan los agentes reductores, aunque, proporcionalmente no aumentan los agentes estabilizantes, lo que favorece la formación de agregados como las flores, cuyo tamaño sale de la escala nanométrica. Cuando se modificó la molaridad del precursor de oro y se mantuvieron 0.02 g/ml del extracto de *S. macrostema* (Fig. 13b), se observó que a 1 mM no se obtuvo el plasmón, mientras que en la condición de 10 mM se obtuvo un pico a los 546 nm; sin embargo, comparando con la condición de 2 g de extracto y 5 mM de la sal precursora, la amplitud del pico está definida a 536 nm, con estos resultados se puede concluir que la condición ideal para la síntesis de AuNps fue utilizando 0.02 g/ml del extracto de *S. macrostema* y 5 mM de HAuCl_4 . A partir de estos resultados los experimentos posteriores se analizaron utilizando estas condiciones.

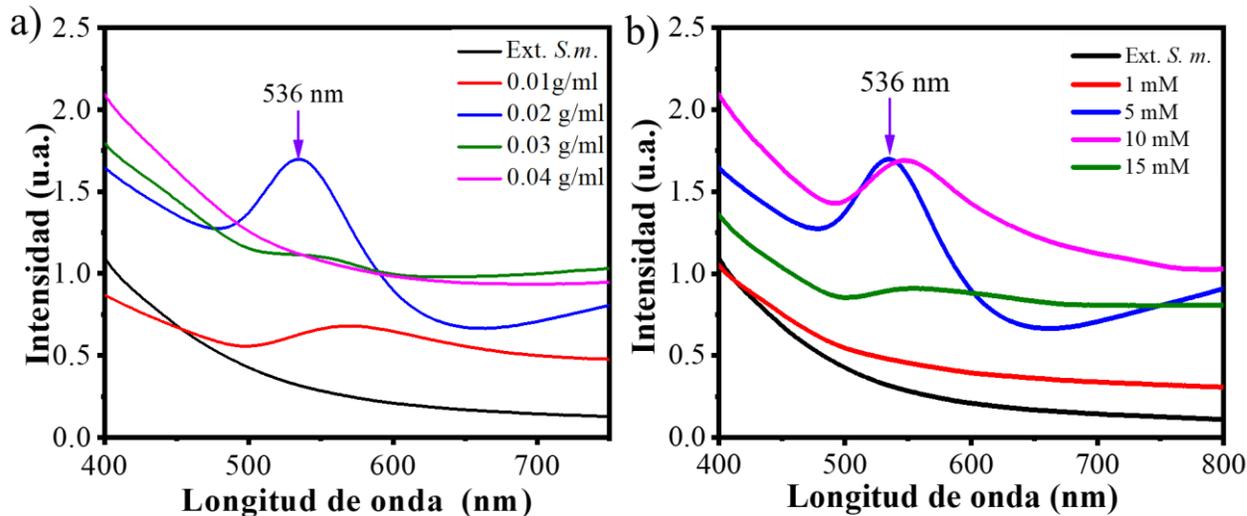


Figura 13. Espectroscopía de Uv-Vis de nanopartículas de oro obtenida de la síntesis con el extracto de la planta *Satureja macrostema*. a) Modificación de concentraciones del extracto manteniendo la sal precursora HAuCl_4 a 5 mM; b) Modificación de la concentración de sal precursora y con 0.02 g/ml del extracto.

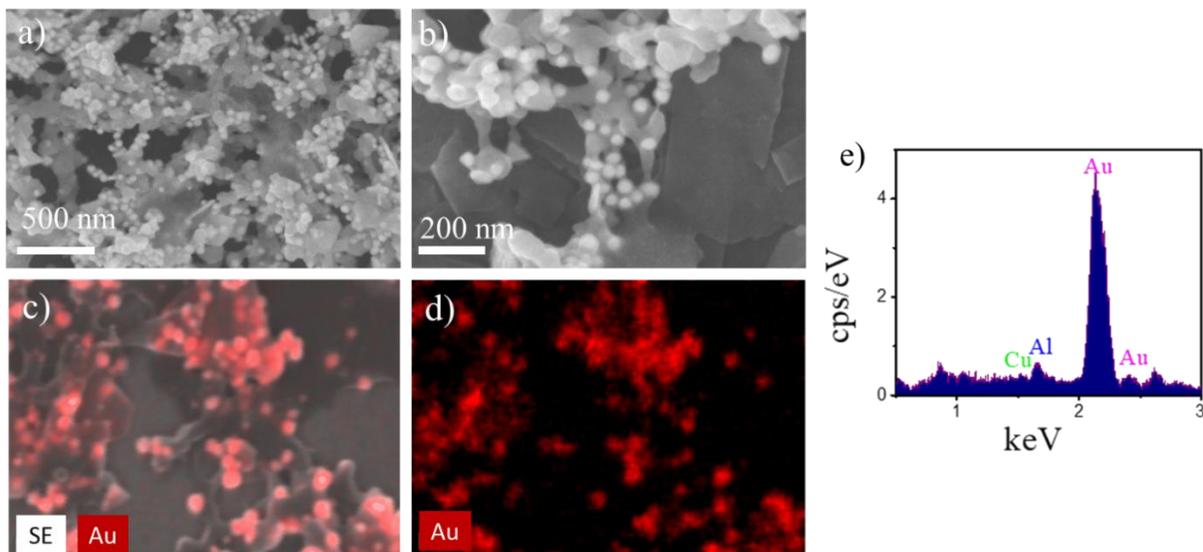


Figura 14. Micrografías de SEM de AuNPs sintetizadas con el extracto acuoso de hojas frescas de *S. macrostema*. a) Micrografía de SEM x100, b) micrografía de SEM x200, c-d) Mapeo químico elemental, e) Energía dispersiva de rayos X.

La figura 14a muestra una micrografía de SEM a baja magnificación, donde se tiene una dispersión uniforme y una alta confluencia de partículas. En la figura 14b se observan las AuNps con una morfología variada, aspecto esperado en las síntesis con extractos de plantas encontrándose algunas semiesféricas, triángulos y rodillos, cuyo tamaño es inferior a 45 nm [71,96]. De igual manera, se observan las AuNPs recubiertas por el extracto que estabiliza a las partículas evitando aglomeraciones entre ellas. Se realizó un mapeo químico elemental y un espectrograma de EDS (Fig. 14 c-e) demostrando la energía de emisión secundaria del Au, lo que confirma la presencia de Au sólido.

En la figura 15a se evaluó la estructura cristalina de las AuNps, a partir de los ángulos de difracción del patrón XRD obtenidos a 38.1, 44.2, 64.7 y 77.6° los cuales corresponden a los planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) del Au (JCPDF 66-0091), respectivamente. El valor del parámetro de red estimado fue de $a=4.071$ nm. El tamaño del cristalito se calculó mediante la ecuación de Scherrer y la reflexión (111), siendo el pico de difracción con mayor intensidad, obteniendo un valor de 9 nm. Esto indica que las AuNPs están compuestas por pequeños cristalitos, lo que concuerda con el trabajo que usa el extracto de hojas de *Clerodendrum inerme* [97], la cual pertenece a la familia Lamiaceae donde no se observaron impurezas en DRX y se obtuvo la misma fase cúbica.

Los resultados de FTIR mostraron bandas de absorción del extracto de *S. macrostema* y las AuNPs representados en la figura 15b. El espectro de absorción del extracto muestra bandas de los grupos funcionales: C=C ($1520-1590\text{ cm}^{-1}$), C-H ($2750-2860\text{ cm}^{-1}$), O-H ($3310-3390\text{ cm}^{-1}$), C=O ($1690-$

1740 cm^{-1}) y componentes aromáticos (675-815 cm^{-1}). Se observa que el espectro de las AuNps fue muy similar al anterior, lo que indica que muchos de los grupos funcionales orgánicos del extracto se mantienen en la superficie de las AuNps, lo cual había sido observado anteriormente en SEM (Fig 14a). Además, previamente se ha reportado que el extracto de esta planta contiene linalol, pulegona y mentona cuya capacidad antioxidante es alta, respecto a los demás componentes. Además, según lo reportado [99] el extracto contiene timol, cuya capacidad antioxidante también es alta con respecto a los demás componentes. Por lo que se puede sugerir, que el grupo hidroxilo está contribuyendo principalmente en la reducción del Au^{3+} en Au^0 . El mecanismo propuesto de la reducción puede ser el expresado en la ecuación 1.

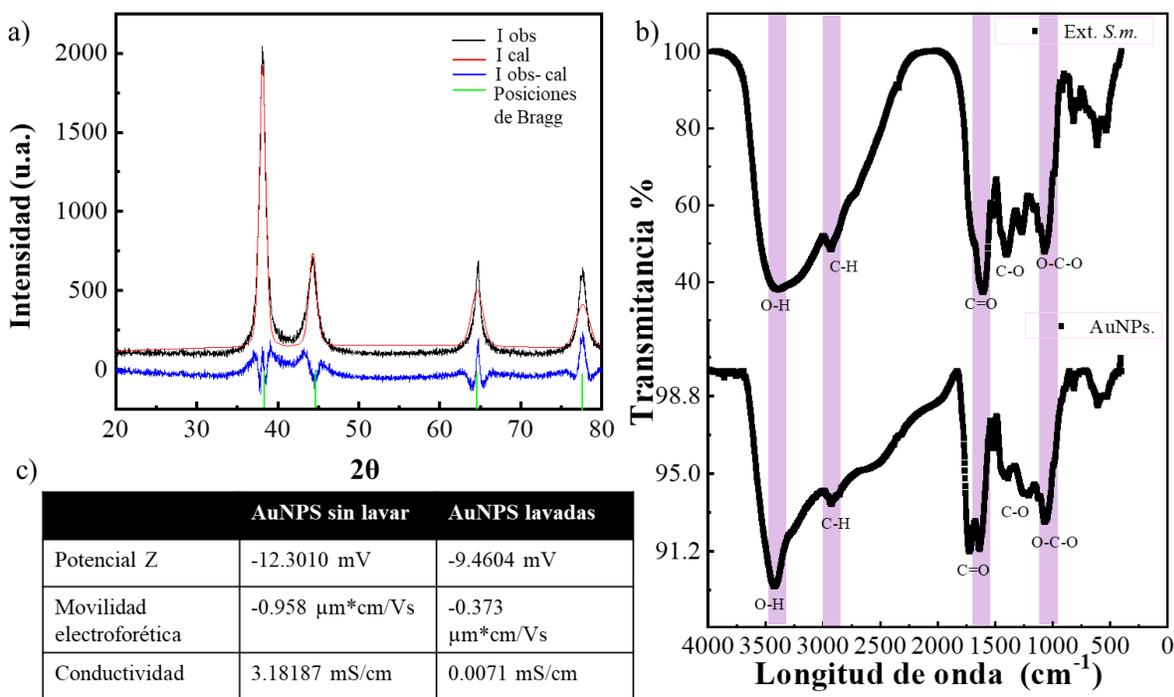
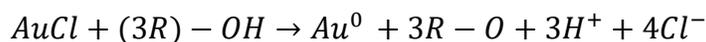


Figura 15. Caracterización de las AuNPs. a) Patrón de DRX, b) Espectro de FTIR; en la parte superior el extracto acuoso de *Satureja macrostema*, en la parte inferior las AuNPs y, c) tabla de valores de potencial Z, movilidad electroforética y conductividad.

Se obtuvo un valor de potencial Z de -12.30 mV (movilidad -0.958 $\mu\text{m}^*\text{cm}/\text{Vs}$, conductibilidad 3.81 mS/cm) (Fig. 15c). El valor del potencial Z sugiere que las AuNPs tiene una carga eléctrica a lo largo de la superficie y la fuerza de repulsión de los ensambles favorecen la formación y estabilización. Con FTIR y potencial Z, se concluye que las AuNPs interactúan directamente con las moléculas del extracto generando partículas estables.

Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvo más información sobre la morfología y el tamaño de las AuNps (Fig. 16). Similarmente, se observaron nanopartículas semiesféricas, triangulares y rodillos de donde se contabilizaron las morfologías esféricas, cuyo tamaño promedio aproximado fue de 20 nm, algunas de ellas presentan una estructura MTP (multiple twining particles) es decir, son policristalinas (Fig. 16b). Mediante la adquisición del patrón de la trasformada rápida de Fourier (FTT) se obtuvo una distancia interplanar de 0.23 nm que pertenece al plano (111) de su estructura cúbica (Fig. 16c). Finalmente, la figura 16d muestra el patrón de difracción de electrones de área selecta policristalino. Como se observa en la secuencia de los índices de Miller estos corresponden nuevamente a la estructura FCC del Au, lo que concuerda con lo observado mediante SEM y DRX.

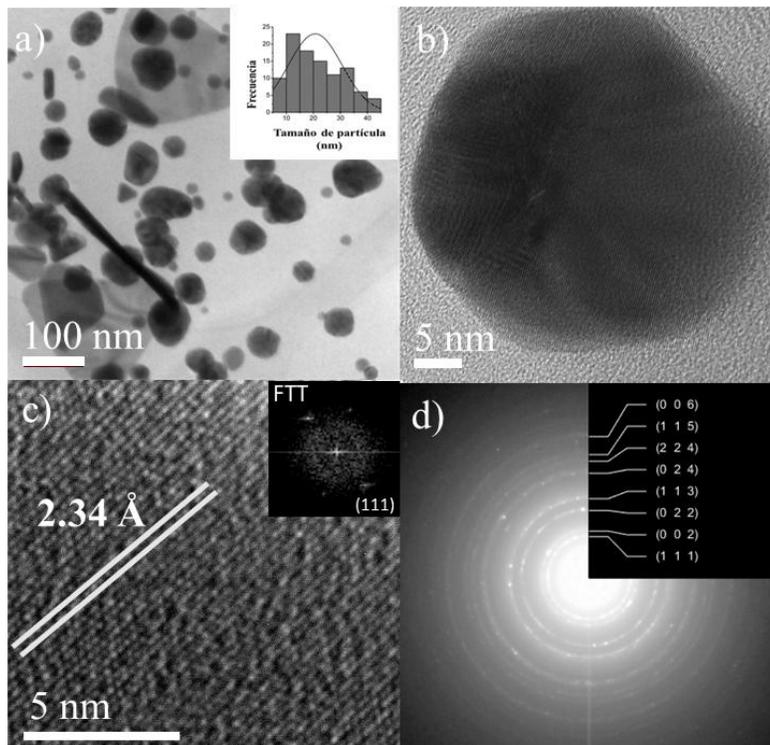


Figura 16. Micrografías obtenidas por TEM de las AuNPs. a) Micrografía de campo claro (en el inserto histograma de tamaños), b) alta amplificación de una partícula, c) HRMET y su correspondiente patrón FTT, d) patrón de difracción de electrones.

Se realizó el análisis termográfico de las AuNps, donde la temperatura se incrementó 14 °C de 0 a 3 minutos (Fig. 17), se excitó la muestra con un láser a 808 nm que se encuentra en el infrarrojo cercano, esta longitud de onda del láser se ha reportado que puede penetrar rápidamente la piel y los tejidos sin llegar a causar daño irreversible en las células, por la poca energía que se deposita en ellas [100], y al conjugar las Nps con fármacos, se pueden excitar las partículas generando radiación térmica dando pie a posibles aplicaciones teragnósticas [101]. El incremento de la

temperatura en las AuNps está estrechamente relacionado con el tamaño y la concentración [102]. Esta prueba se realizó sin lavado previo, por lo que había restos orgánicos que impiden la detección de calor por parte de las partículas de oro; sin embargo, podría ser un material que se aplique en la hipertermia, una vez que se retiren los restos del extracto.

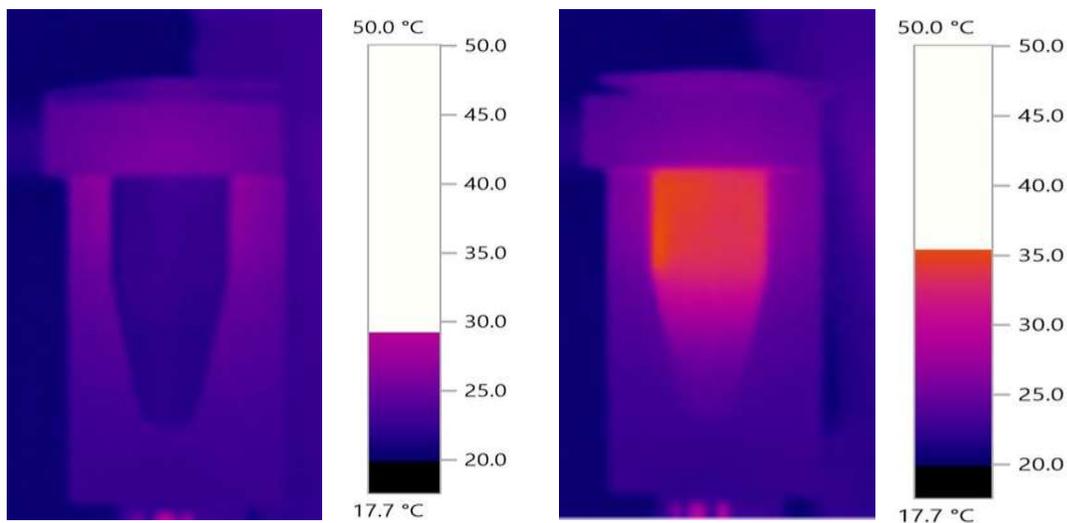


Figura 17. Análisis Termográfico de las AuNPs.

En la figura 18 se muestra la evaluación de la fotoluminiscencia de las AuNps excitándolas con una radiación a 250 nm. Se observa que hay dos picos de emisión, uno en 328 nm y otro en 432 nm. Se han reportado picos de AuNps entre 410 nm, con un tamaño de partícula esférica de 8-10 nm [98]. Del mismo modo, se muestran doubles picos en los casos de la presencia de otras morfologías de oro como rodillos o alambres, lo que reafirma que los valores de emisión aquí obtenidos corresponden principalmente a partículas semi esféricas. Por otro lado, el corrimiento del pico obtenido puede ser atribuido a la distribución de diferentes tamaños, lo que se observó por medio de SEM y TEM, discutido con anterioridad, mientras que el pico a 328 nm puede ser atribuido a los restos orgánicos del extracto, por lo que para obtener un pico más estrecho es necesario homogenizar el tamaño de las AuNps y eliminar los residuos orgánicos del extracto.

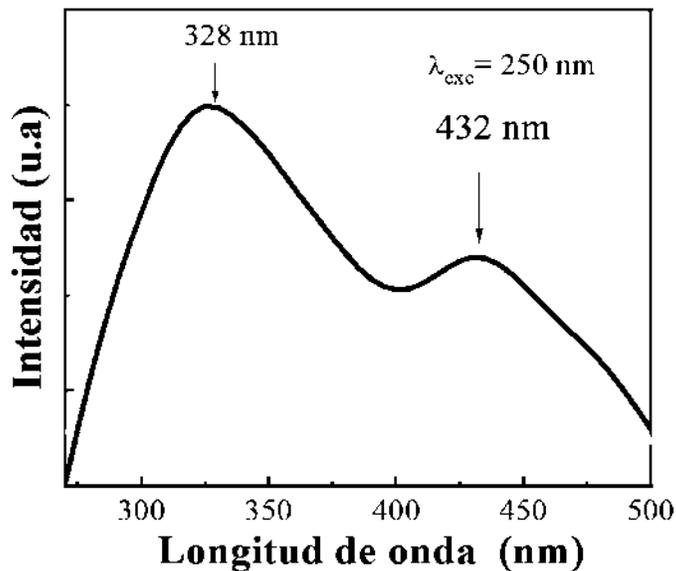


Figura 18. Fotoluminiscencia de AuNPs.

4.1.1 Obtención de micrografías de SEM de células de cáncer MCF-7 con AuNPs

En la figura 19 se presentan micrografías de SEM de las células MCF-7 registradas mediante la técnica low angle backscattered electrons (LAFE). Se observa en la primera micrografía a 500 X ampliaciones de las células confluentes, con una morfología alargada, núcleos grandes, con la membrana conservada y sin estallamientos por el vacío provocado por el SEM, observándose de manera similar a aquellas mostradas por microscopía óptica (Fig. 19 b y d). Como control de muerte se empleó actinomicina, fármaco que interactúa y se intercala entre las dos cadenas del ADN, impidiendo así, la replicación correcta y alterando la síntesis del ARN para inducir apoptosis, por la cual la morfología celular cambia al morir a una forma redondeada y al ser células adherentes, se van despegando, dejando huecos entre ellas (Fig. 19 c y d). Las células adherentes tienen polaridad por lo que para simular esto *in vitro* es necesario imitar y mimetizar la función de la matriz extracelular para lo que se coloca colágena de cola de rata. En La figura 19e, muestra las células MCF7 sin tratar los vidrios con colágena, se puede apreciar la importancia de colocar esta matriz para evitar aglomeraciones y se pueda mantener la morfología celular adecuadamente.

En la figura 20 se observan micrografías de SEM de células MCF-7 con diferentes concentraciones de nanopartículas a baja magnificación (Fig. 20a). Se puede apreciar la internalización de las AuNps. A mayores ampliaciones se observan morfologías esféricas y triangulares, características de AuNPs sintetizadas por métodos verdes (Fig. 20c, f, i o). De igual manera que en los controles sin tratamiento, se observaron células con núcleos grandes y morfología alargada lo que es característico de estas células. Se observó que en general las AuNps se acumulan en un sitio específico del núcleo, esto había sido previamente reportado usando el mismo tipo celular analizado por microscopía confocal, donde observaron la acumulación de las AuNPs en el núcleo y el nucleolo, lo que podría estar hablando de una afinidad a ciertas moléculas presentes en el núcleo celular [103], lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Otra de las ventajas de este método, es que no se requiere de un recubrimiento metálico que pudiera interferir con la interpretación de la muestra.

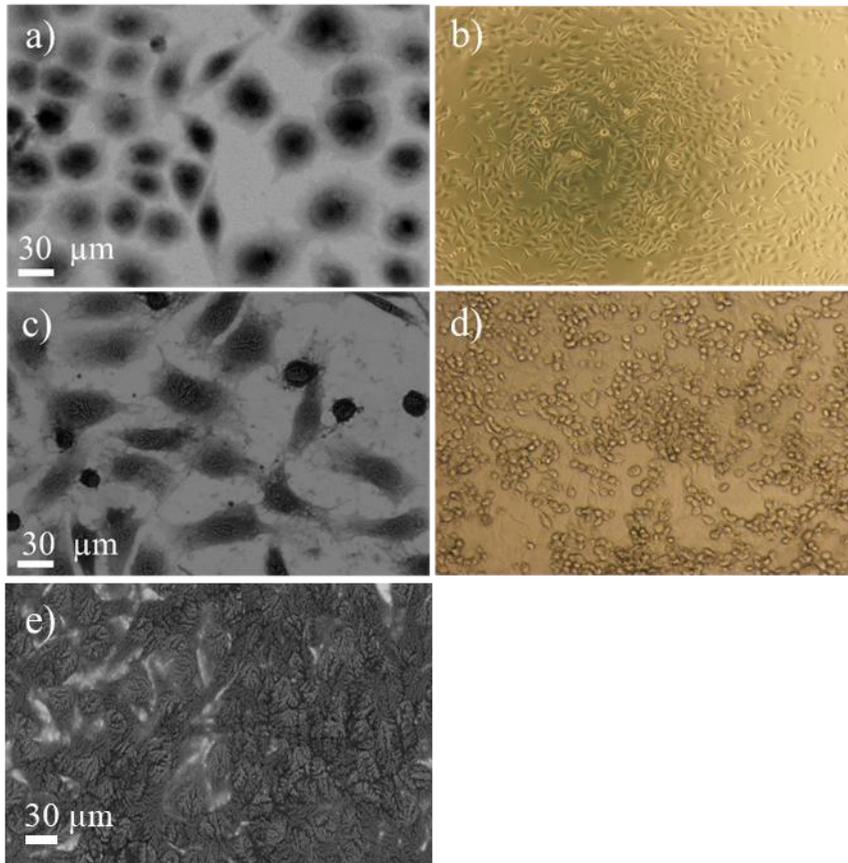


Figura 19. Micrografías representativas de células MCF-7. a) Micrografía de SEM y b) imagen de microscopio óptico de células MCF-7 sin tratamientos, c) micrografía de SEM y d) imagen de microscopio óptico de células MCF-7 con actinomicina, e) micrografía de SEM de células MCF-7 sin colágena de cola de rata.

En las micrografías de la Figura 20 a-e, se observan variaciones en las nanopartículas internalizadas en las células MCF-7 de una manera dependiente de la concentración de AuNPs. Las AuNPs pueden diferenciarse con un alto contraste, se observa la distribución de las nanopartículas, los cristales de PBS y la morfología celular. Además, la fijación con paraformaldehído evitó la contaminación del microscopio y el estallamiento de las células por el vacío. Así mismo, el secado de la muestra evita el desenfoque de la imagen. En comparación con otros estudios este método elimina el uso de tetra óxido de osmio [104], incrustar las muestras en resinas epóxicas [105], cubiertas metálicas o vidrios recubiertos con Au o Cr [106,107] y métodos de fijación por punto crítico [108], lo que resulta en una técnica más sencilla para la observación de células por microscopía electrónica de barrido.

La técnica también se realizó utilizando células B16-F0 (melanoma murino). Los resultados fueron similares a los observados con las células MCF-7 porque fue posible diferenciar las AuNps internalizadas y no, lo que demuestra que el método podría utilizarse con otros tipos de células (Fig. 21). Las células B16-F0 son células más grandes con un citoplasma más irregular en comparación con las células MCF-7.

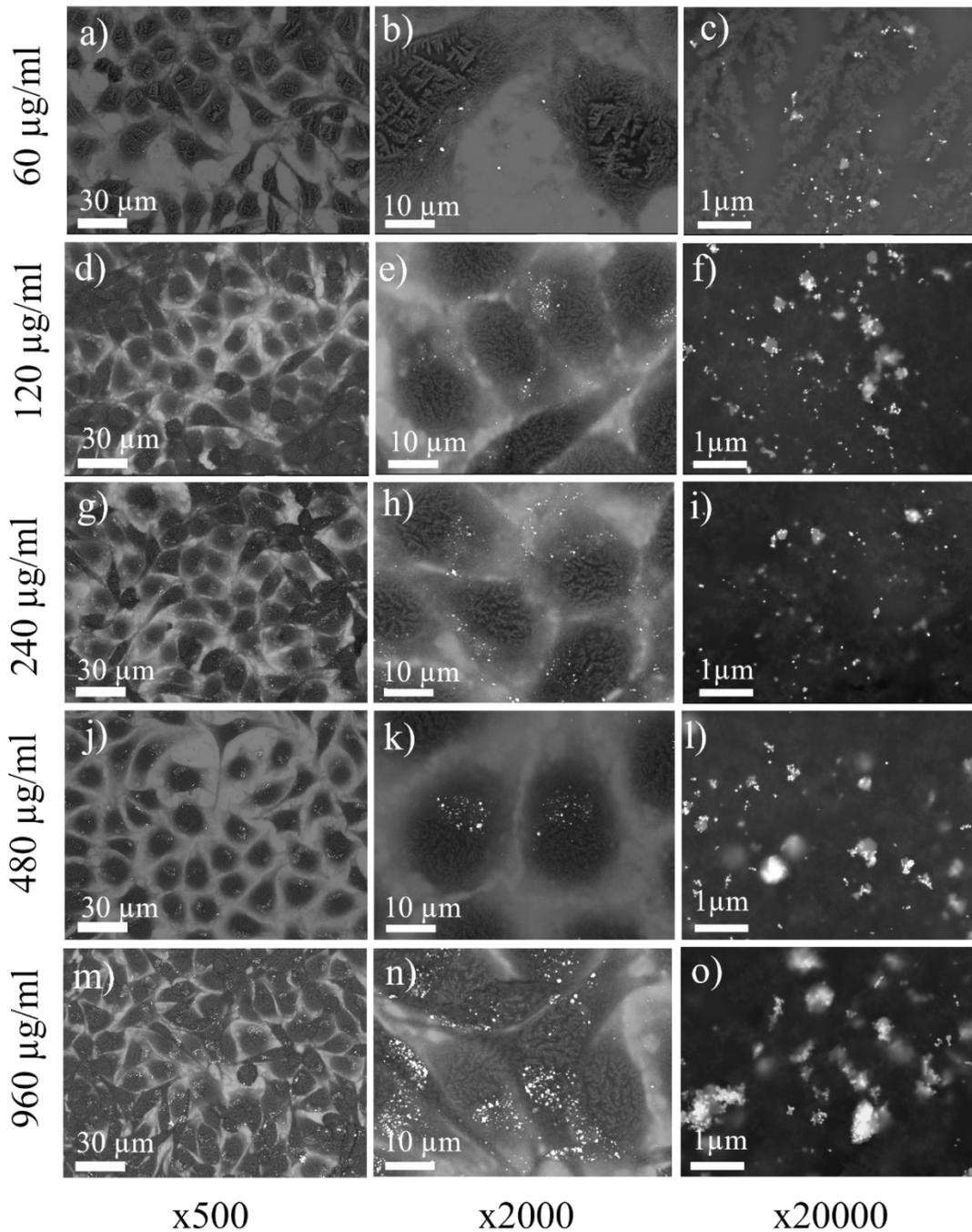


Figura 20. Micrografías de SEM de Células MCF-7 con AuNPs. Células MCF-7 a-c) 60 µg/ml de AuNps, d-f) 120 µg/ml de AuNps, g-i) 240 µg/ml de AuNPs, j-l)480 µg/ml de AuNPs, m-o) 960 µg/ml de AuNPs.

Además, se observó que en este método de fijación es recomendable tener células con una confluencia superior al 80% para evitar la formación de grandes cristales de PBS; sin embargo, la formación de estos cristales no interfiere con el contraste de los AuNPs en las células (Fig. 21 c-

f). En particular, la distribución de AuNPs en las células B16-F0 se observó en el citoplasma, y muchas de ellas no lograron internalizarse, a diferencia de las células MCF-7, que se apreciaron principalmente en el núcleo. Esto es importante porque muestra la interacción de AuNPs en diferentes tipos celulares para posibles aplicaciones teragnósticas o de bioimagen. Además, la técnica de fijación permite observar la morfología de las bacterias y los flagelos bajo el microscopio (Fig. 22). Todos estos resultados demuestran la eficacia de este método de fijación y observación de células mediante SEM, con una preparación sencilla y un costo menor en comparación con los más utilizados.

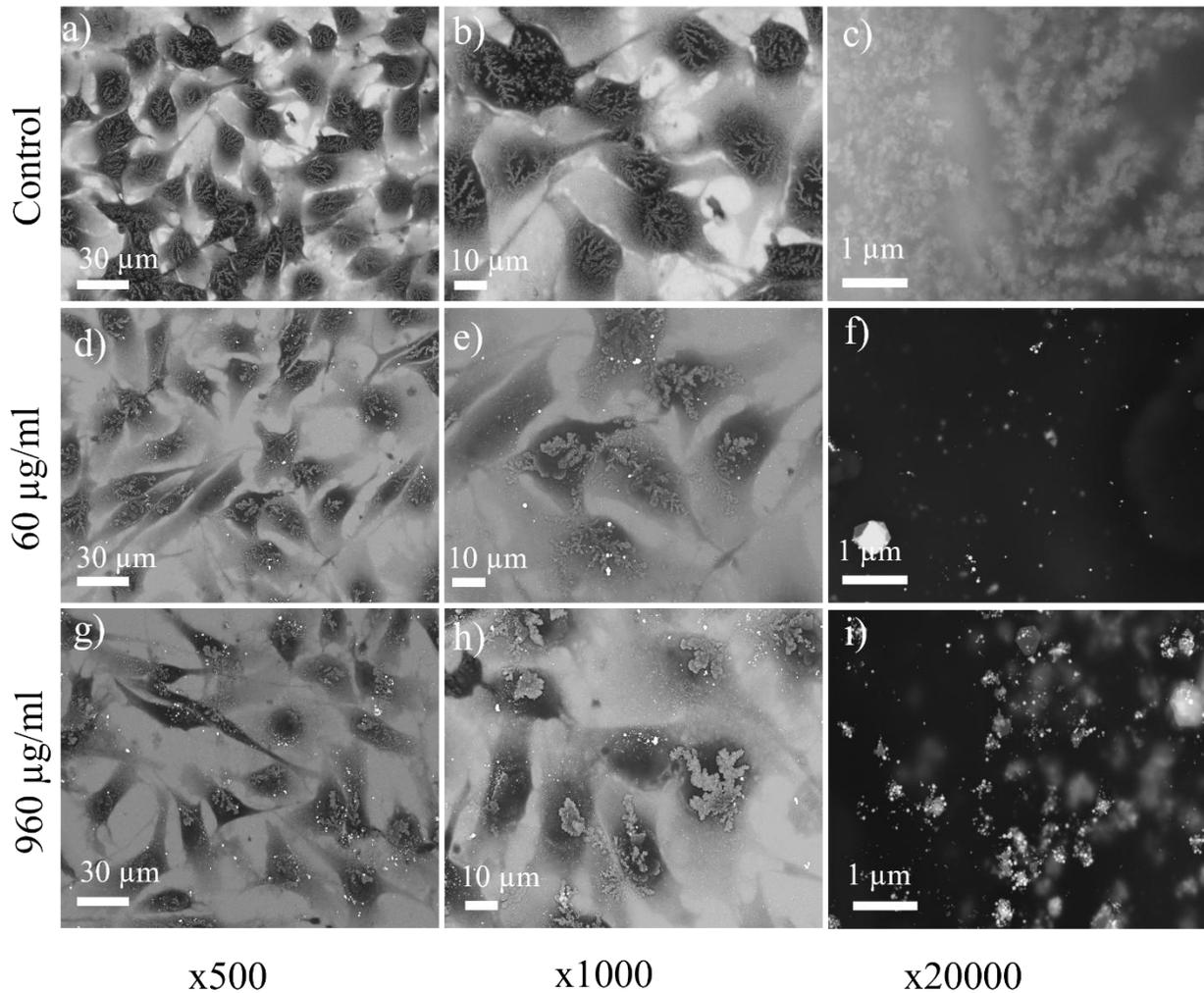


Figura 21. Micrografías de SEM de células B16-F0 con AuNPs. Células B16-F0 a-c) sin AuNPs, d-f) 60 µg/ml de AuNPs y g-i) 960 µg/ml de AuNPs.

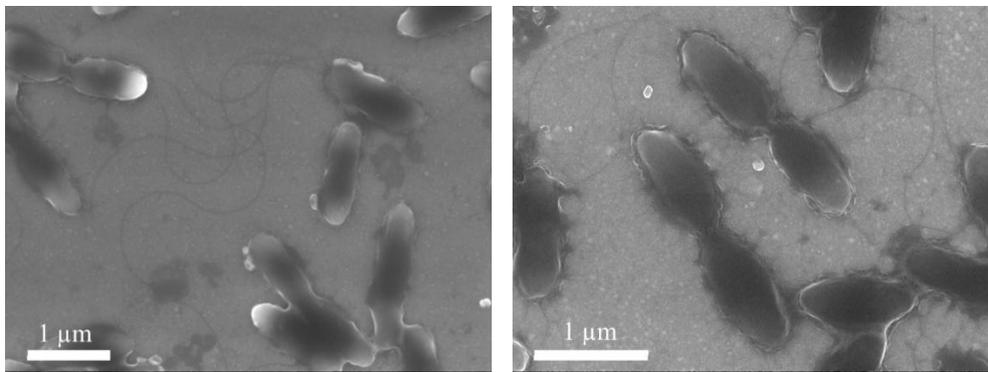


Figura 22. Micrografías de SEM de bacterias bacilares.

4.1.2 Funcionalización de las AuNPs con quimioterapéuticos y su evaluación en células MCF-7

La quimioterapia es uno de los tratamientos más empleados para el manejo del cáncer; sin embargo, la resistencia a estos medicamentos por parte de las células cancerosas ha orillado a emplear esquemas de tratamientos combinados de quimioterapéuticos, no obstante, los efectos secundarios también se vuelven más agresivos. Es así, que los nuevos enfoques como el uso de las AuNPs funcionalizadas con diversos tipos quimioterapéuticos para potencializar sus efectos citotóxicos a menores concentraciones de fármaco, resultan un área interesante para su estudio.

En la figura 23 se muestran los resultados de la viabilidad y la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 tratadas con AuNPs sintetizadas con *S. macrostema* y funcionalizadas con doxorubicina, cisplatino y la combinación de los fármacos a una concentración de 20 mM respectivamente. Los experimentos se realizaron por ensayos de exclusión por azul tripano y se empleó como control de muerte actinomicina D. En la figura 23a se observó que ningún tratamiento muestra diferencias significativas en la viabilidad de las células MCF-7, sin embargo, la proliferación celular se ve ligeramente afectada cuando las nanopartículas se funcionalizaron con doxorubicina y la combinación de doxorubicina-cisplatino (Fig.23b). Cuando las células son tratadas con cisplatino la proliferación celular no se ve afectada, pero al tratarlas con AuNPs-cisplatino disminuyen un 52% su proliferación en comparación a las células sin tratamiento. El cisplatino es un quimioterapéutico que entra a las células a través de un sistema de transportación transmembranal, una vez dentro de la célula ejerce su citotoxicidad mediante interacción con el ADN y la formación de aductos en el ADN, lo que provoca que el ciclo celular se detenga en las fases S, G1 o G2-M, induciendo así la apoptosis [109]. Sin embargo, las células cancerosas han desarrollado mecanismos de resistencia a los quimioterapéuticos como disminución del ingreso del fármaco, un incremento de la excreción del fármaco, inactivación del fármaco o un incremento de la reparación del ADN [110]. En los resultados obtenidos (Fig. 23) se observa la resistencia de las células MCF-7 al cisplatino, pero con las AuNPs funcionalizadas, las células se sensibilizan al fármaco, estos resultados son similares a lo reportado en un modelo de cáncer colorrectal donde las AuNPs mejoraron la administración de cisplatino y oxígeno a los tumores, lo que redujo la hipoxia y sensibilizó la quimioterapia, sin encontrar daños por la combinación de las AuNPs y el

cisplatino [111]. Por lo que estos resultados sugieren que es posible funcionalizar AuNPs sintetizadas por métodos verdes con cisplatino y mejorar la administración del fármaco en células resistentes MCF-7.

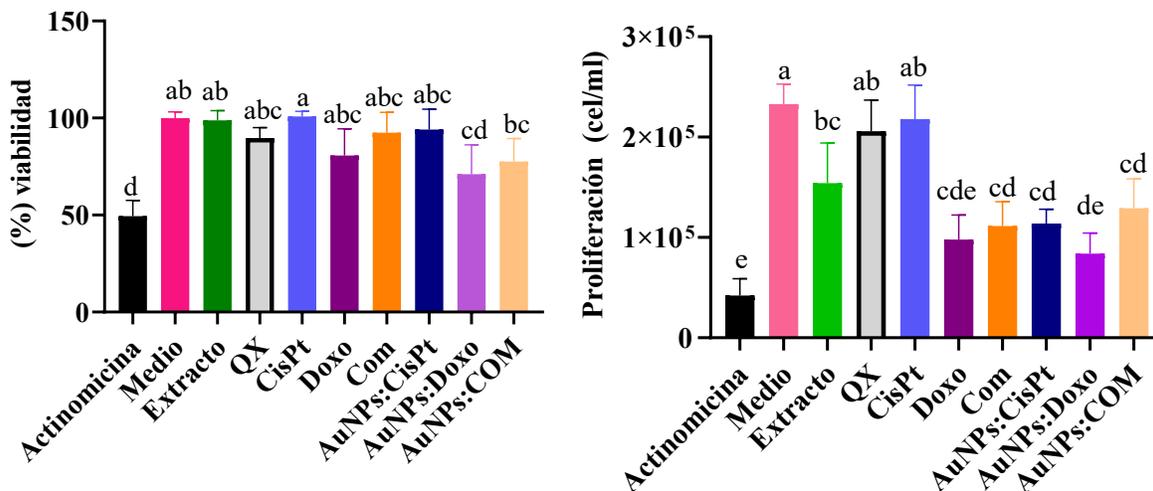


Figura 23. Efecto de las AuNPs funcionalizadas con quimioterapéuticos sobre la viabilidad y la proliferación de las células MCF-7. a) Viabilidad; b) Proliferación. Los datos se obtuvieron mediante ensayos de exclusión con azul tripano. Los valores se representan como la media \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). $n=6$.

4.2 Síntesis y caracterización de nanoflores de Au con extracto de *Satureja macrostema*

Se caracterizaron las nanoflores (AuNFs) sintetizadas con el extracto acuso de *S. macrostema* lavadas y re dispersadas en isopropanol. La figura 24a muestra a baja magnificación una dispersión uniforme y una densa cantidad de AuNFs sintetizadas por un método eco amigable. En la figura 24b se observan las AuNFs ensambladas con finos platos triangulares agrupados formando los pétalos de las flores. La figura 24c muestra una imagen a mayor magnificación en donde se logra ver en detalle los ensambles formados por bloques individuales, casi triangulares, cuyo tamaño es de aproximadamente 730 nm. Además, se observa que los triángulos que conforman el ensamble laminar, tienen un largo de 150 nm y un espesor de 10 nm. Se evaluó el tamaño de las AuNFs por dispersión dinámica de la luz (DLS), empleando un ángulo de medición de 175°. La figura 24d muestra el gráfico que indica la distribución de tamaño, en donde se obtuvo un tamaño promedio de 783 \pm 7 nm muy aproximado al medido directamente en las imágenes de SEM (Fig. 24c). Otros autores han sintetizado nanoflores de Au empleando métodos verdes en donde han obtenido tamaños inferiores en un rango de 9 - 130 nm [112,113]. Considerando esa morfología en forma de nanoplatos apilados, conteniendo una gran área superficial, este resultado puede ser prometedor para aplicaciones en electroquímica [114].

En la figura 25a - b se observa la composición química elemental de las nanoestructuras obtenidas mediante un mapeo químico que muestra la distribución espacial uniforme del Au en toda la nanoestructura. En el espectrograma EDS aparecen principalmente las energías de emisión secundarias del Au, lo que confirma la composición química de las nanoestructuras obtenidas mediante el extracto de *S. macrostema* (Fig. 25c).

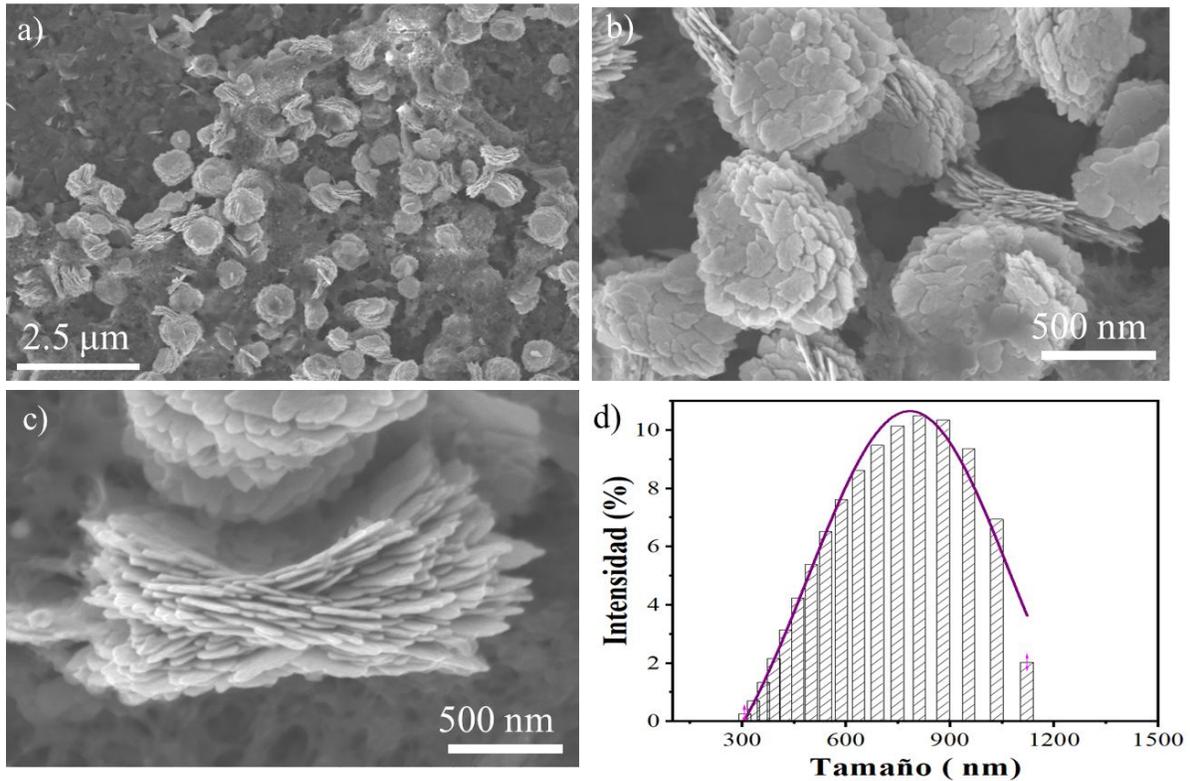


Figura 24. Micrografías de SEM de AuNFs sintetizadas con el extracto acuoso de hojas secas de *Satureja macrostema*. a) Micrografía de SEM x100, b) micrografía de SEM x200, c) micrografía de SEM x200 espesor de ensamble, d) histograma de tamaño por DLS.

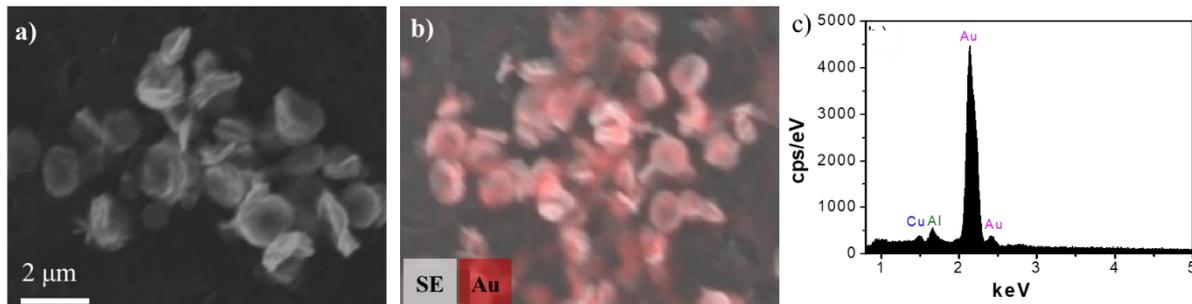


Figura 25. Caracterización química elemental de las AuNFs. a-b) mapeo químico elemental, c) energía dispersiva de rayos X.

Durante la reacción de reducción del AuHCl_4 se observó un cambio de coloración de marrón claro a café oscuro. Este cambio en la coloración fue evaluado mediante espectroscopía de UV-Vis. El espectro de absorción muestra la banda típica de resonancia del plasmón superficial (SPR) de Au alargada con máxima elevación a los 540 nm (Fig. 26a), la cual confirma la formación de ensamblajes nanométricos de oro. Esta banda ensanchada suele observarse en nanoestructuras ramificadas por el diferente grado de confinamiento, como las nanoflores [115,116]. Estos resultados confirman la formación de nanoestructuras de oro a través de la reducción mediante uso de la planta *S. macrostema*.

La estructura y la cristalinidad de las AuNFs fue estudiada mediante DRX (Fig. 26b). Se observaron 4 picos en 38.4, 44.6, 64.9 y 77.9 ° pertenecientes a los planos (111), (200), (220) y (311), respectivamente. Lo que confirma una estructura cúbica FCC típica del Au de acuerdo a la tarjeta No. 00-004-0784 (ICDD). De la medición del FWHM (111) y la ecuación de Debye-Scherrer se calculó el tamaño de cristal siendo de 9.3 nm, lo que confirma la cristalinidad nanométrica. Mediante estos datos se puede indagar que la orientación preferencial de crecimiento de las flores es en el plano (220) debido a que los cristales son más grandes en esa dirección. Las imágenes de TEM de una de las AuNFs se presentan en la figura 26c-d. Se muestran los ensamblajes con su tendencia a la formación de platos facetados con terminaciones curvilíneas, que indican un crecimiento anisotrópico, que puede ser atribuido a la concentración de los agentes estabilizantes del extracto que dan orientación cristalográfica al ensamblaje de las AuNFs. La figura 26c-d muestra una micrografía de HRTEM y su correspondiente FFT, la cual muestra una distancia interplanar de 2.35 Å, 2.46 Å pertenecientes al {111} y 1.43 Å pertenecientes al {220} a la familia de planos de la red FCC del Au. Por esta misma técnica se ha reportado previamente en autoensamblados dendríticos tipo flor el crecimiento influenciado en los planos (111) influenciados por los surfactantes del extracto de *Taraxacum officinale* [10]. Con esto queda evidenciado el crecimiento cristalográfico preferencial de los nano platos que finalmente forman los ensamblajes con estructura de flores.

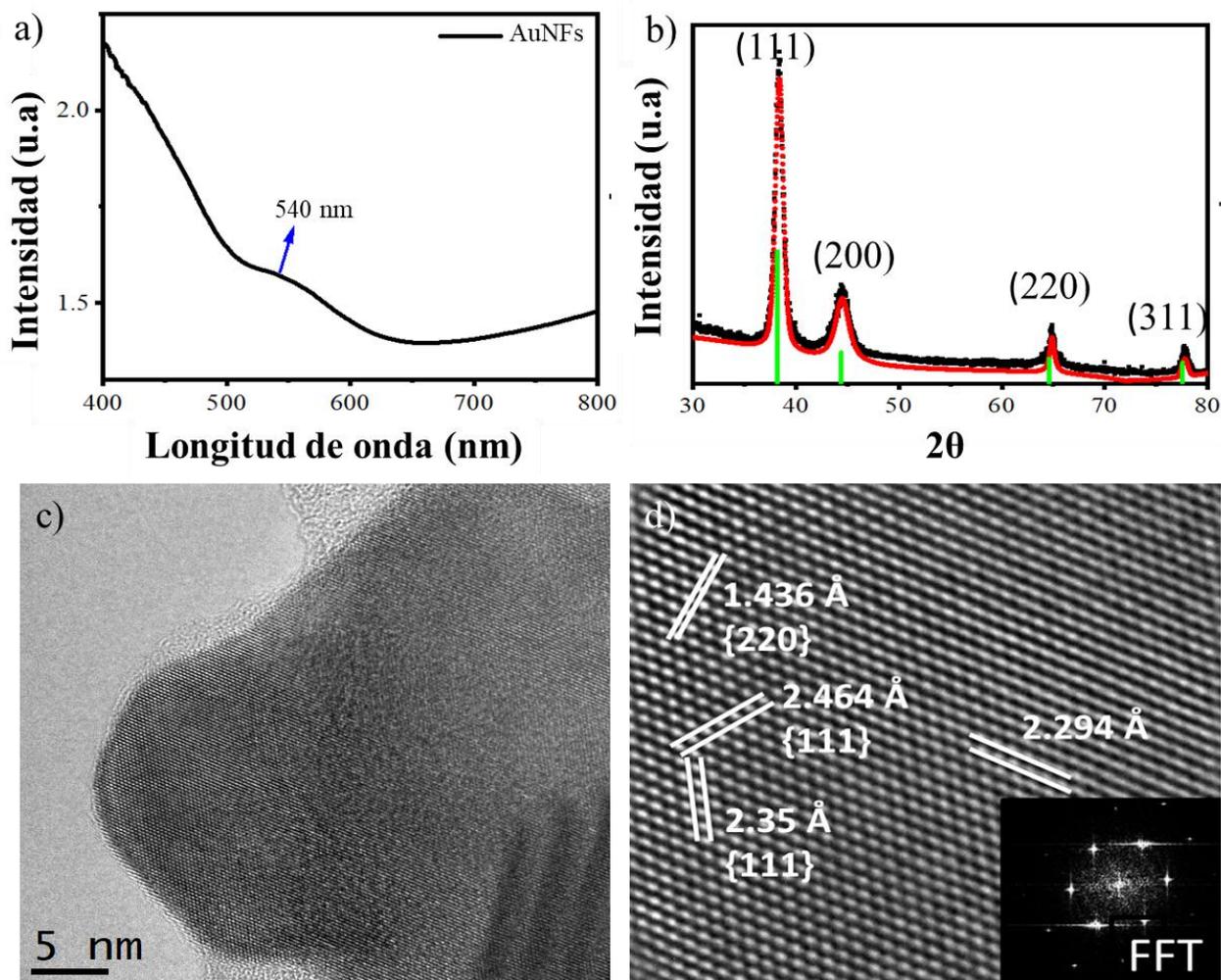


Figura 26. Caracterización estructural de AuNFs sintetizadas con el extracto de *Satureja macrostema*. a) Espectro de UV-Vis b) difractograma de rayos X; c) y d) micrografía de HR-MET y patrón FTT.

El FTIR fue realizado con el extracto acuoso de *S. macrostema* y AuNFs. Los espectros FTIR del extracto mostraron varios picos de absorción IR, en los números de onda 3382 cm^{-1} , 2893 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} , y 1036 cm^{-1} en las regiones aromática y dactilar de la banda IR. El pico ancho a 3382 cm^{-1} se obtiene de los grupos -OH, en 2893 grupos C-H, mientras que los picos a 1590 cm^{-1} y 1036 cm^{-1} se producen debido a la presencia de vibraciones de estiramiento C=O (grupos carbonilo) y C-O de alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres o éteres de biomoléculas presentes en el extracto de *S. macrostema* (Fig. 27a). Cuando el extracto reduce y estabiliza al Au se observó un pequeño desplazamiento al rojo para los picos anteriormente mencionados a 3414 cm^{-1} , 2909 cm^{-1} , 1606 cm^{-1} , 1052 cm^{-1} , en los espectros FTIR de las AuNFs sintetizadas (Fig. 27b) correspondientes a las frecuencias de estiramiento O-H, C-H, C=O y C-O de las biomoléculas del extracto.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos por GC-MS, identificándose en el extracto de *S. macrostema* la presencia de 6 compuestos fitoquímicos de la familia de los terpenos y mono terpenos. Se obtuvo de concentración mayor a menor pulegona, isopulegona, isomentona, mentona, 4- metil isopulegona y linalol. Comparando esto con el extracto con el cual se llevó a cabo la síntesis de las AuNFs se obtuvo una disminución de la concentración en todos los compuestos, y en el caso particular del 4 metil isopulegona no se detectó, estos compuestos obtenidos coinciden con los reportados en el aceite esencial de esta misma planta [50]. Con esto y con lo obtenido por FTIR se puede inferir que estas moléculas están participando directamente en la reducción del HAuCl_4 y al disminuir estos compuestos terpenicos permiten la aglomeración de los nanoplatos de Au, permitiendo así la formación de las AuNFs.

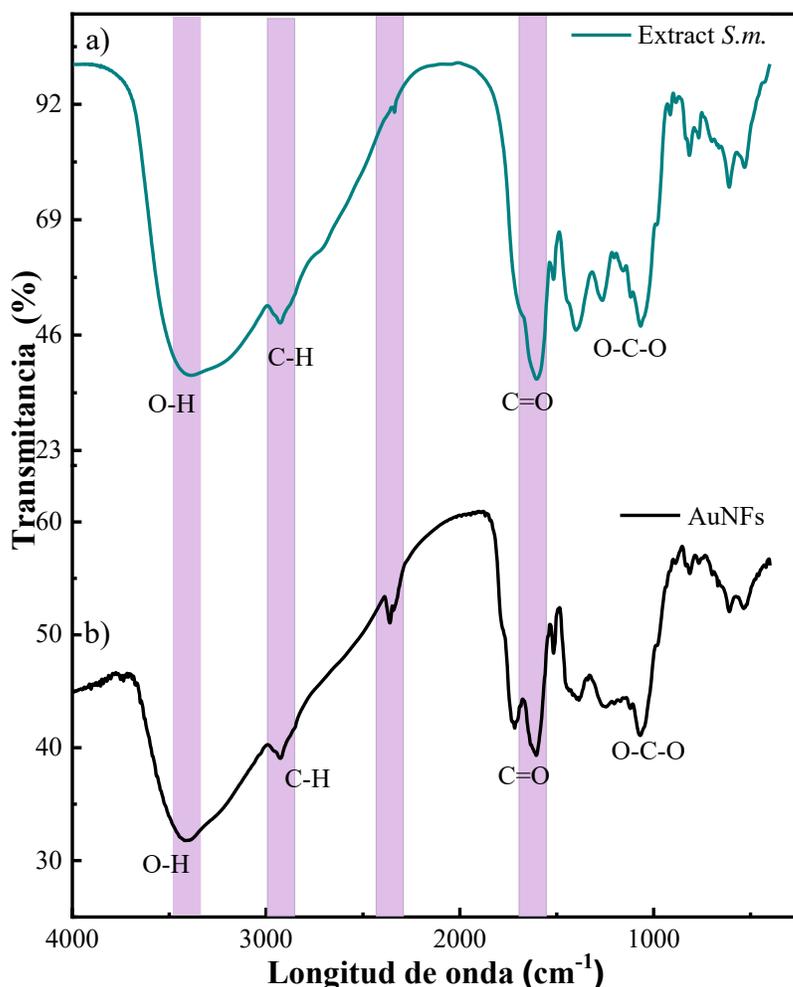


Figura 27. Espectro FT-IR. a) Extracto de *Satureja macrostema*, b) AuNFs sintetizadas con el extracto de *Satureja macrostema*.

Tabla 7. Principales compuestos identificados y cuantificados en el extracto acuoso de *Satureja macrostema* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Extracto S. m. $\mu\text{g/ml}$	Tiempo de retención (min)	Extracto S. m. + AuNFs $\mu\text{g/ml}$
Linalol	11.7039	9.187	11.7039	1.538
Mentona	13.383	12.086	13.3778	1.946
Isomentona	13.7043	15.064	13.7042	2.702
Pulegona	15.9586	27.324	15.9533	4.206
Isopulegona	16.4042	24.335	16.3938	4.082
4 metil isopulegona	19.5965	9.323	----	----

Referente a la medición del potencial Z, se obtuvo un valor de -14.54 mV (movilidad -1.124 $\mu\text{m}^*\text{cm/Vs}$, conductibilidad 4.15 mS/cm). Este valor del potencial Z sugiere que las AuNFs tienen una carga eléctrica a lo largo de la superficie y la fuerza de repulsión de los ensambles favorecen la formación y estabilización. Con FTIR y potencial Z, se concluye que los ensambles de oro interactúan directamente con las moléculas del extracto generando flores relativamente estables.

4.2.1 Evaluación de AuNFs en la valorización del glicerol

El biodiesel es una alternativa para producir energía alternativa a la energía fósil, el biodiesel se obtiene de aceites vegetales o residuos de grasas y como subproducto de esta reacción de combustión se obtiene el glicerol. Por lo cual es necesario el desarrollo de nuevas soluciones para la valorización del glicerol crudo. El glicerol es una molécula importante de biomasa, con la cual derivado de su oxidación se pueden obtener productos de valor añadido como el ácido glicérico, la dihidroxiacetona, el gliceraldehído, el ácido glicólico, el ácido oxálico, mesoxalato y el ácido fórmico. Estos productos se utilizan ampliamente en química fina, farmacia, recubrimientos y otros campos [16]. El oro es el metal más electronegativo tiene un potencial redox Au^+/Au^0 muy elevado de +1,691 V y puede existir en los estados de oxidación +1 y +3 por lo que presenta una especial afinidad por la oxidación de CO por lo que el oro es considerado un catalizador muy eficaz [117]. En recientes estudios se ha propuesto el uso de nanopartículas/nanoestructuras de oro para la electro-oxidación de glicerol. Zhang y col. reportaron un modelo de catálisis para evaluar la

electro-oxidación del glicerol soportando en carbón nanopartículas de Pt, Pd y Au en condiciones básicas (KOH); del mismo modo, recientemente se evaluó la electro-oxidación del glicerol con nanoestructuras de oro donde determinaron que la actividad de oxidación es atribuida a la abundancia en facetas $\{1\ 0\ 0\}$ [18]. Es por esto por lo que se decidió evaluar las AuNFs sintetizadas con el extracto de *Satureja macrostema* por voltametría cíclica soportado sobre carbón Vulcan.

El voltamperograma cíclico en condiciones ácidas a 0,5 M H₂SO₄ (Fig. 28a) presenta un pico de reducción de oro a 1.08 V vs. NHE y se observa un segundo pico en ~1.5 V vs. NHE, este último usualmente está relacionado con el plano (111) con la formación de óxido de oro expuesto a partir de un facetado electroquímico (reestructuración de la superficie por ciclación), en este sentido el material sintetizado es policristalino con abundancia en átomos en la familia de planos $\{111\}$ [118]. Las AuNFs presentaron un área de superficie electroquímicamente activa (EASA) de 0.2225 cm², la carga *Coulómbica* para los picos de reducción de AuO se tomó a un de valor de 386 $\mu\text{C cm}^{-2}$ para la reducción de la monocapa de AuO [119,120], este valor se empleó para normalizar la densidad de corriente máxima obtenida con las mejores condiciones y para normalizar los diagramas de Nyquist obtenidos de la espectroscopia de impedancia electroquímica. De la misma manera se evaluaron las AuNFs en condiciones básicas a 2M KOH donde se presenta el pico de reducción en 0.18 V (vs. NHE) atribuido a la formación de óxidos de oro (Fig 28b). Se evaluó la electrooxidación de glicerol grado analítico (0.1, 0.5, 1,2 M) y glicerol crudo (0.5, 1, 2 M) a 2M de KOH. De esta manera, en la figura 28c se observa que el glicerol analítico tiene un valor de densidad de corriente de 191 mA mg⁻¹ hasta 1510 mA mg⁻¹ lo que indica un incremento de densidad de corriente de 7.9 veces. De la misma manera se evaluó glicerol crudo (Fig. 28d) donde se obtuvo una densidad de corriente de 157 mA mg⁻¹ y un valor máximo de 819 mA mg⁻¹ en una solución de 2 M de KOH lo que indica un incremento de 5.2 veces en la densidad de la corriente. Las estructuras AuFNW/C presentaron potenciales de inicio (Eonset) de -0.073 V y -0.104 V para el glicerol analítico y crudo. El cambio del Eonset es un indicativo de que la compleja composición del glicerol crudo hace necesario un mayor trabajo eléctrico para iniciar la reacción. El potencial de inicio es la energía necesaria para iniciar la reacción de oxidación del alcohol, es decir el parámetro que permite conocer la actividad relativa de un material [121]. Estos Eonset son muy similares a los reportados para glicerol crudo donde se han empleado nanoestructuras de oro, mostrados en la tabla 4 del estado del arte. Con esto se puede indagar a que la estructura de la NPS no influye directamente en el potencial de inicio de la reacción de electro oxidación.

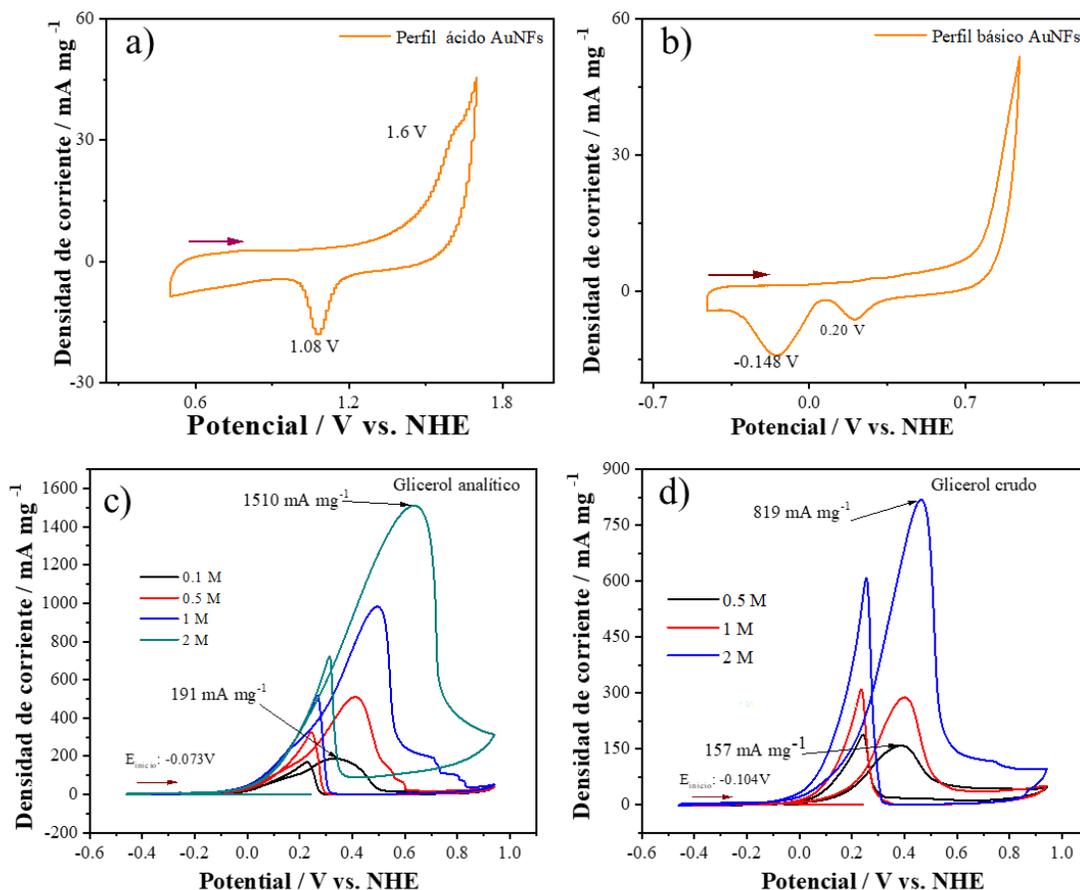


Figura 28. Voltarograma cíclico de AuNFs. a) Medio ácido, b) medio alcalino, c) evaluación electrocatalítica para electrooxidación de glicerol de grado analítico y (d) electrooxidación de glicerol crudo.

Los experimentos de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) fueron hechos a 2 diferentes potenciales y los parámetros electroquímicos obtenidos por el mejor ajuste del circuito equivalente fueron colectados en la tabla 8. El potencial E1 corresponde al potencial de inicio, en este punto está en el proceso no Faradaico, en donde la reacción no está favorecida y se pueden analizar parámetros intrínsecos. Mientras que, en el potencial de media onda (E2) la reacción se ve más favorecida [122,123].

Tabla 8. Resultados de la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

	Glicerol 1 M		Glicerol crudo 1 M	
	E1 (-0.034 V)	E2 (0.29 V)	E1 (-0.12 V)	E2 (0.28 V)
R_s (Ω cm²)	3.197	2.838	2.964	2.838
R_p (Ω cm²)	1323	86.33	5587	119.6

La figura 29a-b muestra el circuito equivalente, que incluye la resistencia de solución (R_s) en serie con la resistencia de transferencia de carga (R_p). El R_p está en paralelo con el elemento de fase constante (CPE1), que representa la capacitancia de la doble capa no ideal. La resistencia media de la solución para las estructuras AuNFs/C fue de $3,08 \Omega \text{ cm}^2$. La resistencia a la transferencia de carga fue mayor al potencial E1 para el glicerol crudo que para el glicerol analítico. Al potencial E2, la resistencia a la solución disminuyó en $2.838 \Omega \text{ cm}^2$, y el R_p disminuyó a 119.6 y $86.33 \Omega \text{ cm}^2$ para glicerol crudo y analítico, respectivamente. Este aumento en el R_p entre el glicerol crudo y el analítico puede deberse a que, en el crudo, hay especies como los tensioactivos que podrían actuar como aislantes [124], lo que podría disminuir la actividad hacia la reacción del glicerol crudo en AuNFs/C. Sin embargo, la actividad hacia la reacción de electro oxidación del glicerol crudo es mayor que en otros trabajos publicados [4,17,125].

Se utilizó la espectroscopía Raman (Fig. 29c) para determinar los elementos del glicerol crudo que podrían afectar la actividad. Como referencia, el espectro Raman de glicerol analítico de estas especies es característico, mostrando señales a 1256 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} asociadas con los grupos CH_2 [126]. Por otro lado, el glicerol crudo mostró cambios en regiones de 1200 a 1300 cm^{-1} (marcadas en azul claro) asociadas con el metanol. Las soluciones de trabajo generaron un remanente que en su mayoría presentó señales de los tensioactivos asociados a 1656 cm^{-1} a los grupos vinilo ($\text{C}=\text{C}$) [127,128].

Se empleo la prueba de cronoamperometría para ver si el material podía absorber combustible y liberar subproductos durante un tiempo específico. Nuestro estudio encontró que los AuNFs son estables (Fig. 29d) y pueden mantener una densidad de corriente de 16 mA mg^{-1} durante 60 min sin ningún cambio. Estos AuNFs mantuvieron densidades de corriente más altas que los materiales Au/C y PdAu/C con glicerol crudo [4]. Estaban aproximadamente en el rango de las AuNps con glicerol analítico reportado por Lertthahan [119], pero a diferencia de su estudio, la corriente se mantiene igual a lo largo del tiempo en nuestra investigación.

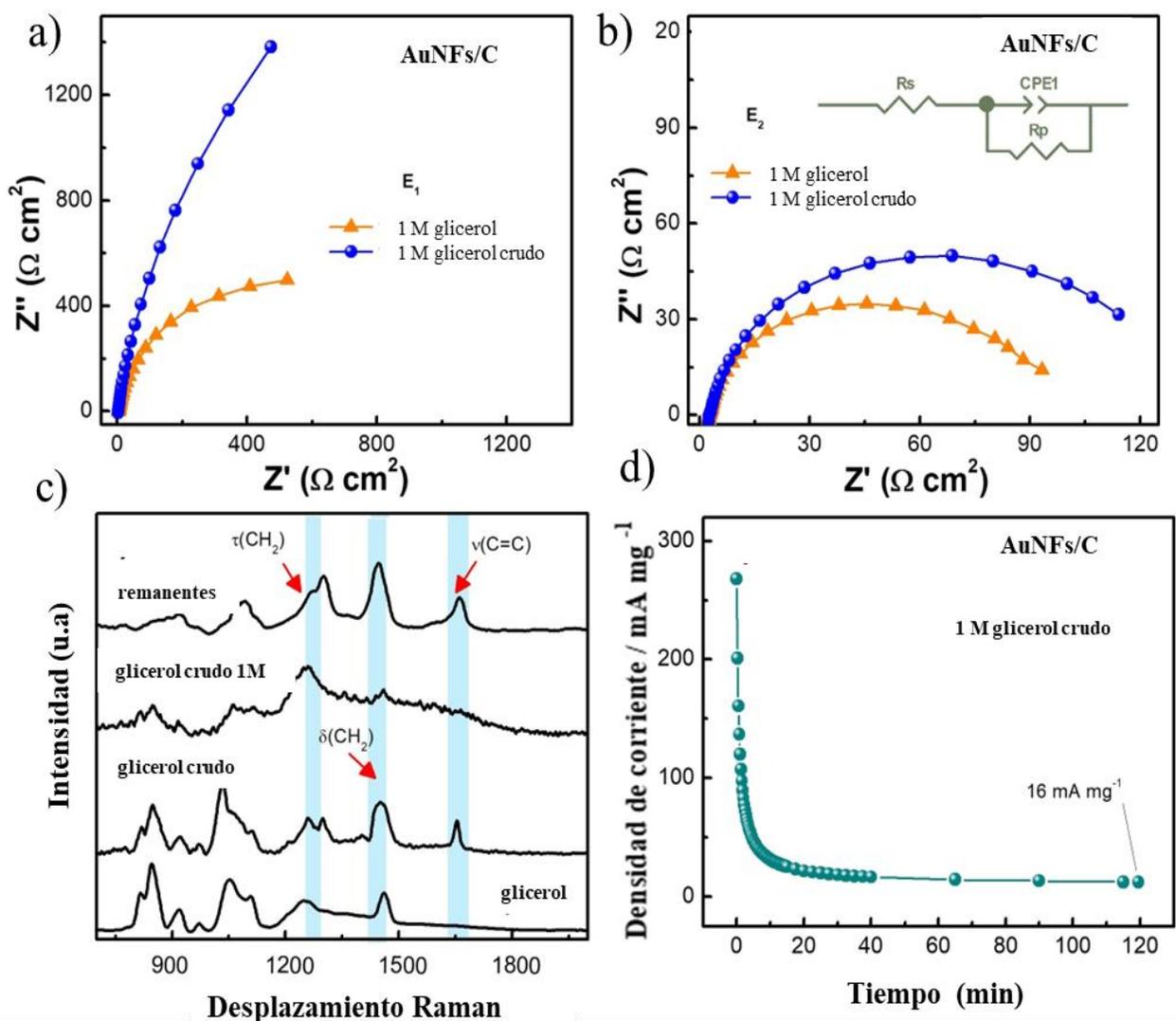


Figura 29. Gráficos de Nyquist para AuNFs/C hacia la reacción de electrooxidación de glicerol analítico y glicerol crudo en a) potencial de inicio y b) potencial de media onda; El circuito equivalente se encuentra en la imagen insertada. c) Espectros Raman a 785 nm para glicerol analítico, glicerol crudo y soluciones de trabajo. d) Cronoamperometría al potencial máximo para la reacción de electrooxidación del glicerol crudo a 1 M en 2M KOH. (En color)

A continuación, la figura 30 muestra el voltamperograma cíclico AuNPs sintetizadas con el extracto de *S. macostema* con la morfología esférica, las cuales fueron caracterizadas en el apartado anterior. Las AuNPs fueron soportadas en carbón vulcan. El voltamperograma cíclico en condiciones básicas a 2M KOH mostró que se presentan picos de reducción a 0.23 V (vs. NHE) atribuidos a la formación de óxidos de oro (Fig. 30a). Del mismo modo, en condiciones ácidas a

0,5 M H_2SO_4 (Fig. 30b) se presenta un pico de reducción de oro a 1.13 V vs. NHE y un onset 0.8 V. Se evaluó la electrooxidación de glicerol grado analítico (0.1, 0.5, 1,2 M) y glicerol crudo (0.5, 1, 2 M) a 2M de KOH. De esta manera, en la figura 30c se observa que el glicerol analítico tiene un valor de densidad de corriente de 23 mA mg^{-1} hasta 292 mA mg^{-1} lo que indica un incremento de densidad de corriente de 12 veces. De la misma manera se evaluó glicerol crudo (Fig. 30d) donde se obtuvo una densidad de corriente de 49 mA mg^{-1} y un valor máximo de 262 mA mg^{-1} en una solución de 2 M de KOH lo que indica un incremento de 5.3 veces en la densidad de la corriente. Estos resultados tienen un valor mayor a lo reportado por Velázquez-Hernández en 2020 [18] donde la densidad de corriente de la electro-oxidación del glicerol crudo obtuvo un valor de 77.39 mA mg^{-1} , lo que puede indicar que el material obtenido tiene una mejor capacidad de catálisis.

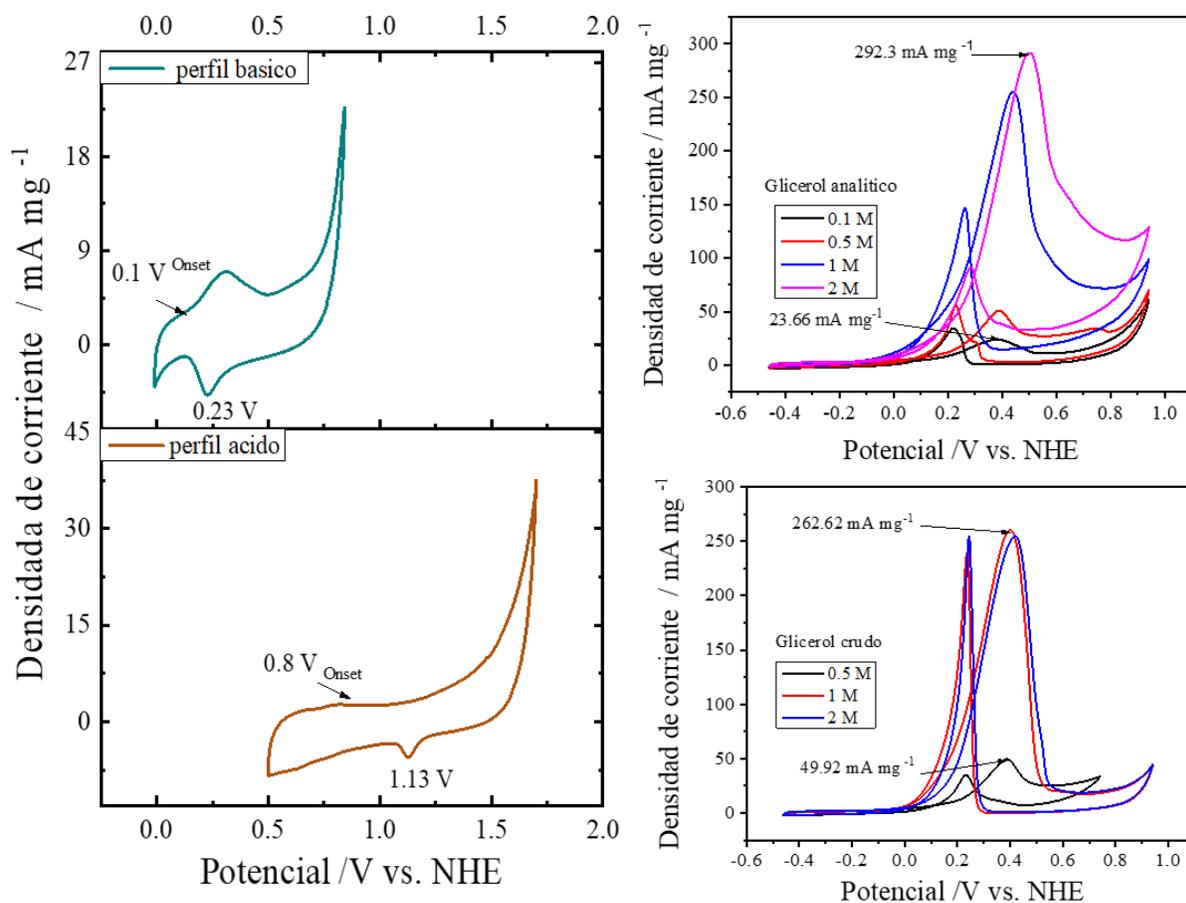


Figura 30. Voltarograma cíclico de AuNPs. a) medio ácido b) medio alcalino c) evaluación electrocatalítica para electrooxidación de glicerol de grado analítico (d) y electrooxidación de glicerol crudo.

4.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con el extracto de la semilla de aguacate

Para sintetizar las AuNPs también se empleó un extracto de la semilla de aguacate denominado “LEAS” por sus siglas en inglés “lipid extract avocado seed”, el cual contiene en su mayoría moléculas denominadas acetogeninas, cuya composición es una cadena alifática de carbonos que puede servir como agente estabilizante y grupos OH que funcionan como agente reductor, esto con la finalidad de funcionalizar de manera directa las nanopartículas y potenciar los efectos antibacteriales y citotóxicos del extracto.

Durante la reacción de reducción del AuHCl_4 con LEAS se observó un cambio de coloración de blanco a morado o café oscuro según la concentración del extracto. Este cambio en la coloración fue evaluado mediante espectroscopía de UV-Vis en un rango de 400 – 750 nm. El espectro de absorción de las muestras nm en la concentración de 705.5 $\mu\text{g/ml}$ presentó la banda típica de SPR de Au centrada a 538 nm, el cual disminuyó progresivamente con la reducción de la concentración el extracto (Fig. 31a), lo cual indica la formación de las nanopartículas a mayor contenido de extracto. Para continuar con la caracterización se evaluó el potencial Z (Fig. 31b) durante 3 semanas. Se observó que las nanopartículas sintetizadas con el extracto iniciaron con un valor promedio de -40 a -35 mV de la concentración mayor a la menor; en la semana 2 disminuyeron su potencial Z observándose aglomerados en la muestra, lo que indica el crecimiento de las partículas. Finalmente, en la semana 3 se estabilizó nuevamente el valor de potencial Z de las muestras alrededor de -38 mV; sin embargo, solo en las AuNPs sintetizadas con el extracto a 705.5 $\mu\text{g/ml}$ no se modificó de manera significativa el valor. Además, no se perdió la coloración morada característica de las AuNPs (Fig. 31b), por lo anterior se decidió únicamente emplear estas nanopartículas con la concentración de síntesis de 705.5 $\mu\text{g/ml}$ del extracto para posteriores técnicas de caracterización y para las aplicaciones biológicas que se abordarán en una sección posterior.

Las AuNps sintetizadas con 705.5 $\mu\text{g/ml}$ de LEAS (AuNPs:LEAS) se caracterizaron estructuralmente mediante difracción de rayos X (Fig. 32a), observándose picos intensos localizados a 38.1, 44.2, 64.7, 77.6° que concuerdan con los índices de Miller (111), (200), (2200), (311) que corresponden a la fase cúbica FCC (ICDD PDF #00-004-0784). Por DLS se determinó un tamaño de partícula de 5-8 nm (Fig. 32b). La morfología esférica y el tamaño de las AuNPs son favorables para las aplicaciones biológicas, ya que la toxicidad depende en gran medida del tamaño, forma y química de superficie [129].

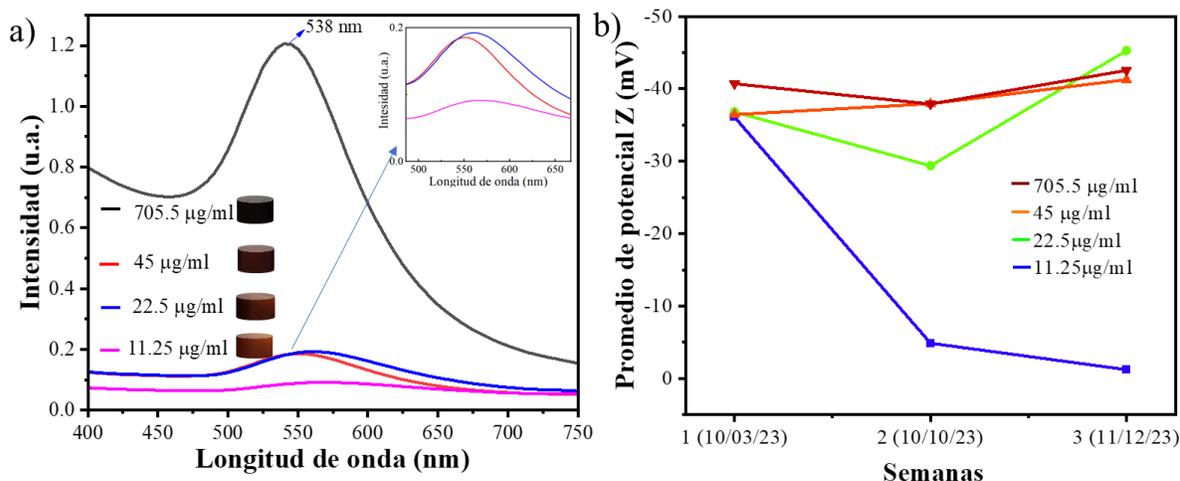


Figura 31. Caracterización de las AuNPs:LEAS. a) Espectroscopía de UV-Vis, b) prueba de estabilidad con potencial Z.

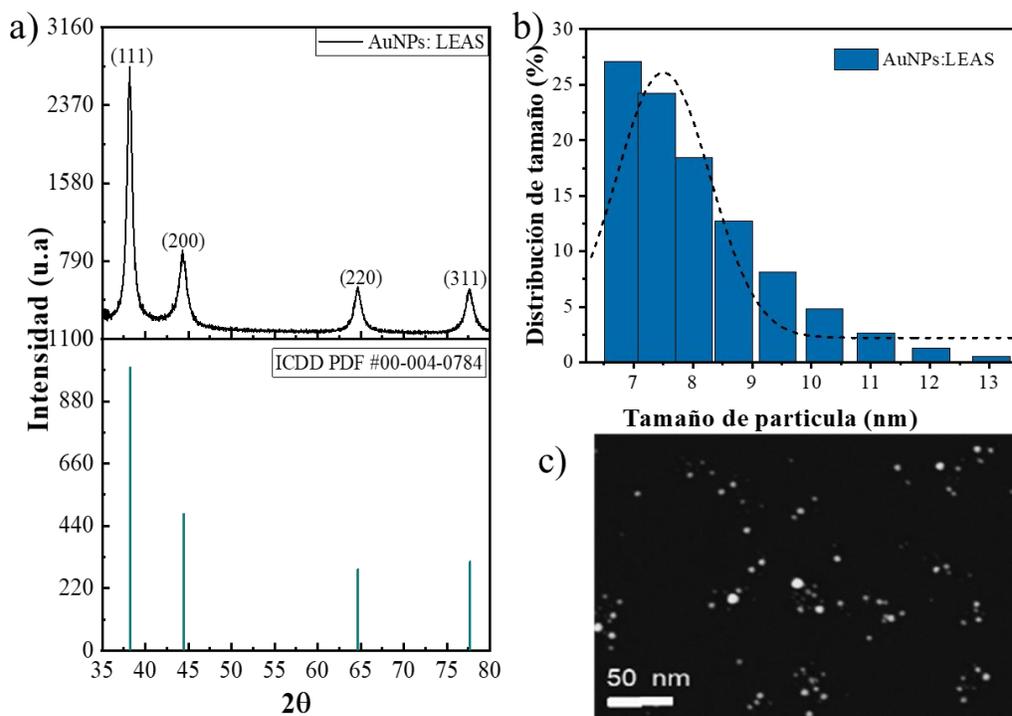


Figura 32. Caracterización de las AuNPs:LEAS. a) Difractograma de rayos X, b) evaluación de DLS, c) micrografía de SEM.

Debido al tamaño de las AuNps:LEAS no fue posible determinar su tamaño por microscopía electrónica de barrido; no obstante, se observó que las nanopartículas poseen una morfología esférica (Fig. 32c). La caracterización se realizó mediante TEM (Fig. 33a). Se observó una sola

morfología esférica bien definida, sin presencia de rodillos o triángulos generalmente obtenidos por métodos verdes, lo que sugiere que esa presencia de diversas estructuras, comúnmente obtenidas por estos métodos, se debe a la diversidad de biomoléculas reductoras y estabilizantes. Por otro lado, el extracto LEAS cuenta con suficientes agentes reductores y estabilizantes para lograr la morfología esférica y estable, determinado por el valor del potencial Z de -40 mV. Las AuNps:LEAS tienen un tamaño promedio de ~10 nm (Fig. 33b). Mediante HR-TEM se obtuvo el patrón FTT y se determinó una distancia interplanar de 0.23 nm que pertenece al plano (111) de su estructura cúbica. Además, con el patrón de difracción de electrones se confirmó la secuencia de los índices de Miller, estos corresponden nuevamente a la estructura FCC del Au de la tarjeta ICDD PDF #00-004-0784 (Fig. 33 c-d), lo que concuerda con lo anteriormente observado por DRX (Fig. 32a). Con ello, se puede concluir que fue posible sintetizar AuNPs estables con el extracto de LEAS.

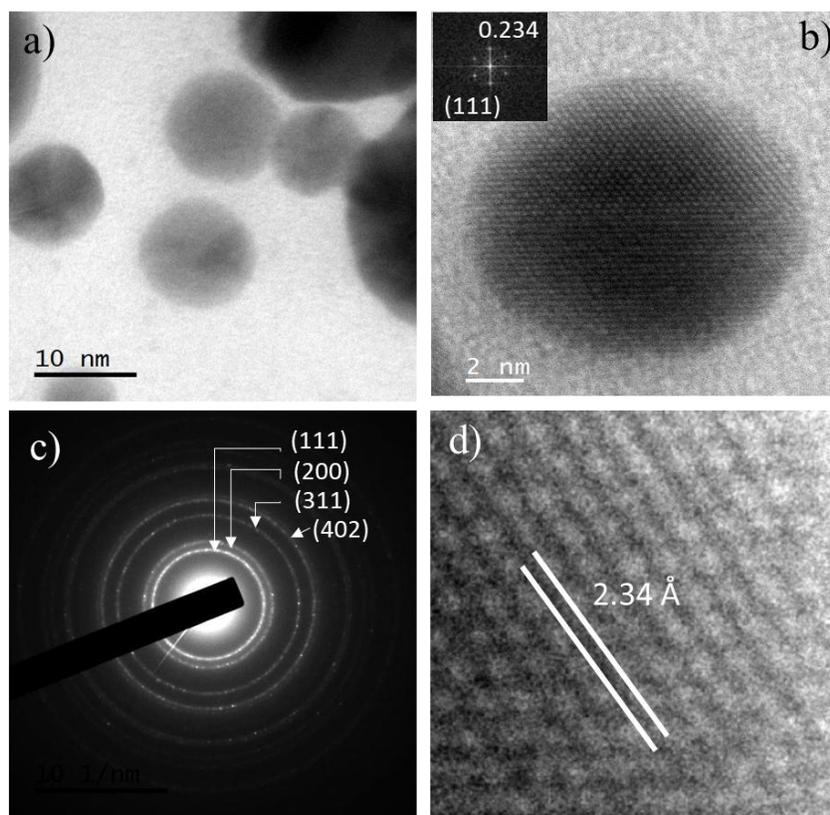


Figura 33. Caracterización de las AuNps:LEAS. a) Micrografía de TEM campo claro; b) micrografía de HR-TEM; c) patrón de difracción de electrones; d) patrón FTT.

4.3.1 Aplicaciones de nanopartículas de Au sintetizadas con el extracto de LEAS

Los efectos de las AuNps:LEAS en la viabilidad y proliferación de las células de melanoma murino (B16-F0) se analizaron por ensayos de azul tripano. En la Fig. 34a se observa que las AuNps:LEAS fueron citotóxicas en concentraciones cercanas a la IC_{50} LEAS (40.85 $\mu\text{g/ml}$) reportado previamente [130], por lo que este efecto puede ser atribuido a la actividad del extracto.

Sin embargo, al reducir la concentración de LEAS (14.1 $\mu\text{g/ml}$) en la generación de las AuNps:LEAS, estas incrementaron su efecto citotóxico ~35% respecto a LEAS (14.1 $\mu\text{g/ml}$).

En la Fig. 34b se presenta el efecto de las AuNps:LEAS en la proliferación de las células B16-F0. Interesantemente, cuando se utilizaron concentraciones por debajo de la IC_{50} de LEAS (21.16 a 3.52 $\mu\text{g/ml}$) para generar las AuNps:LEAS, estas provocaron una disminución de la proliferación celular equivalente a la actinomicina. Con LEAS no se ha reportado la síntesis de AuNPs, pero AuNPs sintetizadas con *Annona muricata* muestran actividad antiproliferativa en células cancerosas Hep2[131]. Además, se han reportado AgNPs con el extracto de *A. muricata* de semilla y cáscara, el cual dentro de sus compuestos incluyen a las acetogeninas. Los autores reportaron con las AgNPs una disminución de la viabilidad y de la proliferación con una IC_{50} 99% menor a la misma concentración del extracto en las líneas celulares cancerosas MCF-7, MDA-MB-468, A-375 de melanoma y HCT-116 [132]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, por lo que podemos concluir que con LEAS es posible sintetizar AuNPs y potencializar sus efectos antiproliferativos.

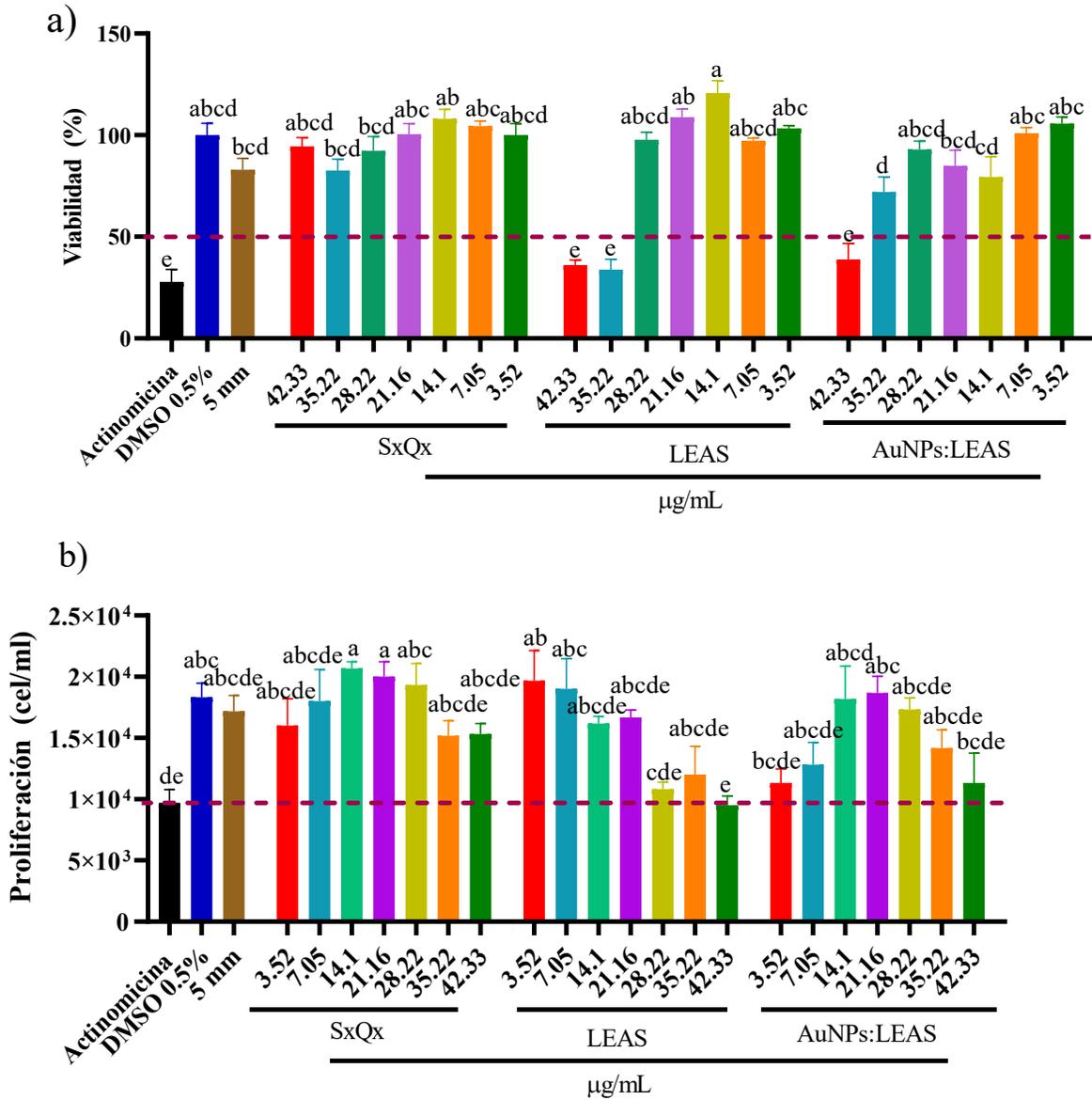


Figura 34. Efecto de las AuNPs:LEAS sobre la viabilidad y la proliferación de las células B16-F0. a) Viabilidad, b) proliferación. Los datos se obtuvieron mediante ensayos de exclusión con azul tripano. Los valores se representan como la media \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). $n=6$.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Mediante el uso del extracto acuoso de *Satureja macrostema* se sintetizaron nanopartículas y nanoflores de oro, el cambio de morfología entre esferas y flores depende de la oxidación de la planta y la concentración del extracto.

Las nanoflores sintetizadas con *S. macrostema* se ensamblan mediante placas triangulares agrupadas delgadas que forman los pétalos de las flores presentando anisotropía en los planos (111).

Mediante TEM se determinó el tamaño de las nanoflores siendo de aproximadamente 730 nm, contando con triángulos de una longitud de 150 nm y un grosor de 10 nm. Se presentó una banda de absorción centrada en 540 nm, y por medio de DRX se determinó su estructura cúbica FCC de Au.

El análisis de GC-MS para el extracto de *S. macrostema* reveló la presencia de seis compuestos fitoquímicos. En orden de concentración, estos compuestos son pulegona, isopulegona, isomentona, mentona, 4-metil isopulegona y linalol. Después de la biorreducción, todos los compuestos disminuyeron, lo que indicó que los compuestos terpenoides desempeñan el papel primordial en la reducción del HAuCl_4 y la aglomeración de nanoplacas de Au.

Las nanoflores sintetizadas con *S. macrostema*, al ensamblarse con triángulos, cuya dimensiones se encuentran en la escala nanométrica, presentan un área de superficie de $36.53 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, lo que favorece sus propiedades catalíticas.

Las propiedades de oxidación-reducción del oro se analizaron mediante voltamperometría cíclica en medios ácidos y alcalinos. Se encontró que las AuNFs tenían una superficie electroquímicamente activa de $0,2225 \text{ cm}^2$. Además, las AuNFs se sometieron a pruebas electroquímicas con glicerol de grado analítico y crudo, en condiciones alcalinas. La densidad de corriente del glicerol analítico con las AuNFs fue aproximadamente 5 veces mayor, mientras que con el glicerol crudo fue alrededor de 1,6 veces mayor en comparación con los informes anteriores, lo que demuestra la calidad de los resultados obtenidos. Esta mejoría, puede estar asociada a la morfología tipo flor que exhibe buena área superficial cuyos planos preferenciales son (111). Por último, el resto de moléculas superficiales del extracto vegetal (tensioactivos) favorecen que no haya una intoxicación rápida por CO, lo que favorece su mayor estabilidad.

Por otro lado, el extracto de *S. macrostema* fue útil en la síntesis de nanopartículas esféricas de oro que presentaron una banda de absorción en UV-vis centrada en 536 nm. Las imágenes de TEM confirmaron su naturaleza esférica, presentando un tamaño promedio alrededor de los 20 nm, indicando una estructura cristalina cúbica FCC del Au.

Se implementó un método simple por microscopía electrónica de barrido, para la observación de las AuNPs en células de cáncer MCF-7 y B16-F0, cuya ventaja es evitar el uso de recubrimientos

metálicos o de químicos de contraste. Con esta técnica es posible visualizar las nanopartículas dentro y fuera de la célula, además de diferenciar si se encontraban vivas o muertas antes de su fijación con paraformaldehído.

Las AuNPs al funcionalizarse con quimioterapéuticos sensibilizan células cancerosas resistentes y disminuyen la proliferación celular hasta un 52%, respecto al control.

Con el extracto de la semilla de aguacate (LEAS) fue posible obtener nanopartículas uniformes de 10 nm, esféricas e inferiores a las obtenidas con *S. macrostema*. Morfologías, como rodillos y triángulos, fueron evitadas atribuido a que el extracto de LEAS es estandarizado para obtener la misma concentración de biomoléculas reductoras y estabilizantes.

Las AuNPs:LEAS presentaron una banda de absorción centrada en 542 nm, mediante el patrón de DRX se determinó una estructura cristalina cúbica FCC, presentando una disminución de la viabilidad del ~35% en las células B16-F0 de melanoma murino a la concentración de 14.1 µg/ml y una disminución de la proliferación celular de un 52% a concentraciones por debajo de la IC₅₀ del LEAS, es decir de 21.16 a 3.52 µg/ml.

REFERENCIAS

- [1] S. Kim, S.H. Kang, S.H. Byun, H.J. Kim, I.K. Park, H. Hirschberg, S.J. Hong, Intercellular bioimaging and biodistribution of gold nanoparticle-loaded macrophages for targeted drug delivery, *Electronics* 9 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3390/electronics9071105>.
- [2] O. Santos, J. Cancino-Bernardi, P.M. Pincela Lins, D. Sampaio, T. Pavan, V. Zucolotto, Near-infrared photoactive theragnostic gold nanoflowers for photoacoustic imaging and hyperthermia, *ACS Applied Bio Materials* 4 (2021) 6780–6790. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00519>.
- [3] X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy, *Nanomedicine* 2 (2007) 681–693. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.5.681>.
- [4] I. Velázquez-Hernández, E. Zamudio, F.J. Rodríguez-Valadez, N.A. García-Gómez, L. Álvarez-Contreras, M. Guerra-Balcázar, N. Arjona, Electrochemical valorization of crude glycerol in alkaline medium for energy conversion using Pd, Au and PdAu nanomaterials, *Fuel* 262 (2020) 116556. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116556>.
- [5] X. Hu, Y. Zhang, T. Ding, J. Liu, H. Zhao, multifunctional gold nanoparticles: a novel nanomaterial for various medical applications and biological activities, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00990>.

- [6] X. Huang, S. Devi, M. Bordiga, C.S. Brennan, B. Xu, Phenolic compounds mediated biosynthesis of gold nanoparticles and evaluation of their bioactivities: A review, *International journal of food science and technology* 58 (2023) 1673–1694. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16346>.
- [7] P.B. Santhosh, J. Genova, H. Chamati, Review green synthesis of gold nanoparticles: an eco-friendly approach, *chemistry* 4 (2022) 345–369. <https://doi.org/10.3390/chemistry4020026>.
- [8] N.R.S. Sibuyi, V.C. Thiye, K. Panjtan-Amiri, M. Meyer, K. V. Katti, Green synthesis of gold nanoparticles using *Acai berry* and elderberry extracts and investigation of their effect on prostate and pancreatic cancer cells, *BJGP Open* 8 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1177/1849543521995310>.
- [9] A. Santhanam, N.S. Kavitha, C. Naveen Kumar, B. Saipriya, Rapid synthesis and characterization of gold nanostars from the aqueous extract of *Cinnamomum zeylanicum*, *AIP conference proceedings* 2265 (2020) 4–8. <https://doi.org/10.1063/5.0017074>.
- [10] A. Del Moral-G, T. López-Luke, A. Saavedra-Molina, M.A. Gómez-Hurtado, G. Rosas, Time-dependent eco-friendly method to produce Au nanometric assemblies with fluorescent properties, *Journal of crystal growth* 564 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2021.126130>.
- [11] S.J. Lee, H. Jang, D.N. Lee, Inorganic Nanoflowers—Synthetic strategies and physicochemical properties for biomedical applications: A Review, *Pharmaceutics* 14 (2022) 1–21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091887>.
- [12] D.S. Chormey, S. Erarpat, B.T. Zaman, N. Özdoğan, O. Yağmuroğlu, S. Bakırdere, Nanoflower synthesis, characterization and analytical applications: A review, *Environmental chemistry letters* (2023). <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01572-8>.
- [13] G.A. Molina, R. Esparza, J.L. López-Miranda, A.R. Hernández-Martínez, B.L. España-Sánchez, E.A. Elizalde-Peña, M. Estevez, Green synthesis of Ag nanoflowers using *Kalanchoe daigremontiana* extract for enhanced photocatalytic and antibacterial activities, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 180 (2019) 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.044>.
- [14] N.E. Onmaz, D.D. Yilmaz, A. Morar, C. Gungor, Green synthesis of gold nanoflowers using *Rosmarinus officinalis* and *Helichrysum italicum* extracts: Comparative studies of their antimicrobial and antibiofilm activities, *Antibiotics* 11 (2022) 1-19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111466>
- [15] G. Zhu, G. Jing, G. Xu, Q. Li, R. Huang, F. Li, H. Li, D. Wang, W. Chen, B.Z. Tang, A green and efficient strategy facilitates continuous solar-induced steam generation based on tea- <https://doi.org/10.1007/s12274-022-4269-7>
- [16] Y. Xie, L. Sun, X. Pan, Z. Zhou, Y. Zheng, X. Yang, G. Zhao, Carbon paper supported gold nanoflowers for tunable glycerol electrooxidation boosting efficient hydrogen evolution, *Carbon* 203 (2023) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.11.067>.
- [17] Z. Zhang, L. Xin, J. Qi, D.J. Chadderdon, W. Li, Supported Pt, Pd and Au nanoparticle anode catalysts for anion-exchange membrane fuel cells with glycerol and crude glycerol fuels,

Applied catalysis B: Environment and energy 136–137 (2013) 29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.01.045>.

[18] I. Velázquez-hernández, M. Estévez, H. Vergara-castañeda, M. Guerra-balcázar, L. Álvarez-contreras, G. Luna-bárceñas, C. Pérez, Synthesis and application of biogenic gold nanomaterials with { 1 0 0 } facets for crude glycerol electro-oxidation, *Fuel* 279 (2020) 118505. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118505>.

[19] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

[20] P. Kesharwani, R. Ma, L. Sang, M. Fatima, A. Sheikh, M.A.S. Abourehab, N. Gupta, Z.S. Chen, Y. Zhou, Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy, *Molecular cancer* 22 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01798-8>.

[21] M. Zhang, S. Gao, D. Yang, Y. Fang, X. Lin, X. Jin, Y. Liu, X. Liu, K. Su, K. Shi, Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors *in vivo*, *Acta Pharmaceutica Sinica B* 11 (2021) 2265–2285. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.033>.

[22] M.A. González-López, E.M. Gutiérrez-Cárdenas, C. Sánchez-Cruz, J.F. Hernández-Paz, I. Pérez, J.J. Olivares-Trejo, O. Hernández-González, Reducing the effective dose of cisplatin using gold nanoparticles as carriers, *Cancer Nanotechnology* 11 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12645-020-00060-w>.

[23] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, F. Rizzolio, The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.

[24] Y.C. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello, Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology, *Nanoscale* 4 (2012) 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>.

[25] S.A. Ahire, A.A. Bachhav, T.B. Pawar, B.S. Jagdale, A.V. Patil, P.B. Koli, The Augmentation of nanotechnology era: A concise review on fundamental concepts of nanotechnology and applications in material science and technology, *Results Chemistry* 4 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100633>.

[26] A.B. Asha, R. Narain, Nanomaterials properties, *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications* (2020) 343–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00015-7>.

[27] Couvreur Patrick, Barrantt Gillian, Fattal Elias, Legrand Philippe, Vauthier Christine, Nanocapsule technology: A review, *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 19 (2002) 99–134. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i2.10

[28] E. Kianfar, Catalytic properties of nanomaterials and factors affecting it, Importance & applications of nanotechnology, 2020. <https://www.researchgate.net/publication/344401226>.

- [29] F.B.K. Eddin, Y.W. Fen, The principle of nanomaterials based surface plasmon resonance biosensors and its potential for dopamine detection, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25122769>.
- [30] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O.M. Maragò, M.A. Iati, Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review, *Journal of physics condensed Matter* 29 (2017). <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- [31] N. Ma, F.G. Wu, X. Zhang, Y.W. Jiang, H.R. Jia, H.Y. Wang, Y.H. Li, P. Liu, N. Gu, Z. Chen, Shape-dependent radiosensitization effect of gold nanostructures in cancer radiotherapy: Comparison of gold nanoparticles, nanospikes, and nanorods, *ACS Applied materials & interfaces journal* 9 (2017) 13037–13048. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01112>.
- [32] H. Hassan, P. Sharma, M.R. Hasan, S. Singh, D. Thakur, J. Narang, Gold nanomaterials – The golden approach from synthesis to applications, *Materials science energy technology* 5 (2022) 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2022.09.004>.
- [33] S.J. Amina, B. Guo, A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle, *International journal of nanomedicine* 15 (2020) 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>.
- [34] H.R. Ghorbani, Green synthesis of gold nanoparticles, *Oriental Journal of Chemistry* 31 (2015) 303–305. <https://doi.org/10.13005/ojc/310134>.
- [35] J. Milan, K. Niemczyk, M. Kus-Liškiewicz, Treasure on the earth—Gold nanoparticles and their biomedical applications, *Materials* 15 (2022). <https://doi.org/10.3390/ma15093355>.
- [36] A. Roy, C. Pandit, A. Gacem, M.S. Alqahtani, M. Bilal, S. Islam, M.J. Hossain, M. Jameel, Biologically derived gold nanoparticles and their applications, *Bioinorganic chemistry and applications* 2022 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/8184217>.
- [37] D.E. Mustafa, T. Yang, Z. Xuan, S. Chen, H. Tu, A. Zhang, Surface plasmon coupling effect of gold nanoparticles with different shape and size on conventional surface plasmon resonance signal, *Plasmonics* 5 (2010) 221–231. <https://doi.org/10.1007/s11468-010-9141-z>.
- [38] W.A. Arcos Rosero, A. Bueno Barbezán, C. Daruich de Souza, M.E. Chuery Martins Rostelato, Review of advances in coating and functionalization of gold nanoparticles: from theory to biomedical application, *Pharmaceutics* 16 (2024). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020255>.
- [39] S. Medici, M. Peana, D. Coradduzza, M.A. Zoroddu, Gold nanoparticles and cancer: Detection, diagnosis and therapy, *Seminars in Cancer Biology* 76 (2021) 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.017>.
- [40] A. Jahangiri-Manesh, M. Mousazadeh, S. Taji, A. Bahmani, A. Zarepour, A. Zarrabi, E. Sharifi, M. Azimzadeh, Gold nanorods for drug and gene delivery: an overview of recent advancements, *Pharmaceutics* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030664>.

- [41] X. Tong, Z. Wang, X. Sun, J. Song, O. Jacobson, G. Niu, D.O. Kiesewetter, X. Chen, Size dependent kinetics of gold nanorods in EPR mediated tumor delivery, *Theranostics* 6 (2016) 2039–2051. <https://doi.org/10.7150/thno.17098>.
- [42] J. Georgeous, N. AlSawaftah, W.H. Abuwatfa, G.A. Husseini, Review of gold nanoparticles: synthesis, properties, shapes, cellular uptake, targeting, release mechanisms and applications in drug delivery and therapy, *Pharmaceutics* 16 (2024). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101332>.
- [43] X. Xie, J. Liao, X. Shao, Q. Li, Y. Lin, The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, rods, and triangles, *Scientific Reports* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04229-z>.
- [44] X. Yu, Z. Wang, H. Cui, X. Wu, W. Chai, J. Wei, Y. Chen, Z. Zhang, A review on gold nanotriangles: Synthesis, self-assembly and their applications, *Molecules* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27248766>.
- [45] Ł. Niżnik, M. Noga, D. Kobylarz, A. Frydrych, A. Krośniak, L. Kapka-Skrzypczak, K. Jurowski, Gold nanoparticles (AuNPs) toxicity, safety and green synthesis: A critical review, *International journal of molecular sciences* (2024). <https://doi.org/10.3390/ijms25074057>.
- [46] Chibuye Bitwell, Singh Sen Indra, Cjimula Luke, Maseka Kenneth Kakoma, A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants, *Scientific African* 19 (2023) 2468–2276.
- [47] M. Butnariu, N.-S. Bocso, The biological role of primary and secondary plants metabolites, *Nutrition and food processing* 5 (2022) 01–07. <https://doi.org/10.31579/2637-8914/094>.
- [48] Review of extraction techniques extraction methods: Microwave, ultrasonic, pressurized fluid, soxhlet extraction, *International journal of advanced research in chemical Science* 6 (2019). <https://doi.org/10.20431/2349-0403.0603002>.
- [49] R.M.P. Gutierrez, Y.T.G. Navarro, Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*, *Pharmacognosy magazine* 6 (2010) 125–131. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.62901>.
- [50] G. R, Torres-Martínez, YM, García-Rodríguez, P, Ríos-Chávez, A, Saavedra-Molina, JE, López-Meza, A, Ochoa-Zarzosa, Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (moc. and sessé ex benth.) Briq., *Pharmacognosy magazine* 13(Suppl 4 (2018) 179–188. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>.
- [51] Siavash Babajafari, Farzad Nikaein, Seyed Mohammad Mazloomi, Mohammad Javad Zibaenejad, Arman Zargaran, A Review of the benefits of *Satureja* species on metabolic syndrome and their possible mechanisms of action, *Evidence-based complementary and alternative medicine* 20 (2015) 212–223.

- [52] M. Yasir, S. Das, M. Kharya, The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill, *Pharmacognosy Reviews* 4 (2010) 77–84. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.65332>.
- [53] A. Ochoa-Zarzosa, M. Báez-Magaña, J. Guzmán-Rodríguez, J. Flores-Alvarez, M. Lara-Márquez, B. Zavala-Guerrero, R. Salgado-Garciglia, R. López-Gómez, J.E. López-Meza, Bioactive molecules from native mexican avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): A Review, *Plant foods for human nutrition* 76 (2021) 133–142. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00887-7/Published>.
- [54] M. Báez-Magaña, A. Ochoa-Zarzosa, N. Alva-Murillo, R. Salgado-Garciglia, J.E. López-Meza, Lipid-rich extract from mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces staphylococcus aureus internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells *Journal of immunology research* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/7083491>.
- [55] S. Padilla-Arellanes, R. Salgado-Garciglia, M. Báez-Magaña, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. López-Meza, Cytotoxicity of a lipid-rich extract from native mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on canine osteosarcoma D-17 cells and synergistic activity with cytostatic drugs, *Molecules* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26144178>.
- [56] M. Lara-Márquez, M. Báez-Magaña, C. Raymundo-Ramos, P.A. Spagnuolo, L. Macías-Rodríguez, R. Salgado-Garciglia, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. López-Meza, Lipid-rich extract from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) induces apoptosis and modulates the inflammatory response in Caco-2 human colon cancer cells, *Journal of Functional Foods* 64 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103658>.
- [57] P. Yammine, H. El-Nakat, R. Kassab, A. Mansour, B. El Khoury, D. Koumeir, Z. Matar, A. Chmayssem, Recent advances in applied electrochemistry: a review, *chemistry* 6 (2024) 407–434. <https://doi.org/10.3390/chemistry6030024>.
- [58] I. Shah, N. Raythatha, A Brief review on breast cancer treatment and current challenges, *World journal of current medical and pharmaceutical research* (2021) 27–31. <https://doi.org/10.37022/wjcmpr.vi.170>.
- [59] D. T. Debela, S. G. Y. Muzazu, K. Heraro, M. T. Ndalama, B. W. Mesele, D. C. Haile, S. K. Kitui, T. Manyazewal, New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives, *SAGE Open Medicine* 9 (2021) 1–10.
- [60] B. Wang, S. Hu, Y. Teng, J. Chen, H. Wang, Y. Xu, K. Wang, J. Xu, Y. Cheng, X. Gao, Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors, *Signal transduct Target Therapy* 9 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y>.
- [61] B. Smolarz, A. Zadrożna Nowak, H. Romanowicz, Breast cancer—epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature), *Cancers* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>.

- [62] M. Chaurasia, R. Singh, S. Sur, S.J.S. Flora, A review of FDA approved drugs and their formulations for the treatment of breast cancer, *Frontiers in Pharmacology* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1184472>.
- [63] J.A. Azim, E. de Azambuja, M. Colozza, J. Bines, M.J. Piccart, Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer, *Annals of Oncology* 22 (2011) 1939–1947. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq683>.
- [64] L.M. Gosman, D.A. Țăpoi, M. Costache, Cutaneous Melanoma: A Review of multifactorial pathogenesis, immunohistochemistry, and emerging biomarkers for early detection and management, *International Journal Molecules Science* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms242115881>.
- [65] P.K. Dhanyamraju, T.N. Patel, Melanoma therapeutics: a literature review, *Journal of Biomedical Research* 36 (2022) 1–21. <https://doi.org/10.7555/JBR.36.20210163>.
- [66] L.E. Davis, S.C. Shalin, A.J. Tackett, Current state of melanoma diagnosis and treatment, *Cancer Biology Therapy* 20 (2019) 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>.
- [67] B. Bhardwaj, P. Singh, A. Kumar, S. Kumar, V. Budhwar, Eco-friendly greener synthesis of nanoparticles, *Advanced pharmaceutical bulletin* 10 (2020) 566–576. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.067>.
- [68] B. Bhardwaj, P. Singh, A. Kumar, S. Kumar, V. Budhwar, Eco-friendly greener synthesis of nanoparticles, *Advanced pharmaceutical bulletin* 10 (2020) 566–576. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.067>.
- [69] K.X. Lee, K. Shameli, Y.P. Yew, S.Y. Teow, H. Jahangirian, R. Rafiee-Moghaddam, T.J. Webster, Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications, *International journal in Nanomedicine* 15 (2020) 275–300. <https://doi.org/10.2147/IJN.S233789>.
- [70] C. Pechyen, K. Ponsanti, B. Tangnorawich, N. Ngernyuang, Waste fruit peel – Mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles, *Journal of materials research and technology* 14 (2021) 2982–2991. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.111>.
- [71] M.A. Mahdi, M.T. Mohammed, A.N. Jassim, Y.M. Taay, Green synthesis of gold NPs by using dragon fruit: Toxicity and wound healing, *Journal of physics: conference series* 1853 (2021). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1853/1/012039>.
- [72] M.S. Kiran, C.R. Rajith Kumar, U.R. Shwetha, H.S. Onkarappa, V.S. Betageri, M.S. Latha, Green synthesis and characterization of gold nanoparticles from *Moringa oleifera* leaves and assessment of antioxidant, antidiabetic and anticancer properties, *Chemical Data Collections* 33 (2021) 100714. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100714>.
- [73] N.S. Al-Radadi, Green biosynthesis of flaxseed gold nanoparticles (Au-NPs) as potent anti-cancer agent against breast cancer cells, *Journal of Saudi Chemical Society* 25 (2021) 101243. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101243>.

- [74] N.R.S. Sibuyi, V.C. Thipe, K. Panjtan-Amiri, M. Meyer, K. V. Katti, Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Acai berry* and Elderberry extracts and investigation of their effect on prostate and pancreatic cancer cells, *BJGP Open* 8 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1177/1849543521995310>.
- [75] M.H. Oueslati, L. Ben Tahar, A.H. Harrath, Synthesis of ultra-small gold nanoparticles by polyphenol extracted from *Salvia officinalis* and efficiency for catalytic reduction of p-nitrophenol and methylene blue, *Green chemical letters review* 13 (2020) 18–26. <https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1711202>.
- [76] J. Kaur, A.K. Sarma, M.K. Jha, P. Gera, Valorization of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues, *Biotechnology Reports* 27 (2020) e00487. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00487>.
- [77] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O.M. Maragò, M.A. Iati, Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review, *Journal of physics condensed matter* 29 (2017). <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- [78] D. Padayachee, V. Golovko, B. Ingham, A.T. Marshall, Influence of particle size on the electrocatalytic oxidation of glycerol over carbon-supported gold nanoparticles, *Electrochimica Acta* 120 (2014) 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.100>.
- [79] P. Lertthahan, S. Yongprapat, A. Therdthianwong, S. Therdthianwong, Pt-modified Au/C catalysts for direct glycerol electro-oxidation in an alkaline medium, *International journal of hydrogen energy* 42 (2017) 9202–9209. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.120>.
- [80] N. Pittayaporn, A. Therdthianwong, S. Therdthianwong, Au/C catalysts promoted with Ni for glycerol electrooxidation in alkaline media, *Journal of applied electrochemistry* 48 (2018) 251–262. <https://doi.org/10.1007/s10800-018-1155-9>.
- [81] Z. Zhang, L. Xin, J. Qi, D.J. Chadderton, W. Li, Supported Pt, Pd and Au nanoparticle anode catalysts for anion-exchange membrane fuel cells with glycerol and crude glycerol fuels, *Applied Catalysis B* 136–137 (2013) 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.01.045>.
- [82] J.B. Costa Santos, C. Vieira, R. Crisafulli, J.J. Linares, Promotional effect of auxiliary metals Bi on Pt, Pd, and Ag on Au, for glycerol electrolysis, *International journal hydrogen energy* 45 (2020) 25658–25671. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.225>.
- [83] I. Velázquez-hernández, M. Estévez, H. Vergara-castañeda, M. Guerra-balcázar, L. Álvarez-contreras, G. Luna-bárceñas, C. Pérez, Synthesis and application of biogenic gold nanomaterials with { 1 0 0 } facets for crude glycerol electro-oxidation, *Fuel* 279 (2020) 118505. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118505>.
- [84] Z. Zhang, L. Xin, W. Li, Supported gold nanoparticles as anode catalyst for anion-exchange membrane-direct glycerol fuel cell (AEM-DGFC), *International journal hydrogen energy* 37 (2012) 9393–9401. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.019>.

- [85] A. V. Lee, S. Oesterreich, N.E. Davidson, MCF-7 Cells - changing the course of breast cancer research and care for 45 years, *Journal of the National Cancer Institute* 107 (2015). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>.
- [86] Ş. Comşa, A. M. Cîmpean, M. Raica, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research, *Anticancer research* 35 (2015) 3147–3154.
- [87] M. Kodiha, H. Mahboubi, D. Maysinger, U. Stochaj, gold nanoparticles impinge on nucleoli and the stress response in MCF7 breast cancer cells, *Nanobiomedicine* 3 (2016). <https://doi.org/10.5772/62337>.
- [88] J. J. Matinez-SanMiguel, D. Zarate-Trivino, M. P. Garcia-Garcia, J. M. Garcia-Martin, A. Mayoral, Y. Huttel, L. Martinez, J. L. Cholula Diaz, Antitumor activity of bimetallic silver/gold nanoparticles against MCF-7 breast cancer cells, *Royal Society of Chemistry* 14 (2024) 39102–39111.
- [89] A. Yeşildağ, H.T. Kızıloğlu, E. Dirican, E. Erbaş, V. Gelen, A. Kara, Anticarcinogenic effects of gold nanoparticles and metformin against MCF-7 and A549 cells, *Biological trace element research* 202 (2024) 4494–4507. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04090-y>.
- [90] B. Srinivas Raghavan, R. Anantanarayanan, R. Rajaram, Biocompatibility, uptake and anti-cancer activity of doxorubicin loaded gold nanoparticles in MCF-7 breast cancer cell line, *Nanoscience & Technology* (2016) 3(2): 1-10. DOI: [10.15226/2374-8141/3/2/00139](https://doi.org/10.15226/2374-8141/3/2/00139)
- [91] M. Sathiyaraj, D. Elumalai, V. Rajendran, M. Hemavathi, K. Ashok, M. Babu, U. Monisha, S. Poonguzhali, S. Punithavalli, G. Abirami, Biosynthesis, characterization, and multifaceted applications of *Elytraria acaulis* synthesized silver and gold nanoparticles: Anticancer, antibacterial, larvicidal, and photocatalytic activities., *Journal of photochemistry and photobiology B* 263 (2025) 113102. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2025.113102>.
- [92] W.W. Overwijk, N.P. Restifo, B16 as a mouse model for human melanoma, *Current protocols in immunology* 39 (2000). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>.
- [93] A. Bemidinezhad, F. Mirzavi, H. Gholamhosseinian, F. Gheybi, M. Soukhtanloo, Gold-containing liposomes and glucose-coated gold nanoparticles enhances the radiosensitivity of B16F0 melanoma cells via increasing apoptosis and ROS production, *Life sciences* 318 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121495>.
- [94] M. Alikhani, M. Ramezani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, S. Nekooei, M. Alibolandi], Synthesis of theranostic aptamer targeted polydopamine-coated gold nanocages for chemo-photothermal therapy against melanoma, *Journal of drug delivery science and technology* 103 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106443>.
- [95] R. Torres-martínez, M.Á. Bello-gonzález, J. Molina-torres, E. Ramírez-chávez, Y. García-rodríguez, R. Fulgencio-negrete, A. García-hernández, R. López-gómez, M.M. Martínez-pacheco, B. Nieves, L. Chávez, Effect of fertilization on growth and the content of volatile compounds of *Satureja macrostema* Briq ., *Revista mexicana de ciencias forestales* 5 (2013) 122–134.

- [96] A.A.A. Aljabali, Y. Akkam, M.S. Al Zoubi, K.M. Al-Batayneh, B. Al-Trad, O.A. Alrob, A.M. Alkilany, M. Benamara, D.J. Evans, Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity, *Nanomaterials* 8 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3390/nano8030174>.
- [97] T. Ahmad, M. Irfan, M.A. Bustam, S. Bhattacharjee, Effect of reaction time on green synthesis of gold nanoparticles by using aqueous extract of *Elaise guineensis* (Oil Palm Leaves), *Procedia Engineering* 148 (2016) 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.465>.
- [98] S.A. Khan, S. Shahid, C.S. Lee, Green synthesis of gold and silver nanoparticles using leaf extract of *Clerodendrum inerme*; characterization, antimicrobial, and antioxidant activities, *Biomolecules* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10060835>.
- [99] K. Chester, S. Zahiruddin, A. Ahmad, W. Khan, S. Paliwal, S. Ahmad, Bioautography-based identification of antioxidant metabolites of *Solanum nigrum* and exploration its hepatoprotective potential, *Pharmacognosy magazine* 13 (Suppl (2017) 179–188. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>.
- [100] W.R. Chen, R.L. Adams, A.K. Higgins, K.E. Bartels, R.E. Nordquist, Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: An in vivo efficacy study, *Cancer Letters* 98 (1996) 169–173. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(06\)80028-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(06)80028-5).
- [101] V. Mulens-Arias, A. Balfourier, A. Nicolás-Boluda, F. Carn, F. Gazeau, Endocytosis-driven gold nanoparticle fractal rearrangement in cells and its influence on photothermal conversion, *Nanoscale* 12 (2020) 21832–21849. <https://doi.org/10.1039/d0nr05886f>.
- [102] B. Seo, K. Lim, S.S. Kim, K.T. Oh, E.S. Lee, H.G. Choi, B.S. Shin, Y.S. Youn, Small gold nanorods-loaded hybrid albumin nanoparticles with high photothermal efficacy for tumor ablation, *Colloids surface B Biointerfaces* 179 (2019) 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.068>.
- [103] M. Kodiha, H. Mahboubi, D. Maysinger, U. Stochaj, Gold nanoparticles impinge on nucleoli and the stress response in MCF-7 breast cancer cells, *Nanobiomedicine* 3 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.5772/62337>.
- [104] M.D. Murtey, P. Ramasamy, Life science sample preparations for scanning electron microscopy, *Acta Microscopica* 30 (2021) 80–91.
- [105] A. Tudda, S. Semperboni, G. Nicolini, E. Donzelli, M. Bossi, G. Cavaletti, R. Castriconi, A. Sarno, P. Mangili, A. Vecchio, G. Mettivier, P. Russo, Breast radiotherapy with kilovoltage photons and gold nanoparticles as radiosensitizer: An in vitro study, *Medical physics*. (2022) 568–578. <https://doi.org/10.1002/mp.15348>.
- [106] A. Goldstein, Y. Soroka, M. Frušić-Zlotkin, I. Popov, R. Kohen, High resolution SEM imaging of gold nanoparticles in cells and tissues, *Journal of microscopy* 256 (2014) 237–247. <https://doi.org/10.1111/jmi.12179>.

- [107] L. Hartsuiker, P. van Es, W. Petersen, T.G. van Leeuwen, L.W.M.M. Terstappen, C. Otto, Quantitative detection of gold nanoparticles on individual, unstained cancer cells by scanning electron microscopy, *Journal of microscopy* 244 (2011) 187–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03528.x>.
- [108] S. Lu, D. Xia, G. Huang, H. Jing, Y. Wang, H. Gu, Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes, *Colloids Surface B Biointerfaces* 81 (2010) 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.019>.
- [109] S.A. Aldossary, Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin, *Biomedical and Pharmacology Journal* 12 (2019) 7–15. <https://doi.org/10.13005/bpj/1608>.
- [110] S.H. Chen, J.Y. Chang, New insights into mechanisms of cisplatin resistance: From tumor cell to microenvironment, *International journal molecules science* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20174136>.
- [111] X. Zhao, J. Pan, W. Li, W. Yang, L. Qin, Y. Pan, Gold nanoparticles enhance cisplatin delivery and potentiate chemotherapy by decompressing colorectal cancer vessels, *International journal nanomedicine* 13 (2018) 6207–6221. <https://doi.org/10.2147/IJN.S176928>.
- [112] N.E. Onmaz, D.D. Yilmaz, A. Morar, C. Gungor, Green synthesis of gold nanoflowers using *Rosmarinus officinalis* and *Helichrysum italicum* extracts : Comparative studies of their antimicrobial and antibiofilm activities, *Antibiotics* (2022), 11, 1466. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111466>
- [113] G. Zhu, G. Jing, G. Xu, Q. Li, R. Huang, F. Li, H. Li, D. Wang, W. Chen, B.Z. Tang, A green and efficient strategy facilitates continuous solar-induced steam generation based on tea-assisted synthesis of gold nanoflowers, 15 (2022) 6705–6712. <https://doi.org/10.1007/s12274-022-4269-7>
- [114] D.S. Chormey, S. Erarpat, B.T. Zaman, N. Özdoğan, O. Yağmuroğlu, S. Bakırdere, Nanoflower synthesis, characterization and analytical applications: a review, *Environmental chemistry letters* (2023). <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01572-8>.
- [115] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Analytical Chemistry Journal* 79 (2007) 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- [116] M.N. Nadagouda, G. Hoag, J. Collins, R.S. Varma, Green synthesis of Au nanostructures at room temperature using biodegradable plant surfactants, *Journal of crystal growth* 9 (2009) 4979–4983. <https://doi.org/10.1021/cg9007685>.
- [117] G.C. Bond, D.T. Thompson, Catalysis by Gold, *Catalysis review science and engineering* 41 (1999) 319–388. <https://doi.org/10.1081/CR-100101171>.

- [118] C. Jeyabharathi, P. Ahrens, U. Hasse, F. Scholz, Identification of low-index crystal planes of polycrystalline gold on the basis of electrochemical oxide layer formation, *Journal of solid-state electrochemistry* 20 (2016) 3025–3031. <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3228-1>.
- [119] P. Lertthahan, S. Yongprapat, A. Therdtianwong, S. Therdtianwong, Pt-modified Au/C catalysts for direct glycerol electro-oxidation in an alkaline medium, *International journal hydrogen energy* 42 (2017) 9202–9209. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.120>.
- [120] G. Tremiliosi-Filho, L.H. Dall’Antonia, G. Jerkiewicz, Limit to extent of formation of the quasi-two-dimensional oxide state on Au electrodes, *Journal of electroanalytical chemistry* 422 (1997) 149–159. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)04896-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)04896-6).
- [121] C. Batchelor-McAuley, Defining the onset potential, *Current opinion in Electrochemistry* 37 (2023) 101176. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2022.101176>.
- [122] L.J. Torres-Pacheco, A. De Leon-Rodriguez, L. Álvarez-Contreras, M. Guerra-Balcázar, N. Arjona, Sorbitol electro-oxidation reaction on sub<10 nm PtAu bimetallic nanoparticles, *Electrochim Acta* 353 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136593>.
- [123] H.S. Magar, R.Y.A. Hassan, A. Mulchandani, Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications, *Sensors* 21 (2021). <https://doi.org/10.3390/s21196578>.
- [124] M. Simões, S. Baranton, C. Coutanceau, Electrochemical valorisation of glycerol, *ChemSusChem* 5 (2012) 2106–2124. <https://doi.org/10.1002/cssc.201200335>.
- [125] I. Velázquez-Hernández, L. Torres-Pacheco, A. Álvarez-López, L. Álvarez-Contreras, M. Guerra-Balcázar, N. Arjona, Sustainable energy conversion of crude glycerol as biofuel employing PdBi nanomaterials, *Applied surface science* 602 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.154385>.
- [126] A. Mudalige, J.E. Pemberton, Raman spectroscopy of glycerol/D2O solutions, *Vibrational spectroscopy* 45 (2007) 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2007.04.002>.
- [127] R. Hu, T. He, Z. Zhang, Y. Yang, M. Liu, Safety analysis of edible oil products via Raman spectroscopy, *Talanta* 191 (2019) 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.074>.
- [128] Z. Liu, N. Luo, J. Shi, Y. Zhang, C. Xie, W. Zhang, H. Wang, X. He, Z. Chen, Raman spectroscopy for the discrimination and quantification of fuel blends, *Journal of raman spectroscopy* 50 (2019) 1008–1014. <https://doi.org/10.1002/jrs.5602>.
- [129] A. Woźniak, A. Malankowska, G. Nowaczyk, B.F. Grześkowiak, K. Tuśnio, R. Słomski, A. Zaleska-Medynska, S. Jurga, Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications, *Journal of materials science: Materials in medicine* 28 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y>.
- [130] D.G. Garnica Velazquez , J.E. López Meza, “Efecto antitumoral de un extracto rico en lípidos de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en un

modelo *in vivo* de melanoma murino, Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, (2023)

[131] K. Priya M R, P.R. Iyer, Antiproliferative effects on tumor cells of the synthesized gold nanoparticles against Hep2 liver cancer cell line, *Egyptian Liver Journal* 10 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s43066-020-0017-4>.

[132] M.G. González-Pedroza, L. Argueta-Figueroa, R. García-Contreras, Y. Jiménez-Martínez, E. Martínez-Martínez, S.A. Navarro-Marchal, J.A. Marchal, R.A. Morales-Luckie, H. Boulaiz, Silver nanoparticles from *Annona muricata* peel and leaf extracts as a potential potent, biocompatible and low-cost antitumor tool, *Nanomaterials* 11 (2021).
<https://doi.org/10.3390/nano11051273>.

ANEXOS

Productos obtenidos

M. Frutis-Murillo, I. Velázquez-Hernández, R. Esparza, J.E. López-Meza, N. Cayetano-Castro, and G. Rosas. Facile synthesis of gold nanoflowers and their application in glycerol electro-oxidation, *Applied Surface Science*. 2024 1 de enero; 642. doi: 10.1016/j.apsusc.2023.158628. *Factor de impacto: 6,3; Área: Química; Ciencia de los Materiales; Física y Astronomía Q1*

M. Frutis-Murillo, J.E. López-Meza, R. Esparza, N. C. Castro, and G. Rosas. Synthesis of gold nanoparticles using *Satureja macrostema* extract and their evaluation in MCF-7 cells. *Microscopy and Microanalysis*. 2023 August 1: 29. doi: 10.1093/micmic/ozad067.639. *Factor de impacto: 1,78; Área: Instrumentación; Ciencia de los Materiales Q3*

G.A. González-Martínez, L.G. García, **M. Frutis-Murillo**, P. Martínez-Torres, J.E. López-Meza, G. Rosas. Hydrothermal synthesis of carbon quantum dots from *Citrus limetta* peels: Exploration of pH sensing, non-hemolytic activity and thermoluminescent properties. *Materials Letters*. 2024 October 15; 373. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2024.137119>. *Factor de impacto: 2,7; Área: Procesamiento en Materiales. Q2*

G.A. González-Martínez, L.G. García, **M. Frutis-Murillo**, P. Martínez-Torres, J.E. López-Meza, G. Rosas. “Hydrothermal synthesis of carbon quantum dots from *Citrus reticulata* and *Eriobotrya japonica*: Characterization and photothermal evaluation” *MRS Advances*. 2024 december 19; doi: <https://doi.org/10.1557/s43580-024-01077-8>. *Factor de impacto: 0,8; Área: Investigación de materiales. Q3*

F. Mares-Briones, **M. Frutis-Murillo**, J.L. López-Miranda, J.E. López-Meza, G. Rosas, M. Estevez, R. Esparza. “Effect of *Sargassum*-mediated synthesis on hemolytic activity of Au nanoparticles” *MRS Advances*. 2024 diciembre. <https://doi.org/10.1557/s43580-024-01043-4>. *Factor de impacto: 0,8; Área: Investigación de materiales. Q3*

Participación en congresos

Fecha (DD/MM/A)	Nombre y lugar de la conferencia	Autores	Tipo (oral/poster etc.)
(20-25/10/2024)	Synthesis of gold nanoparticles using a lipid-rich extract from Mexican avocado seed and evaluation of its cytotoxicity on murine melanoma cells. XXXIV Congreso nacional de bioquímica. Mazatlán, México.	<u>Minerva Frutis- Murillo</u> , Alejandra Ochoa-Zarzosa, G. Rosas y Joel. E. López-Meza	oral
(18-23 /08/2024)	Synthesis of gold nanoparticles with mexican avocado extract <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> and their evaluation in B16F0 cells. 32nd International Materials Research Congress. Cancún, Mexico	<u>Minerva Frutis Murillo</u> , Fabián Mares Briones, Rodrigo Alonso Esparza Muñoz, Joel Edmundo López Meza, Gerardo Antonio Rosas Trejo	oral
(23-27/07/2023)	Synthesis of gold nanoparticles using <i>Satureja macrostema</i> extract and their evaluation in MCF-7 cells. Microscopy & Microanalysis, Minneapolis, EUA.	<u>Minerva Frutis Murillo</u> , Joel E. López-Meza, R. Esparza, Nicolás Cayetano Castro, G. Rosas.	oral
(13-18/08/2023)	Synthesis of gold nanoparticles using <i>Satureja macrostema</i> extract and its evaluation against <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm. 31st International Materials Research Congress Cancun, Mexico.	<u>Minerva Frutis Murillo</u> , Joel Edmundo López Meza, Nicolás Cayetano Castro, Rodrigo Alonso Esparza Muñoz, Gerardo Antonio Rosas Trejo	oral

Estancias de investigación

Fecha (MM/A – MM/A)	Institución	Supervisor	Resultados y publicaciones
<i>(01/2023- 05/2023)</i>	<i>CFATA-UNAM</i>	<i>Dr. Rodrigo Alonso Esparza Muñoz</i>	<i>Publicación: Facile synthesis of gold nanoflowers and their application in glycerol electro-oxidation, Applied Surface Science.</i>
<i>(01/2024- 07/2024)</i>	<i>CMEB-UMSNH</i>	<i>Dr. Gerardo Vazquez Marrufo</i>	

Actividades de comunicación científica

Taller: La conquista bacteriana: un peligro de presente y de futuro Participación: Responsable de la 32° Tianguis Científico, realizado en Ciudad Universitaria. 19 y 20 de abril de 2024.

Conferencia magistral: Síntesis de nanopartículas de oro con extracto de Satureja macrostema para aplicaciones biomédicas. XXX Evento de Investigación en Tecnología de Alimentos e Ingeniería Ambiental y 14to. Oxigena tus ideas semana. 29 de noviembre de 2023.

Otras actividades

Miembro del comité editorial de la revista de divulgación científica "Sin contraseñas", (ISSN:2992-8102), enero-abril 2025

Coordinadora de visitas en el “Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología” la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo (2024-2025)

Coordinadora de taller “La conquista bacteriana: un peligro para el presente y el futuro, 32 Tianguis de la ciencia en Ciudad Universitaria.

Minerva Frutis Murillo

Síntesis biogénica de nanoestructuras de Au para su aplicación electroquímica y en las líneas celula

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:445825144

Fecha de entrega

4 abr 2025, 11:47 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

4 abr 2025, 11:50 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Síntesis biogénica de nanoestructuras de Au para su aplicación electroquímica y en las líneas cel....pdf

Tamaño de archivo

4.6 MB

84 Páginas

26.001 Palabras

149.258 Caracteres

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Doctorado en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales	
Título del trabajo	"Síntesis biogénica de nanoestructuras de Au para su aplicación electroquímica y en las líneas celulares MCF-7 y B16F0 de melanoma murino"	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Minerva Frutis Murillo	15005595k@umich.mx
Director	Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo	grtrejo@umich.mx
Codirector	Dr. Joel Edmundo López Meza	elmeza@umich.mx
Coordinador del programa	Dr. Jorge Alejandro Verduzco Martínez	Jorge.verduzco@umich.mx

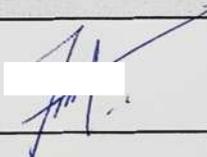
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	no	No hice uso de IA

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	No	
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Minerva Frutis Murillo 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán 4 abril de 2025