



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE *Annona cherimola* Mill Y SU  
USO EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA EVALUAR SU POSIBLE ACTIVIDAD  
ANTITUMORAL.

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
M. en C. RICARDO AGUILAR VILLALVA

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MIRIAM ROCÍO ESTÉVEZ GONZÁLEZ  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. HÉCTOR PAUL REYES POOL  
Universidad Autónoma de Querétaro

DR. ÁNGEL RAMÓN HERNÁNDEZ MARTÍNEZ  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

Santiago de Querétaro, Querétaro. Enero 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

A CONACYT, por el apoyo brindado en la beca nacional otorgada para el desarrollo de mi doctorado, dentro del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales.

Al CFATA, por abrirme las puertas de la institución y permitirme el uso de sus instalaciones en la realización de mi investigación.

Al IIM y la UNAM, por la oportunidad de formar parte de una institución con tan alto renombre y concluir una etapa tan importante de mi preparación académica.

A mi asesora, la Dra. Miriam Rocío Estévez González, por todos sus consejos, enseñanzas y guía para llevar a buen puerto este proyecto.

A los miembros de mi comité, el Dr. Ángel Ramón Hernández Martínez y el Dr Héctor Paul Reyes Pool, por atender a mis dudas y ayudarme con su experiencia.

A todo el personal de CFATA por la ayuda brindada a pesar de las dificultades enfrentadas en los últimos años. Particularmente al M. en I. Gerardo Antonio Fonseca por su apoyo técnico en la espectroscopia infrarroja. Al Lic. Guillermo Vázquez, por la asesoría en el procesamiento de datos y al Laboratorio Nacional de Caracterización en Materiales (LaNCaM) por su apoyo en el resto de caracterizaciones.

A la Dra. Cristy Leonor Azanza, por su apoyo en la simulación e interpretación de datos.

A los miembros del jurado, la Dra. Beatriz Liliana España Sánchez, la Dra. Georgina Carbajal de la Torre, el Dr. Juan Francisco Pérez Robles y el Dr. Rodrigo Alonso Esparza Muñoz, por su atención y acertados comentarios hacia esta investigación.

## Dedicatoria

A mi esposa, por todo el cariño y apoyo en estos años. Por cada palabra de aliento cuando todo se siente complicado. Por estar conmigo siempre, a ti Ana Izchel.

A mis padres, por todo su apoyo a pesar de la distancia y del tiempo. Siempre en mi corazón.

A mis hermanos, mis primeros amigos. Siempre puedo contar con ellos.

# Contenido

Agradecimientos .....	II
Dedicatoria .....	III
Tabla de Figuras .....	VII
Tablas .....	IX
Resumen .....	X
Introducción .....	XII
Hipótesis.....	XIII
Justificación.....	XIII
Antecedentes .....	XVI
Objetivos .....	XXV
Objetivo General .....	XXV
Objetivos Específicos .....	XXV
Estructura del documento .....	1
Capítulo 1.- Marco Teórico .....	2
1.1    Cáncer.....	2
1.1.1    Cáncer Hepático.....	3
1.1.2    Tratamientos Actuales .....	5
1.2    Extractos Naturales .....	6
1.2.1    Familia <i>Annonaceae</i> .....	6
1.2.2    Metabolitos Secundarios .....	9
1.2.3    Métodos de extracción .....	10
1.2.4    Propiedades de los extractos.....	15
1.3    Nanopartículas .....	17

1.3.1	Naturaleza y Propiedades .....	18
1.3.2	Nanopartículas metálicas.....	20
1.3.3	Efecto tóxico de las nanopartículas .....	24
1.4	Métodos de Síntesis .....	26
1.4.1	Síntesis Verde.....	26
Capítulo 2.- Materiales y metodología .....		28
2.1	Extractos.....	28
2.1.1	Métodos de extracción .....	28
2.1.2	Secado.....	32
2.1.3	Análisis espectroscópico de los extractos de las especies de <i>Annonaceae</i> (FT-IR y UV-Vis) 32	
2.1.4	Capacidad antioxidante .....	34
2.1.5	Determinación del Contenido Total de Fenoles (TPC) y el Contenido Total de Flavonoides (TFC).....	36
2.1.6	Análisis electroquímico del contenido total fenólico (e-TPC) y el contenido total de flavonoides (e-TFC) .....	38
2.1.7	Determinación de la presencia de acetogeninas (HPLC) .....	39
2.2	Nanopartículas metálicas.....	40
2.2.1	Síntesis .....	40
2.3	Caracterización.....	42
2.3.1	Caracterización Composicional.....	42
2.3.2	Caracterización estructural.....	44
2.4	Actividad antitumoral.....	48
2.5	Actividad antibacterial de los extractos etanólicos de <i>Annona cherimola</i> Miller .....	48
Capítulo 3.- Resultados .....		50

3.1	Extractos.....	50
3.1.1	Métodos de extracción .....	50
3.1.2	Análisis espectroscópico de los extractos de <i>Annona cherimola</i> Mill (FT-IR y UV-Vis) .....	53
3.1.3	Capacidad antioxidante .....	61
3.1.4	Determinación del Contenido Total de Fenoles (TPC) y el Contenido Total de Flavonoides (TFC).....	63
3.1.5	Análisis electroquímico del contenido total fenólico (e-TPC) y el contenido total de flavonoides (e-TFC) .....	64
3.1.6	Determinación de la presencia de acetogeninas en las extracciones (HPLC) .....	65
3.2	Nanopartículas metálicas.....	67
3.2.1	Síntesis .....	67
3.3	Caracterización.....	72
3.3.1	Caracterización composicional .....	72
3.3.2	Caracterización estructural.....	75
3.4	Actividad antitumoral.....	87
3.4.1	Viabilidad celular.....	87
3.5	Actividad antibacterial de extractos etanólicos de <i>Annona cherimola</i> Mill. ....	89
Capítulo 4.- Conclusiones.....		92
	Perspectivas a futuro .....	94
Referencias.....		96

## Tabla de Figuras

Figura 1.- Orígenes estudiados del carcinoma hepatocelular, donde se observa el progreso de la enfermedad (Nava, 2017).....	4
Figura 2.- Fotografía de la fruta y las hojas de la guanábana.....	7
Figura 3.- Fotografía de la fruta y las hojas de la chirimoya.....	8
Figura 4.- Estructura general de las acetogeninas.....	10
Figura 5.- Equipo de Soxhlet armado, uno de los métodos más empleados para la extracción de compuestos (Química, 2021).....	12
Figura 6.- Distintas configuraciones de la UAE, cada una presenta diferentes rendimientos y puede ser empleada en distintas condiciones (Azuola & Vargas, 2007).....	14
Figura 7.- Proceso de maceración en frío (ejemplos) (Puente, 2009).....	15
Figura 8.- Posibles estructuras, tamaños y formas de las nanopartículas (Nagwa, 2021).....	19
Figura 9.- Equipo empleado para las pruebas FT-IR.....	32
Figura 10.- Equipo empleado para las pruebas UV-Vis.....	33
Figura 11.- Rendimientos de las extracciones realizadas por UAE con a) etanol y b) agua.....	51
Figura 12.- Rendimientos de las diferentes técnicas de extracción.....	52
Figura 13.- Resultados de las pruebas realizadas por FT-IR. a) Espectros experimentales, b) Simulación de la señal de las acetogeninas más representativas de la guanábana y la chirimoya, c) Estructura optimizada de la bullatacina, d) Estructura optimizada de la aromina.....	54
Figura 14.- a) Espectro experimental obtenido por UV-Vis, b) Señal teórica obtenida de la acetogenina aromina.....	58
Figura 15.- Absorbancia de UV-Vis presentada por los extractos en distintos tiempos. a) 5 minutos, b) 10 minutos, c) 15 minutos.....	60
Figura 16.- Absorbancia UV-Vis de cada una de las técnicas de extracción analizadas: a) Maceración, b) Soxhlet, c) UAE.....	60
Figura 17.- Cromatogramas obtenidos de los extractos acuosos y etanólicos de las técnicas de Soxhlet (a) y b)).....	66
Figura 18.- Señales UV-Vis del plasmón de resonancia de las diferentes relaciones Sal:Extracto.....	68

Figura 19.- Espectros de la síntesis con relación sal:extracto 2:1 previo al lavado (izquierda) y posterior al lavado (derecha).....	69
Figura 20.- Espectros de la modificación de pH. Extracto acuoso (izquierda), extracto etanólico (derecha).....	70
Figura 21.- Comparación de la señal del plasmón de resonancia de las partículas obtenidas sin modificar el pH (negro) y de las modificadas (rojo). .....	71
Figura 22.- Señal de infrarrojo de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico.....	73
Figura 23.- Señal de infrarrojo de las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso .....	74
Figura 24.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso. a) Señal SE(L) b) Señal de BF+SE(L) . Magnificación de x50, escala de 1 $\mu$ m .....	75
Figura 25.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso. a) Señal SE(U) b) Señal de BF+SE(L) . Magnificación de x200, escala de 200 nm .....	76
Figura 26.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico. a) Señal SE(U) b) Señal de SE(U)+SE(L) . Magnificación de x50, escala de 1 $\mu$ m.....	77
Figura 27.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico. a) Señal SE(L). b) Señal de SE(U)+SE(L) . Magnificación de x200, escala de 200 nm.....	77
Figura 28.- Distribuciones de tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Extracto acuoso (izquierda), extracto etanólico (derecha). .....	78
Figura 29.- Distribución de tamaños de la síntesis realizada con pH modificado .....	79
Figura 30.- Señal obtenida del análisis térmico de las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso. DSC (superior) y TGA (inferior) .....	81
Figura 31.- Señal obtenida del análisis térmico de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico. DSC (superior) y TGA (inferior) .....	82
Figura 32.- Potencial Zeta de las AuNP en distintos pH.....	83
Figura 33.- Potencial Zeta de las nanopartículas con modificación de pH durante la síntesis ....	84
Figura 34.- Señal obtenida en la prueba de DRX para las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso .....	85
Figura 35.- Señal obtenida en la prueba de DRX para las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso .....	86

Figura 36.- Resultados de la prueba MTT del extracto puro (izquierda) y las nanopartículas de oro (derecha) .....	89
Figura 37.- Porcentajes de la actividad antibacterial de los extractos acuosos de la chirimoya empleando diferentes métodos de extracción. a) Maceración, b) Soxhlet, c) UAE 5 min 50%, d) UAE 5 min 100%.....	90

## Tablas

Tabla 1.- Condiciones empleadas para realizar las extracciones de las especies de Annonaceae. ....	29
Tabla 2.- Condiciones empleadas para la realización de las curvas de calibración de cada técnica, así como los parámetros obtenidos a partir del ajuste lineal de las mismas. ....	36
Tabla 3.- Parámetros obtenidos por el ajuste lineal a la curva de calibración de TPC y TFC y condiciones usadas en la medición de la absorbancia. ....	37
Tabla 4.- Relación H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :Extracto de las muestras realizadas por síntesis verde. ....	41
Tabla 5.- Muestras modificadas por solución de NaOH con distintos pH. ....	42
Tabla 6.- Vibraciones teóricas obtenidas de la Aromina y la Bullatacina .....	55
Tabla 7.- Resultados de las pruebas realizadas de capacidad antioxidante.....	61
Tabla 8.- Resultados de las pruebas de contenido fenólico y flavonoides.....	63
Tabla 9.- Resultados de viabilidad celular obtenida de la prueba MTT para los extractos acuosos de Chirimoya. ....	88
Tabla 10.- Resultados de viabilidad celular obtenida de la prueba MTT para las nanopartículas de oro obtenidas con el extracto acuoso. ....	88

## Resumen

El cáncer hepático es un problema de salud a nivel mundial, con un difícil diagnóstico y, aún más complicado, un tratamiento efectivo. Esta es la principal motivación para realizar el presente proyecto, donde se estudia una planta como la *Annona cherimola* Mill, debido a su potencial uso en tratamientos antitumorales, de acuerdo a lo ya reportado para otras plantas de la misma familia.

Los extractos se realizaron con distintas técnicas de extracción y diferentes solventes; las técnicas empleadas fueron maceración en frío, extracción por Soxhlet y extracción por ultrasonido asistido (UAE). Los solventes empleados fueron etanol y agua. Se observaron mejores rendimientos en el caso de los extractos por Soxhlet, pero con UAE el tiempo se reduce en más del 99%, por lo tanto, la UAE se considera como la mejor opción, ya que también presentan una mejor actividad antibacterial; esto último puede contribuir a la actividad antitumoral, ya que existen algunas bacterias a las que se les ha atribuido potencial cancerígeno. Es importante destacar que, dentro de los extractos, se pudo demostrar la presencia de acetogeninas gracias a la técnica de HPLC. Sin embargo, para la determinación exacta de las acetogeninas encontradas es necesario emplear otras técnicas más especializadas.

El uso de estos extractos permitió realizar una síntesis verde de nanopartículas de oro, de tal forma que estas partículas puedan emplearse a futuro dentro de tratamientos y aplicaciones contra el cáncer hepático. Esta síntesis se llevó a cabo empleando la reducción de una sal de oro, de tal forma que se obtuvieron nanopartículas de distintas morfologías y tamaños, de acuerdo al extracto empleado en la síntesis.

Las nanopartículas de oro se caracterizaron empleando técnicas espectroscópicas (UV-Vis, FTIR) para conocer su composición. Se obtuvo presencia del plasmón característico en la señal UV-Vis, mientras que en FTIR fue posible observar presencia de compuestos orgánicos. Para conocer la morfología, se utilizó la microscopía electrónica de barrido, notando geometrías de decaedros y tetraedros, principalmente. Por su parte, la estructura cristalina se obtuvo usando la Difracción de Rayos X, teniendo una estructura cúbica centrada en las caras, que es la estructura más frecuente en este tipo de partículas. Se logró una estabilidad adecuada en las

partículas al estar en un pH neutro de 7, mientras que los tamaños varían de acuerdo al extracto empleado; estos resultados se obtuvieron empleando el potencial Zeta y DLS respectivamente. Finalmente, se realizaron pruebas preliminares de la actividad antitumoral de las nanopartículas de oro, usando como células no tumorales fibroblastos IMR-90, células tumorales de cáncer hepático HepG2 y células epiteliales humanas de cáncer de mama MCF-7. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de lograr una mayor efectividad en la muerte celular de las células tumorales y una mayor selectividad hacia las mismas. No obstante, se requieren más estudios del comportamiento biológico, previo a considerarlos como un tratamiento viable.

## Introducción

La ciencia e ingeniería de materiales ha enfocado sus esfuerzos, en los últimos años, en obtener nuevos materiales que contribuyan a resolver problemas de índole tecnológico, ambiental y de salud humana. Una de las principales herramientas, que en años recientes se ha aprovechado, es el impulso de la nanotecnología. A partir del desarrollo de esta ciencia se han obtenido nuevos materiales, con características que les permiten ser partícipes en la solución de problemáticas actuales. Los nanotubos de carbono o las nanopartículas de metales preciosos como el oro, platino o paladio, han generado gran revuelo en distintas áreas, ya que sus propiedades abren la posibilidad de emplearles en la mejora de sistemas de almacenamiento, así como en mejoras en catálisis, sistemas de filtrado, o tratamientos y terapias médicas novedosas, como la liberación controlada de fármacos en zonas específicas del cuerpo humano (Mazari et al., 2021). Cabe destacar que estos son solo algunos ejemplos de los nuevos materiales y problemáticas que se atienden actualmente; el desarrollo de equipos que permiten el estudio de materia a escala nanométrica ha abierto un sinfín de nuevas aplicaciones y posibilidades a materiales que parecían estar estudiados por completo. Es, por lo tanto, el quehacer de aquellos que se dedican al estudio de los materiales, contribuir con la materia prima adecuada para los desarrolladores de equipos y/o tratamientos más avanzados que puedan presentar soluciones reales a dichas problemáticas.

En el posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales se busca alimentar la curiosidad y creatividad de los nuevos investigadores para el desarrollo de estas materias primas. Es por esto que, en el presente proyecto, el interés se concentra en el estudio de extractos naturales y su uso en la obtención de nanopartículas de oro con una determinada actividad biológica. Los extractos naturales de distintas plantas, presentan propiedades que permiten la obtención de nanopartículas metálicas, estas se obtienen a través de una ruta que disminuye el impacto ambiental y tiene una reducción de costos. El método de obtención y la planta seleccionada, puede potencializar propiedades ya estudiadas de estas nanopartículas. De manera específica, se desea una mejora en las propiedades antitumorales. Es por esto que se plantea la hipótesis que se muestra a continuación.

## Hipótesis

Los extractos obtenidos por medio de distintas técnicas de extracción de la *Annona cherimola* Mill se pueden emplear como agentes antibacteriales y como precursores en la síntesis de nanopartículas metálicas con actividad antitumoral.

## Justificación

Existen múltiples enfermedades crónico degenerativas no transmisibles. Estas enfermedades, como su nombre lo indica, no son contagiosas, pero son degenerativas y progresivas. Entre ellas se encuentran padecimientos como la diabetes, enfermedades cardiacas y el cáncer. Los metabolitos secundarios reportados en la familia *Annonaceae* han mostrado comportamientos promisorios para ser empleados como futuros tratamientos o auxiliares de los ya existentes. Uno de los padecimientos que presenta un mayor interés es el cáncer, en particular el cáncer hepático, debido a la existencia de un grupo de metabolitos conocidos como acetogeninas, con un alto potencial antitumoral y que son característicos de esta familia de plantas.

El cáncer es el nombre que reciben múltiples enfermedades que se relacionan por sus características, particularmente en la reproducción descontrolada de algún tipo de célula, así como en la inexistencia de la etapa de muerte celular. El cáncer se considera una enfermedad genética que es provocada por múltiples factores, tanto genéticos como ambientales (National Cancer Institute, 2015). A su vez, el cáncer hepático se caracteriza por ser un cáncer que incide en el hígado, teniendo diferentes clasificaciones y siendo uno de los que tienen mayor mortalidad a nivel mundial (National Institutes of Health, 2018).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Sheng et al., 2015), en el 2008 el cáncer hepático se ubicaba como el tercero en mortalidad a nivel mundial. Actualmente se considera como el segundo de mayor mortalidad, y el subtipo más común es aquel que se conoce como Carcinoma Hepatocelular (HCC por sus siglas en inglés) (Ukawa et al., 2017)(Li & Wang, 2016). Este tipo de cáncer es uno de los más complicados de diagnosticar, por lo que en la mayoría de las ocasiones, cuando se logra el diagnóstico la enfermedad ya se encuentra en etapas avanzadas, esto reduce las posibilidades de supervivencia del paciente, debido a que

uno de los tratamientos más efectivos que existen actualmente es la resección por cirugía, pero no es posible realizarla en etapas avanzadas de la enfermedad (K. Chen et al., 2016). Otro problema con el cáncer hepático es que el nivel de supervivencia es muy bajo, siendo solo del 3 al 5% después de los primeros 5 años a partir de que se realiza el diagnóstico, y un porcentaje de reincidencia, cuando se tiene éxito bajo algún tratamiento, del 30% dentro de los primeros 6 meses, aumentando conforme avanza el tiempo (Cheng, Li, & Ding, 2016; Sheng et al., 2015).

Este bajo porcentaje de éxito de los tratamientos tradicionales se atribuye a la alta heterogeneidad del cáncer hepático, al igual que la resistencia a los quimioterapéuticos, sustancias que incluso, cuando se dan tratamientos en etapa avanzada, generan una alta cifra de muertes en lugar de funcionar para reducir la mortalidad (Li & Wang, 2016).

Particularmente en México, se presenta un problema general en la atención al cáncer, sin importar el tipo u origen del mismo, ya que de acuerdo con el informe realizado por The Economist Intelligence Unit, México reprueba en la atención a esta enfermedad ya que, de los 30 puntos posibles, dados a partir de diferentes indicadores, el país solo obtiene 17. Uno de los problemas que se contemplan en la mejora de estos índices, es la poca inversión en salud, ya que en la región de Latinoamérica se da una inversión del 4.6% del Producto Interno Bruto (PIB) mientras que en México es solo del 3.3%; esto provoca que no se tengan suficientes equipos de radioterapia o que no se cuente con suficientes medicamentos (Periódico Correo, 2018). Esto, sumado a los altos costos de los tratamientos, dan como resultado una pobre atención a esta mortal enfermedad.

Durante años, se han estudiado los extractos naturales en búsqueda de compuestos que presenten características que les permitan actuar como tratamientos a distintos padecimientos; entre estos compuestos se destacan los compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides y, en el caso de las *Annonaceae*, las acetogeninas. Estas últimas, como se menciona anteriormente, presentan un alto potencial antitumoral, sin embargo, han mostrado también cierto potencial neurodegenerativo. Debido a esto, es preciso estudiar con cuidado si realmente las acetogeninas pueden funcionar como un posible auxiliar para el tratamiento de cáncer, lo que podría ayudar a aumentar el índice de supervivencia, reducir el número de quimioterapias o

bien a disminuir el costo de los tratamientos, ya que la *Annona cherimola* es una planta común en México. Aunado a esto, el potencial antioxidante de los extractos que se han estudiado de la familia *Annonaceae* ofrece la posibilidad de emplear dichos extractos en diversas aplicaciones, como la síntesis verde de nanopartículas metálicas gracias a su capacidad reductora, o bien, en aplicaciones alimentarias. Estas nanopartículas, al ser obtenidas empleando los aceites esenciales de la *Annona cherimola*, pueden presentar parte de las propiedades de los metabolitos secundarios de esta especie, ya que los extractos no solo funcionan como agentes reductores sino como estabilizadores de las nanopartículas.

Los extractos naturales que presentan alta capacidad antioxidante se pueden evaluar para su uso como precursores en la síntesis de nanopartículas metálicas; en este caso la Ciencia e Ingeniería de Materiales puede influir de manera directa en la efectividad de la síntesis, potencializar ciertas características que se deseen, así como aprovechar al máximo las características naturales de los compuestos presentes en los extractos naturales.

## Antecedentes

La medicina, desde sus orígenes, ha estado vinculada al uso de compuestos que provienen de distintos seres vivos: plantas, animales o microorganismos. Los metabolitos secundarios son diferentes grupos de moléculas que están presentes en algunas plantas y no se consideran primordiales para la nutrición de las mismas, pero debido a sus características permiten enfrentar distintos padecimientos en el ser humano, gracias a sus efectos antioxidantes, antitumorales, antifúngicos, antibacteriales, entre otros. Dentro de estos metabolitos se encuentran las denominadas acetogeninas, que pertenecen exclusivamente a la familia *Annonaceae* y que, desde su primer descubrimiento en el año 1982, se han encontrado alrededor de 430 compuestos naturales que pertenecen a este grupo, teniendo entonces una gran variedad de acetogeninas disponibles, cada una con diferentes propiedades (Schlie-Guzmán, González-Esquinca, & Luna-Cazáres, 2009).

A partir de que fueron descubiertas, las acetogeninas se han estudiado para comprobar sus efectos terapéuticos, obteniendo como resultados efectos antiparasitarios, insecticidas, antimicrobianos, antifúngicos y antitumorales. En particular, el efecto antitumoral mostrado por las acetogeninas es alto y efectivo contra diferentes tipos de cáncer, incluyendo líneas celulares de cáncer de mama, de pulmón, hígado, entre otros. De acuerdo con los estudios realizados, se plantea que el mecanismo mediante el cual las acetogeninas inducen la muerte celular es una inhibición en el complejo I mitocondrial, el cual juega un papel importante en la síntesis de ATP (trifosfato de adenosina), que es la energía química requerida por cualquier tipo de célula para sobrevivir; por su parte las células cancerígenas requieren de un alto nivel de energía por lo que, al bloquearse dicho mecanismo, se produce la muerte de las mismas. A este hecho se atribuye, por algunos investigadores, la selectividad que han mostrado las acetogeninas (Schlie-Guzmán et al., 2009).

Debido a la alta variedad de acetogeninas existentes, se han realizado estudios para determinar cuáles son las que presentan una mayor potencia antitumoral. Debido a esto, en el año 2001, Tormo y sus colaboradores desarrollaron un estudio para determinar si las acetogeninas sintéticas funcionalizadas con una lactona eran las más potentes en la inhibición del complejo I

mitocondrial. Ellos desarrollaron acetogeninas semisintéticas y las compararon con las acetogeninas naturales; con esto encontraron que la mayor potencia de inhibición se da cuando se encuentra un grupo hidroxilo ubicado en la lactona terminal saturada, especialmente si se encontraba a la distancia adecuada de los anillos tetrahidrofuránicos (THF), mostrando que los compuestos derivados tenían una mayor potencia que los compuestos naturales (Tormo et al., 2001).

Para el 2006 el grupo de Quispe se concentró en la acetogenina muricin H, presente en la *Annona muricata* o guanábana, para determinar su actividad citotóxica selectiva en la línea celular H460, que corresponde a cáncer pulmonar. Notaron que tanto en dosis pequeñas de 0.06 µg/mL como en dosis más altas de hasta 62.5 µg/mL el porcentaje de células tumorales que crecían en presencia de la muricin H, era menor en comparación a las que crecían en presencia del 5 fluorouracilo (5-FU); de igual forma la citotoxicidad presentada por la muricin H es menor a bajas concentraciones, pero se dispara cuando se llega a la concentración más alta hasta igualar o incluso superar la citotoxicidad presentada por el 5-FU. De tal forma que las acetogeninas presentes en la *Annona muricata*, representadas en este caso por la muricin H, presentan excelente actividad antitumoral, no solo en un tipo de células, ya que se ha probado con éxito en células hepáticas, pancreáticas, prostáticas, mamarias y pulmonares (Quispe, Zavala, Rojas, Posso, & Vaisberg, 2006).

En el año 2014 Gavamukulya y sus colaboradores reportaron un estudio sobre la actividad antioxidante de los extractos de agua y etanol de hojas de *Annona muricata*, así como su potencial antitumoral, para esto utilizaron el método de homogeneización de tejido, dejando hojas secas dentro de agua y etanol por separado, esto les permitió comprobar los rendimientos de extracción de los solventes. Reportaron los distintos metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Annona muricata* como son alcaloides, terpenoides, flavonoides, fenoles, entre otros. Algo de llamar la atención es que no hacen referencia a las acetogeninas presentes en las hojas y que han sido ampliamente estudiadas. Sus resultados arrojaron que ambos extractos presentaban un potencial alto antioxidante, pero solo el extracto con etanol era capaz de generar una acción antitumoral in vitro (Gavamukulya, Abou-Ellella, Wamunyokoli, & AEI-Shemy, 2014).

En el año 2015 Qayed y sus colaboradores realizaron una revisión sobre las distintas aplicaciones que tienen los productos naturales al ser utilizados como precursores de nuevas drogas, dando a notar que su mayor avance ha sido en el campo de la oncología, siendo las acetogeninas una promesa para la creación de nuevos métodos terapéuticos. Dentro de su investigación se hace un recuento sobre la selectividad en la citotoxicidad de algunas acetogeninas con ciertos tipos de células tumorales, por ejemplo, la bullatacin presenta un mayor efecto con la célula A2780 de tumor ovárico. Sin embargo, a pesar de los avances en la investigación del uso de acetogeninas como agentes antitumorales se presenta un riesgo tóxico, debido a que tienden a presentar efectos negativos sobre las neuronas, variando la concentración necesaria para inducir este efecto de acuerdo con la acetogenina que se utiliza. (Qayed, Aboraia, Abdel-Rahman, & Youssef, 2015)

Es durante el 2016 que Liu y su equipo muestran, mediante un análisis proteómico funcional, que los extractos con etanol de la *Annona muricata* provocan apoptosis celular, proceso importante para considerar que una molécula tiene un buen funcionamiento antitumoral. Para demostrar dicho proceso utilizaron la línea celular HepG2, células hepáticas cancerígenas bien diferenciadas. Se usó el ensayo MTT (reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para comprobar la viabilidad celular y citometría de flujo y el ensayo TUNEL (Etiquetado de extremos con muescas de dUTP-biotina mediado por TDT, TUNEL por las siglas en inglés) para confirmar que el proceso de muerte celular fuera apoptosis. Dentro de sus resultados verificaron que las células sufrían apoptosis a través de la ruta de estrés ER (retículo endoplasmático), por lo tanto, se confirma que existe la posibilidad de emplear el extracto de *Annona muricata* con etanol como auxiliar terapéutico en cáncer hepático, posterior a un mayor número de pruebas. (Liu et al., 2016)

Gavamukulya y su equipo realizaron también una revisión sobre la *Annona muricata* y sus posibles aplicaciones médicas en el año 2017; en dicho trabajo se revisan las características, componentes y actividades que presenta dicha planta. Se hace una recopilación de los distintos estudios toxicológicos realizados para la guanábana. Concluyen que los estudios realizados hasta el momento apoyan la idea de que la *Annona muricata* es una opción viable para distintos tratamientos, tal y como se emplea en la medicina tradicional. Sin embargo, aún no se ha

descubierto todo sobre esta especie; a pesar de tener identificados hasta el momento alrededor de 200 fitoquímicos, se piensa que aún no son todos los que esta planta contiene. Las acetogeninas, en particular, han mostrado neurotoxicidad lo cual es un inconveniente y debe ser revisado a profundidad antes de la aplicación final de estos compuestos. (Gavamukulya, Wamunyokoli, & El-Shemy, 2017)

También durante el 2017, Sun y su equipo encontraron cinco nuevas acetogeninas contenidas en la *Annona muricata*. Tres de estas totalmente nuevas, una que ya había sido identificada, pero de la cual no existían datos espectrales registrados y una conocida mono-THF (Annonacin). Una vez que evaluaron su capacidad antitumoral se pudo observar que existe una relación entre la estructura y su actividad, que no solo se modifica con la cantidad de grupos hidroxilo, sino que también depende de la posición que estos grupos ocupan. La annonacin es la acetogenina presente en la guanábana con mayor actividad antitumoral (Sun et al., 2017).

A finales del 2017 Agu y su equipo realizaron pruebas de la capacidad anticancerígena de los extractos de la *Annona Muricata*. Para esto hicieron una extracción por maceración con metanol a temperatura ambiente y se fraccionaron los extractos por cromatografía líquida al vacío utilizando como solventes hexano, acetato de etilo, metanol y agua en diferentes concentraciones. Los resultados muestran que, para células de cáncer de mama, el extracto de las hojas y la fruta con metanol tienen un mejor rendimiento en la inhibición celular, las cuatro fracciones hechas con los solventes también presentan un buen rendimiento. De acuerdo con el ensayo MTS (Método modificado de MTT), la fracción del extracto de la fruta con etil acetato es mejor que la fracción de las hojas con etil acetato. El estudio muestra algunas de las posibles rutas que las acetogeninas provocan en la células para su muerte por apoptosis (Agu, Okolie, Falodun, & Engel-Lutz, 2017).

Moraes y su equipo publicaron un estudio donde utilizan ultra y nanofiltración para una mayor concentración de los extractos hidroalcohólicos de la *Annona Muricata* en el 2018. Su primera observación fue que tenían una mayor cantidad de proteínas y lípidos al tener 70% de etanol, mientras que al disminuir al 50% de etanol la cantidad de carbohidratos aumentaba. La nanofiltración retiene una mayor cantidad de compuestos bioactivos, sin embargo su consumo

energético es de más del doble, mientras que la diferencia en retención no es mayor al 20% (Moraes, Rabelo, Pereira, Hubinger, & Schmidt, 2018).

Como se observa, con la información antes presentada, las acetogeninas existentes en las *Annonaceae* presentan un efecto antitumoral importante por lo que es posible utilizar extractos de estas plantas para aplicaciones relacionadas al tratamiento de cáncer. Una de estas aplicaciones es la síntesis de nanopartículas metálicas, este tipo de síntesis se conoce como síntesis verde; en estas síntesis se aprovechan las características reductoras de extractos naturales para obtener partículas metálicas, donde el extracto actúa también como un estabilizador y en ocasiones como potenciador de las propiedades ya conocidas de algunas partículas, como la actividad antibacterial o antitumoral.

En el año 2014 Varadharaj y colaboradores realizaron una síntesis verde de nanopartículas de plata para evaluar su actividad antibacterial, empleando extractos acuosos de *Annona Squamosa*. Para la síntesis emplearon  $\text{AgNO}_3$  (1mM) como precursor de la plata, mezclando en relación 1:125 v:v, a temperatura ambiente. En este caso observaron un cambio de coloración de la solución de manera casi inmediata, obteniendo un color café rojizo. En la evaluación de actividad antibacterial se realizaron pruebas sobre tres bacterias diferentes (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*) y se notó una actividad mayor de las nanopartículas de plata obtenidas con los extractos acuosos, en comparación a la actividad mostrada por las Np de plata comerciales o el extracto por sí solo. La actividad fue similar a la mostrada por el antibiótico ciprofloxacino que emplearon como control en la síntesis (Varadharaj, Christina, Ganesan, & Murthy, 2014).

Por otra parte, en el 2014 Jin Zhu y colaboradores desarrollaron una investigación sobre la influencia del pH de una solución coloidal respecto a la capacidad de absorción del espectro para aplicaciones de sensores. Se sintetizaron las partículas por reducción de citrato, y se emplearon soluciones con pH de 3.5 a 7 para pH ácido y mayores a 10 para pH básico. Ellos encontraron que la estabilidad de la solución aumentaba en pH ácido debido a que el valor del pH podía afectar a la afinidad de los enlaces entre las partículas y los grupos funcionales, por lo tanto, esto modificaba la repulsión electrostática entre las partículas de oro. También

identifican que la intensidad de absorción aumenta cuando el tamaño de la partícula disminuye, esto se atribuye a que, cuando se incrementa el tamaño, se disminuye el área superficial que es capaz de realizar la absorción, por lo tanto a mayores tamaños la absorción de señal es menor (Zhu et al., 2014).

De igual forma en el 2014 Krishnamurthy y colaboradores estudiaron la síntesis de nanopartículas de oro empleando extracto de las hojas de *Yucca filamentosa* para evaluar su potencial catalítico. Lograron obtener partículas con morfología de triángulos y cubos, en tamaños de 10 a 500 nm. Esto lo confirmaron gracias a la señal del plasmón en el análisis UV-Vis que observaron su máximo a las 24 horas de reacción. El difractograma mostró un crecimiento preferencial en la dirección (111) de una red cúbica centrada en las caras, que es la celda que comúnmente adoptan las nanopartículas de oro. De acuerdo con lo que ellos reportan se atribuyen un rol importante de los compuestos solubles en agua como los flavonoides, terpenoides y tiaminas como principales agentes en la síntesis de las nanopartículas. Comprobaron que las diferencias en las actividades fotocatalíticas se pueden atribuir al tamaño y morfología de las partículas (Krishnamurthy, Esterle, Sharma, & Sahi, 2014).

En el 2017 Vera y su equipo realizaron una revisión de la síntesis verde de nanopartículas metálicas. La síntesis verde se presenta como una opción de menor toxicidad para la síntesis de partículas metálicas, debido a que los métodos tradicionales utilizan reactivos altamente tóxicos y equipos muy especializados. Una de las mejores alternativas dentro de las posibilidades de la síntesis verde consiste en emplear extractos de plantas debido a una menor toxicidad en comparación con el uso de bacterias y algas. Mencionan que las biomoléculas que tienen una mayor actividad en la producción de nanopartículas metálicas, y que se encuentran en los extractos de plantas, son los polifenoles que tienen una alta capacidad antioxidante; la presencia de estas moléculas incrementa la estabilidad y el rango de aplicación de las nanopartículas. De acuerdo a los estudios que revisaron concluyen que el uso de extractos naturales permite obtener nanopartículas metálicas con diferentes características. (Vera, Farías, & Castañeda, 2017)

Sánchez Navarro y colaboradores en el 2018 obtuvieron nanopartículas de plata usando síntesis verde con extracto acuoso de *Annona Muricata*, para evaluar su efecto citotóxico y bactericida después de funcionalizarlas con 5-Fluoracilo. La síntesis se realizó utilizando  $\text{AgNO}_3$  como precursor de la plata y se mezcló con el extracto acuoso para generar las nanopartículas. Para funcionalizarlas con el 5-Fluoracilo se empleó ultrasonido por 20 minutos. En los resultados bactericidas se encontraron que las nanopartículas de plata sintetizadas tenían un menor rendimiento que el 5-Fluoracilo, sin embargo, al estar en conjunto se muestra una sinergia que permite que en concentraciones de 1.95 dg/mL o incluso menores se produzca una total inhibición en todas las muestras. En el caso de la citotoxicidad encontraron que al funcionalizar las partículas podían reducir la citotoxicidad mostrada por las partículas solas, sin embargo, la citotoxicidad mostrada no se considera un efecto adverso ya que no se llega al  $\text{IC}_{50}$ , incluso después de 48 horas (Del Carmen Sánchez-Navarro et al., 2018).

Por su parte Gavamukulya y colaboradores en el 2019 realizaron una síntesis de nanopartículas de plata, pero en este caso emplearon los extractos etanólicos de la *Annona Muricata*. Al igual que Sánchez Navarro, el precursor utilizado para la plata fue Nitrato de plata, pero el proceso se hizo durante 72 horas, aunque a las 3 horas ya se había presentado un cambio de coloración. Ellos obtuvieron nanopartículas que fueron identificadas con el plasmón característico de las nanopartículas de plata a una longitud de onda de 429 nm utilizando espectroscopia UV-Vis. Las partículas fueron estables en diferentes pH, así como a distintas temperaturas. La morfología obtenida por el medio de síntesis empleado fue esférica con tamaños de partícula que rondan los 87.36 nm. Ellos consideran que su investigación es solo un primer acercamiento al uso de extractos etanólicos de *Annona Muricata* para la obtención de nanopartículas de plata pero es necesario realizar pruebas que engloben sus efectos en aplicaciones antimicrobianas, antiinflamatorias, anticáncer entre otras (Gavamukulya et al., 2019).

También en el 2019 Taghizadeh y colaboradores realizaron una revisión las aplicaciones de las nanopartículas de oro en el cáncer de hígado. Ellos establecen que, debido a los tamaños pequeños de las nanopartículas y su gran área superficial, éstas pueden ser empleadas en diferentes aplicaciones médicas como tratamientos o diagnósticos. Algunos de las aplicaciones analizadas son la mejora de imágenes para el diagnóstico de tumores por Rayos X o MRI, la

liberación de drogas de manera controlada, una mejora en tratamientos de radioterapia y de terapias fototérmicas. Ellos concluyen que con el uso de nanopartículas de oro el diagnóstico del cáncer hepático se puede mejorar al emplear las técnicas PET (Tomografía por emisión de positrones), CT (Tomografía computada) y MRI (Imagen por resonancia magnética); de igual forma se presentan resultados prometedores en el uso de nanopartículas de oro para la liberación de nanopartículas (Taghizadeh, Alimardani, Roudbali, Ghasemi, & Kaviani, 2019).

En el 2020 evaluaron nanopartículas de oro sintetizadas con extracto acuoso de *Annona muricata* obtenido de la pulpa y la cáscara de la fruta, para estudiar su efecto antiproliferativo en células tumorales de cáncer hepático. Esto se realizó por Kamala Priya y por Priya R., ellos emplearon la línea celular Hep2 para la evaluación de la actividad. Las partículas fueron sintetizadas empleando HAuCl<sub>4</sub> como precursor del oro empleando el método de reducción. Para la evaluación del efecto antiproliferativo se empleó el ensayo MTT, usando la línea celular VERO como control. Las partículas obtenidas fueron con morfología esférica principalmente, altamente estables y tamaño promedio de 20 nm. Kamala y Priya obtuvieron un IC<sub>50</sub> en concentraciones de 17.98 µg/mL y 13.08 µg/mL con los dos tipos de nanopartículas que sintetizaron a partir de cada uno de los extractos. Encontrando que estas nanopartículas no eran tóxicas para la línea celular VERO, usada como control, y que si presentaba un buen efecto antiproliferativo contra la línea Hep2 (Priya M R & Iyer, 2020).

También en el 2020, Santos Espinoza y colaboradores realizaron una revisión para conocer el papel que juegan los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. Ellos revisaron que los compuestos polifenólicos eran el principal grupo de compuestos que participaban en la síntesis de nanopartículas metálicas, ya que influyen en la bio-reducción, estabilización y bioprotección de las mismas. La intervención de estas biomoléculas contribuye a que la toxicidad de las partículas sea significativamente baja, lo que contribuye a que estas nanopartículas se puedan emplear en aplicaciones de diversas áreas como medicina y agricultura. Concluyen determinando una relación estrecha entre la alta capacidad antioxidante mostrada por estas biomoléculas con su potencial reductor, por lo que son los principales participantes en la biosíntesis de nanopartículas metálicas al emplear extractos vegetales. De igual forma, establecen que es necesario realizar mayor investigación sobre el uso de extractos

vegetales en la obtención de nanopartículas metálicas (Santos-Espinoza, Gutiérrez-Miceli, Ruíz-Valdiviezo, & Montes-Molina, 2020).

Para finalizar, en el 2021 Sankar Sana y su equipo realizaron una revisión sobre los recientes avances en la obtención de nanopartículas metálicas utilizando aceites esenciales de plantas. Estas partículas se emplean en aplicaciones de actividad anticancerígena, actividad antimicrobiana, actividad antiviral, actividad antiinflamatoria, actividad antidiabética y actividad antioxidante. Concluyen que el uso de esos aceites esenciales en la producción de nanopartículas significa una reducción de los costos; también lo plantean como una opción amigable con el medio ambiente al reducir el uso de sustancias tóxicas en la producción de nanopartículas. Sankar y colaboradores mencionan que los terpenoides no tienen una actividad tan importante en la reducción de los precursores metálicos, por lo que se requiere mayor estudio para determinar la influencia de estos compuestos en la síntesis de las nanopartículas (Sankar et al., 2021).

De acuerdo a los estudios revisados, sabemos que los polifenoles tienen una importante influencia en la síntesis de nanopartículas metálicas. Los resultados obtenidos dependen de factores como el pH, los solventes empleados en la extracción de los aceites de las plantas, así como de los precursores metálicos utilizados en la síntesis. De igual forma es importante tener en cuenta que la reducción de tamaños en las nanopartículas incrementa el área superficial y, por lo tanto, puede incrementarse la acción terapéutica o la efectividad de la aplicación que se le esté dando. Sin embargo, también será de gran importancia realizar estudios de toxicidad para asegurarnos que las partículas se pueden emplear en la aplicación deseada.

# Objetivos

## Objetivo General

Estudiar los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de *Annona cherimola* Mill. para obtener nanopartículas de oro y evaluar su actividad antitumoral in vitro, en la línea celular HepG2.

## Objetivos Específicos

- Realizar y optimizar la extracción de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Annona cherimola* Mill.
- Caracterizar la composición de los extractos obtenidos utilizando espectroscopia UV-Vis, FTIR y HPLC.
- Caracterizar la capacidad antioxidante de los extractos usando los estudios DPPH, FRAP y CUPRAC.
- Caracterizar la presencia de fenoles y flavonoides en los extractos.
- Realizar síntesis verde de nanopartículas metálicas (Oro), siguiendo la ruta por reducción con los extractos acuosos y etanólicos de *Annona cherimola* Mill.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas metálicas.
  - Tamaño de partícula (DLS), morfología (SEM), composición (UV-Vis, FTIR), potencial zeta, estructura cristalina (DRX).
- Evaluar el comportamiento antibacterial de los extractos.
- Evaluar efecto antitumoral de los extractos acuosos y las nanopartículas metálicas obtenidas con extracto acuoso en la línea celular HepG2.
- Evaluar viabilidad celular en la línea celular IMR-90.

## Estructura del documento

La estructura del documento está constituida por cuatro capítulos. En el capítulo uno se presenta el marco teórico utilizado para el desarrollo del proyecto, se divide en cuatro secciones. En la primera sección se presenta información respecto al cáncer, particularmente del cáncer hepático y los tratamientos actuales. Posteriormente se estudia que son los extractos naturales, la familia *Annonaceae*, que son los metabolitos secundarios, algunos de los métodos de extracción y las propiedades que son importantes de evaluar en cualquier extracto realizado. En la tercera sección se analiza que son las nanopartículas, la naturaleza de donde provienen y algunas de sus propiedades. Se estudia más a profundidad las nanopartículas metálicas y algunos de los efectos tóxicos que se pueden presentar. En la última sección se estudian los posibles métodos de síntesis enfocándose en la síntesis verde y cuáles son sus ventajas.

El capítulo dos muestra las metodologías seguidas durante el proyecto, así como algunos de los equipos utilizados en el mismo. El capítulo está dividido en cinco secciones. Comienza con las metodologías empleadas en la extracción, secado y análisis de los extractos, así como la capacidad antioxidante y la determinación del contenido fenólico, al igual que la presencia de las acetogeninas; en la segunda sección, se presenta la metodología de síntesis para las nanopartículas metálicas. La tercera sección incluye los procedimientos y equipos empleados en la caracterización de las nanopartículas. La cuarta incluye la metodología para la evaluación de la actividad antitumoral de los extractos y las nanopartículas. Por último, en la quinta sección, se presenta la metodología para medir la actividad antibacteriana de los extractos.

En el capítulo tres se resumen los resultados obtenidos, a partir de las metodologías descritas en el capítulo dos. En estos resultados se determinan las condiciones óptimas de extracción, cuáles son las relaciones adecuadas en las síntesis y el potencial, tanto del extracto como de las nanopartículas, para actuar como terapéuticos contra el cáncer y como bactericidas.

Por último, en el capítulo cuatro, se presentan las conclusiones del proyecto, en estas se da a conocer si el objetivo del proyecto se ha cumplido; además, se menciona la perspectiva a trabajos futuros utilizando los resultados obtenidos del presente trabajo.

# Capítulo 1.- Marco Teórico

## 1.1 Cáncer

Cáncer es el nombre que reciben múltiples enfermedades que están relacionadas a partir de algunas de sus características, principalmente el crecimiento celular anormal (National Cancer Institute, 2015). Sin embargo, existen diversas variaciones en la definición formal que se le da a esta enfermedad. Tomaremos en cuenta la siguiente definición:

*“Cáncer es un crecimiento anormal de las células, causado por múltiples cambios en la expresión de los genes que conducen a una desregulación en el balance de la proliferación y la muerte celular, lo que provoca una población celular que puede invadir tejidos y hacer metástasis a sitios distantes, provocando una significativa morbilidad y, de no ser tratado, muerte del paciente”. (Ruddon, 2007)*

El cáncer actualmente se considera como una de las mayores causas de muerte a nivel mundial. La principal diferencia entre el cáncer y un tumor benigno, es la capacidad del primero de invadir tejidos cercanos, difundirse a los nodos linfáticos regionales e incluso hacer metástasis hasta órganos que están distantes en el cuerpo. Existen múltiples características que se modifican en las células cancerígenas a medida que se desarrolla el cáncer, entre ellas está el potencial invasivo, el potencial metastásico, la tasa de proliferación celular, el estado de diferenciación e incluso la respuesta a agentes quimioterapéuticos. (Ruddon, 2007)

Debido a que el cáncer consiste en una enfermedad genética, provocada por cambios en los genes cuando las células crecen o se reproducen, es complicado determinar causas específicas para el desarrollo de este tipo de enfermedad. Las posibles causas se clasifican en dos grandes grupos: Herencia parental, donde los padres transmiten un error genético a sus hijos, y la modificación genética durante el tiempo de vida de la persona, causado por factores ambientales (National Cancer Institute, 2015). Sin embargo, normalmente ambas causas tienen influencia en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo fumar es una situación de riesgo por factores ambientales, que puede actuar sobre una predisposición genética que promueva la formación del cáncer (Ruddon, 2007).

Como ya se mencionó, un tumor maligno es capaz de realizar metástasis a otros órganos del cuerpo; normalmente el lugar del tumor primario determinará el modo de difundirse y los órganos que atacará al realizar metástasis. Algunos tejidos son más susceptibles para ser sitios de metástasis, tales como la sangre o los nódulos linfáticos ; también los pulmones y el hígado son sitios comunes para tumores que ocurren en órganos viscerales (Ruddon, 2007).

### **1.1.1 Cáncer Hepático**

El cáncer hepático está catalogado como la segunda causa de muerte, relacionada al cáncer, más común del mundo (Cheng et al., 2016; Li & Wang, 2016; Sia, Villanueva, Friedman, & Llovet, 2017). Puede dividirse en dos clasificaciones, primario y secundario. El cáncer hepático primario consiste en aquel que se origina debido a tejido epitelial o mesenquimal que se convierte en tumor maligno; mientras que el secundario es aquel que sucede por invasión del hígado causada por metástasis de otros órganos (K. Chen et al., 2016).

Dentro del cáncer hepático primario existen diferentes tipos, entre estos se encuentra el carcinoma hepatocelular (HCC), el colangiocarcinoma intrahepático (iCCA), la mezcla de colangiocarcinoma hepatocelular (HCC-CCA) y el hepatoblastoma. Son el HCC y el iCCA los más comunes, cubriendo entre ambos el 99% de los casos (Sia et al., 2017). Por sí solo, el HCC cubre el 90% de los casos reportados de cáncer hepático, es por esto que representa el de principal interés en los tratamientos. Debido a la cantidad tan amplia de causas que provocan esta enfermedad, al cáncer hepático se le considera como extraordinariamente heterogénea. Por ejemplo, en el caso del HCC, existen diferentes fenotipos celulares como: células claras, rico en grasas, de células fusiformes, tipo indiferenciado, etc. (Li & Wang, 2016)

A pesar de que no existe solo un mecanismo para la generación de cáncer se ha logrado detectar factores particulares para la aparición de cáncer hepático. Existen factores de riesgo, como el alcohol, la obesidad y la diabetes, que pueden incrementar la probabilidad de desarrollar este tipo de padecimiento. También, enfermedades como la Hepatitis B y la Hepatitis C, que son responsables de un 80% de casos de HCC, se consideran causas de cáncer hepático, aumentando el riesgo al doble si se combinan dichos padecimientos con el consumo

de alcohol (Li & Wang, 2016; Zhou et al., 2017). en la figura 1 se muestran algunos de los orígenes que se han estudiado del carcinoma hepatocelular, categorizados como insultos al hígado, lo que genera pequeños nódulos displásicos que pueden derivar en carcinoma hepatocelular. Estos insultos incluyen al alcohol, aflatoxinas y enfermedades del hígado ya mencionadas como Hepatitis B y C.

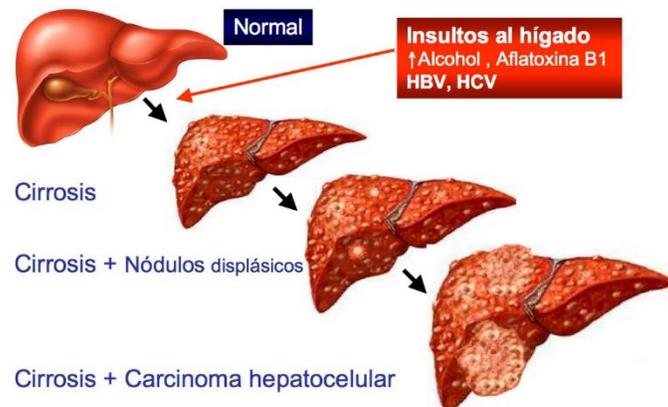


Figura 1.- Orígenes estudiados del carcinoma hepatocelular, donde se observa el progreso de la enfermedad (Nava, 2017).

Existe la teoría de que el cáncer hepático se mantiene presente, una vez dada la mutación, gracias a la existencia de reservorios celulares de células madre, las cuales se reproducen descontroladamente; de tal forma que estos reservorios serían los responsables de la heterogeneidad de la enfermedad (Cheng et al., 2016).

Actualmente el tratamiento con mayor efectividad consiste en cirugía, en la cual se retira la parte dañada; sin embargo, la mayoría de los pacientes que son diagnosticados están en etapas avanzadas por lo que no son aptos para dicho procedimiento. Aquellos a los que se les puede practicar la cirugía presentan una reincidencia del 30% en los primeros seis meses, porcentaje que crece conforme pasa el tiempo (K. Chen et al., 2016; Sheng et al., 2015).

La ablación por radiofrecuencia se presenta como una opción a la cirugía. Representa una menor invasión, mayor seguridad y una reducción en los costos. Si bien no existe una diferencia entre la supervivencia con cirugía y mediante la ablación si se tienen las ventajas enlistadas anteriormente, dándole una oportunidad a algunos pacientes que no son candidatos a la cirugía (K. Chen et al., 2016).

### **1.1.2 Tratamientos Actuales**

Los tratamientos actuales para el cáncer hepático se dividen en tres principales categorías: la cirugía, la quimioterapia y los tratamientos experimentales. El principal tratamiento y con mayor índice de éxito es la resección quirúrgica del tumor o trasplantes de hígado, sin embargo, este tratamiento solo es efectivo cuando el padecimiento se diagnostica en las etapas primarias de la enfermedad. En el caso de la quimioterapia la terapia con Sorafenib es aquel con mayor índice de éxito, sin embargo, este éxito consiste solo en prolongar la vida del paciente por unos meses en el caso de cáncer hepático avanzado. Respecto a los quimioterapéuticos tradicionales, el uso de doxorubicina, cisplatino y 5-fluoracilo se han empleado pero su índice de éxito es muy bajo, incluso acompañado con radioterapia la efectividad no aumenta. (Daher, Massarwa, Benson, & Khoury, 2018)

En perspectiva, la mejor opción es sin duda la cirugía, ya sea para retirar el tumor del órgano afectado o bien para realizar un trasplante de hígado. Sin embargo, en el caso de trasplantes, la cantidad de órganos disponibles no es muy alta. Junto a esta situación se debe tener en cuenta que para realizar un trasplante de hígado el paciente debe tener un tumor de no más de 5 cm o hasta tres tumores de no más de 3 cm; aun en los casos donde los trasplantes se llevan a cabo el índice de reincidencia es de casi el 50%. (Daher et al., 2018; Rabinel, Dousse, Muscari, & Suc, 2017)

Dentro de los tratamientos experimentales se encuentran los nanomateriales. Existen distintas investigaciones buscando materiales que puedan funcionar en distintos tipos de cáncer. Hasta ahora, como se menciona antes están en prueba, pero se han mostrado resultados prometedores de nanopartículas de oro en leucemia en ratas, también para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas MCF-7, así como en células HCT-116, por mencionar algunos ejemplos (Medici, Peana, Coradduzza, & Zoroddu, 2021).

## 1.2 Extractos Naturales

Los extractos naturales de diferentes plantas están constituidos por sustancias y moléculas con características muy particulares que funcionan para distintas aplicaciones, siendo de interés particular las aplicaciones biomédicas. Recientemente los extractos naturales se han empleado en la obtención de nanopartículas metálicas, debido a que, por su alto contenido de antioxidantes, funcionan como agentes reductores, pero también funcionan como agentes estabilizadores para las nanopartículas; además, es posible potencializar los efectos ya mostrados por ciertas partículas, como la capacidad antibacterial de las nanopartículas de plata (Molina et al., 2019; Varadharaj et al., 2014). Estos extractos se pueden obtener con diferentes métodos de extracción, y de acuerdo al método empleado se pueden obtener diferentes contenidos de biomoléculas, y, por lo tanto, tener distinto comportamiento, tanto en los efectos terapéuticos del extracto en sí, como en las aplicaciones deseadas con otros materiales.

### 1.2.1 Familia *Annonaceae*

La familia *Annonaceae* está formada por aproximadamente 2500 especies. La gran mayoría de las especies pertenecientes a esta familia se localizan en las regiones tropicales de América, Asia, y Madagascar. Existe un amplio interés en diferentes especies de la familia *Annonaceae*, en primera instancia por su potencial económico al poder utilizarse como alimento; sin embargo, también han presentado un alto potencial para ser utilizadas en diferentes aplicaciones relacionadas con el sector salud, con la posibilidad de desarrollar distintos tratamientos a partir de los compuestos presentes en las diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, semillas o inclusive en los mismos frutos. Dentro de las especies de interés se encuentran la *Annona muricata* y la *Annona cherimola*. (Albuquerque et al., 2016; Barreca et al., 2011; González Vega, 2013)

#### 1.2.1.1 *Annona muricata* L.

La *Annona muricata* es un miembro de la familia *Annonaceae* que ha sido ampliamente estudiada debido a su potencial terapéutico hacia distintas enfermedades crónico-

degenerativas. De acuerdo a diferentes estudios se ha demostrado que la *Annona muricata*, conocida coloquialmente como Guanábana, tiene propiedades insecticidas y parasiticidas. De igual manera se emplea en diferentes zonas del mundo como un remedio tradicional para enfermedades y problemas relacionados a los pulmones, el corazón, el hígado y los riñones. (Gavamukulya et al., 2017)

La *Annona muricata* se puede localizar en todo el mundo, siempre y cuando se tengan temperaturas entre 25 °C y 28 °C, altitudes de 1200 m sobre el nivel del mar y humedad entre el 60 y 80%. En la figura 2 podemos observar el fruto y las hojas de la guanábana, como se observa es un fruto de gran tamaño con cascara de un verde brillante, el interior es blanco, con semillas color negro. Las hojas son de un color intenso y de acuerdo a la madurez presentan diferentes tamaños.



Figura 2.- Fotografía de la fruta y las hojas de la guanábana.

#### 1.2.1.2 *Annona cherimola* Mill

El nombre científico completo es *Annona cherimola* Mill, en México es conocida como Chirimoya de manera tradicional. Una de las principales características de la *Annona cherimola* Mill es su capacidad de adaptarse a climas tropicales y subtropicales, esto le permite crecer en diferentes partes de México que para otras especies pertenecientes a la misma familia es imposible hacerlo. Uno de los principales retos a los que la especie se enfrenta es que, si bien su producción se ha mantenido como una producción tradicional, esta planta no se produce a

gran escala en términos comerciales, a pesar de que es una planta muy apreciada gracias al aroma y delicado sabor de sus frutos. Normalmente, la pulpa de sus frutos se emplea en forma natural o bien en la producción de jugos y otras sustancias de consumo humano. La chirimoya es originaria de la región de los Andes, el árbol es de crecimiento lento, pero en su madurez alcanza alturas entre 7 y 8 metros. El follaje es abundante, con hojas simples con forma ovalada, como se menciona anteriormente, las flores presentan un aroma abundante y característico de la planta (González Vega, 2013).

Respecto al valor nutricional de la planta, la Chirimoya se considera como una fruta nutritiva, con un alto contenido de agua y una combinación que se considera armónica, respecto a su composición ácida y de azúcares. La fruta presenta un alto contenido calórico. A un nivel molecular se han realizado estudios respecto a la composición de la Chirimoya, no solo en las frutas sino en los demás componentes de la planta, encontrando que tiene metabolitos secundarios antioxidantes como fenoles y flavonoides, así como algunos terpenoides. De igual forma se ha encontrado que en la *Annona cherimola* Miller existen Acetogeninas tal como sucede con otras especies de la familia *Annonaceae* (Albuquerque et al., 2016; Barreca et al., 2011; González Vega, 2013). En la figura 3 podemos observar el fruto y las hojas de la chirimoya; al comparar con la guanábana se nota una disminución en el tamaño del fruto, también la cáscara es de un verde más opaco, mientras que las hojas tienen un tamaño mayor en comparación a las de la guanábana.



Figura 3.- Fotografía de la fruta y las hojas de la chirimoya.

### 1.2.2 Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son sustancias derivadas de plantas, que actualmente tienen un gran interés de investigación; principalmente para su uso en el desarrollo de nuevos tratamientos o mejoras en alimentos y medicamentos. Estos metabolitos se clasifican en diferentes familias, de acuerdo a sus características estructurales y a los efectos que tienen con los organismos que entran en contacto; entre estas familias se encuentran las antocianinas, los terpenos, los flavonoides, los polifenoles, las acetogeninas, entre otros (Tiwari, Kumar, Kaur, & Kaur, 2011).

Las diferentes actividades que presentan los metabolitos secundarios, también conocidos como fitoquímicos son: antimicrobiana, antidiarreica, antiviral, antitumoral, entre otras. Para poder obtener los distintos metabolitos es necesario emplear diferentes métodos de extracción en los que también varían los parámetros a utilizar de acuerdo con el fitoquímico deseado (Tiwari et al., 2011).

#### 1.2.2.1 Acetogeninas

Las acetogeninas son metabolitos secundarios que se encuentran únicamente en las plantas de la familia *Annonaceae*, son ácidos grasos de cadena larga que va entre los 35 y 37 carbonos, pueden tener uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos, en un extremo presenta un anillo lactónico metil sustituido. También pueden estar presentes algunos sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas, epóxidos), presentar algunos dobles enlaces o tener compuestos con anillos epoxi o tetrahidropirano. Estas moléculas presentan distintos efectos, tales como: antiparasitarios, insecticidas, antimicrobianos, antifúngicos y antitumorales. La toxicidad con células cancerígenas está presente incluso en aquellas que presentan quimioresistencia o resistencia múltiple a los fármacos (MDR), consiguiéndolo con dosis muy pequeñas, lo que representa una característica de alta relevancia para su uso como agente antitumoral (Schlie-Guzmán et al., 2009; Sun et al., 2017).

Su citotoxicidad se debe a la inhibición del complejo I mitocondrial (NADH), esta molécula es una molécula de transporte que actúa durante la producción energética de la célula, tanto en la

glucólisis como en el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, procesos donde se sintetizan moléculas de ATP. Las células cancerígenas requieren elevadas cantidades de energía química para mantenerse activas por lo que esta forma de actuar de las acetogeninas provoca la muerte celular de dichas células (Angulo Rodríguez, Galindo Uriarte, Avendaño Palazuelos, & Pérez Angulo, 2012; Chuzeville Munguía, Díaz Sobac, & Álvarez Sánchez, 2015; Durán, Gutiérrez, Mejías, Molinillo, & Macías, 2021; Schlie-Guzmán et al., 2009; Sun et al., 2017).

Debido a los posibles cambios estructurales, existen muchos tipos diferentes de acetogeninas, sin embargo, de acuerdo con los estudios realizados, se ha observado que aquellos que presentan bis-THF adyacentes tienen mayor potencia inhibitoria, mientras que las lineales son las de menor actividad (Chuzeville Munguía et al., 2015; Schlie-Guzmán et al., 2009).

Existe la sospecha de que algunas acetogeninas presentan efectos neurotóxicos además de los efectos benéficos ya descritos, provocando ciertas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y parálisis suprarrenal progresiva (Chuzeville Munguía et al., 2015; Schlie-Guzmán et al., 2009). El uso de los extractos obtenidos de las *Annonaceae* sin realizar una purificación de las acetogeninas presenta un comportamiento benéfico en aplicaciones antitumorales y disminuye las probabilidades de efectos secundarios por parte de las acetogeninas. En la figura 4 se presenta la estructura general de los compuestos de acetogeninas, las variaciones se presentan principalmente en la existencia de más grupos OH u otros grupos sustituyentes.

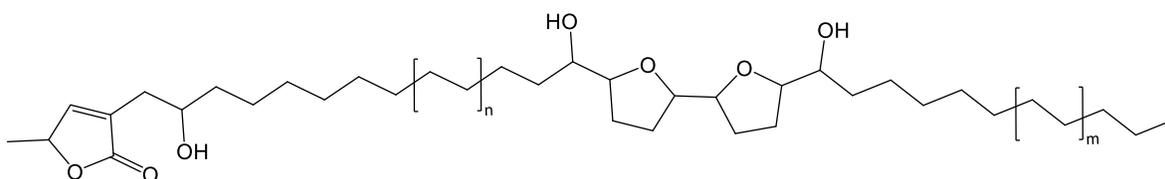


Figura 4.- Estructura general de las acetogeninas

### 1.2.3 Métodos de extracción

Las extracciones permiten obtener compuestos activos que se encuentran en los tejidos de plantas y animales. Para esto se utilizan diferentes solventes, así como distintos procesos. De acuerdo al fitoquímico que se requiere extraer se utiliza un solvente que sea capaz de disolverlo

por la polaridad similar; de esta manera, el metabolito se separará de la parte inerte de la planta y quedará inmerso en el solvente, del cual se puede recuperar posteriormente utilizando otros procedimientos físicos y químicos (Tiwari et al., 2011).

La maceración, la infusión, la percolación, la digestión, la extracción por Soxhlet, la sonicación y la extracción asistida por microondas, son algunos de los métodos utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de plantas. Algunos parámetros que modifican la eficacia y calidad de la extracción son (Tiwari et al., 2011):

- Parte de la planta que se usará como materia prima.
- Solvente para realizar la extracción.
- Procedimiento o método de extracción.

En general, los métodos de extracción de plantas buscan que el material de la planta sea lo más fino posible, con la idea de aumentar el área superficial lo que optimiza el contacto con el solvente y produce una mayor concentración de fitoquímicos. Algunos estudios presentan el ratio de 10:1 (v/m) solvente:materia prima seca como el ideal para realizar la extracción (Tiwari et al., 2011).

#### *1.2.3.1 Extracción con equipo Soxhlet*

La extracción con equipo Soxhlet es una extracción sólido-líquido; es muy utilizada para obtener principios activos de los tejidos vegetales. Utilizar este equipo permite automatizar hasta cierto grado el proceso de extracción, ya que se encarga de evaporar el solvente y condensarlo para que no llegue a su punto de saturación, de tal forma que continúe realizando el proceso de extracción sin desperdiciar solvente (Nuñez, 2008).

Pasos del proceso de extracción Soxhlet(Nuñez, 2008):

1. Colocación del solvente en un matraz de bola.
2. Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
3. El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior

4. Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujó que vuelve el solvente con el material extraído al matraz de bola.
5. Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria hasta que la muestra quede agotada. El extracto se concentra progresivamente en el matraz de bola.

En la figura 5 vemos el equipo de Soxhlet armado, con el nombre de cada una de las partes y la función que cumplen, de esta forma es más claro el funcionamiento de dicho equipo.

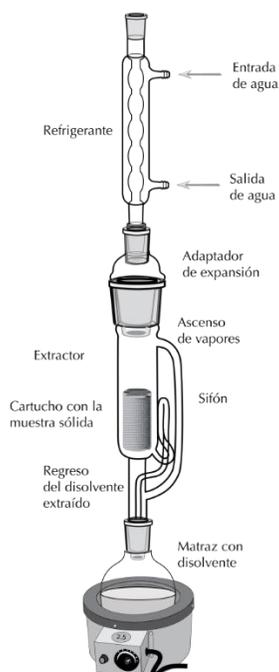


Figura 5.- Equipo de Soxhlet armado, uno de los métodos más empleados para la extracción de compuestos (Química, 2021)

### 1.2.3.2 Extracción por Infusión

La extracción por infusión es uno de los procedimientos más antiguos que existen para la obtención de metabolitos secundarios de plantas, principalmente de las partes con tejidos delicados como hojas y flores. Consiste en verter agua hirviendo sobre la planta que ha sido anteriormente cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente sellado y se deja reposar durante 20 minutos, periodo en el cual la temperatura va decayendo. Una vez pasado el tiempo el contenido del recipiente se filtra para recuperar los metabolitos extraídos en el solvente. (Guerra Corado, 2005)

### *1.2.3.3 Extracción por Ondas de Choque*

La extracción por ondas de choque es un procedimiento experimental donde se plantea la posibilidad de incrementar la cantidad de metabolitos secundarios presentes en el interior de las células vegetales. Las ondas de choque son ondas acústicas de alta energía que actualmente tienen aplicaciones dentro de la medicina; ya sea para buscar regeneración, rehabilitación, tratar calcificación e incluso para el alivio del dolor. Las ondas de choque pueden ser de dos tipos: Radial y focal. Normalmente las ondas de choque focales son aquellas que tienen la capacidad de actuar a nivel celular (CORR Medical, 2015).

### *1.2.3.4 Extracción Asistida por Ultrasonido*

El proceso de extracción asistida por ultrasonido (UAE por sus siglas en inglés) es un proceso relativamente nuevo que busca disminuir los tiempos de extracción, así como evitar el uso de altas temperaturas para las mismas. Consiste en la aplicación de energía acústica a través del medio (solvente) utilizado para la extracción de acuerdo a los fitoquímicos que se desean obtener; esto genera un efecto de cavitación que propicia una ruptura de las membranas celulares de la planta y por tanto la liberación de los metabolitos secundarios de interés (Mandal, Mandal, & Das, 2015).

La UAE es un procedimiento sencillo con distintas ventajas en comparación a métodos como la extracción por Soxhlet. Algunas de estas son:

- No se emplean temperaturas elevadas para el procedimiento.
- El procedimiento de cavitación puede generar una extracción similar o incluso mayor a procesos de extracción por Soxhlet.
- Los tiempos de operación son extremadamente cortos en comparación a los tiempos necesarios en otros procedimientos de extracción.

En la figura 6 se presentan las posibles configuraciones de equipos para realizar extracción asistida por ultrasonido. Se tiene lo que se conoce como baño de ultrasonido, donde las ondas ultrasónicas se transmiten a través del agua hacia un recipiente que contiene la masa de extracción y el solvente. También, existe la extracción por ultrasonido asistida por agitación mecánica, donde la masa de extracción está en el recipiente que se encuentra en contacto

directo con los transductores y existe un agitador mecánico que auxilia la operación, buscando tener mayores rendimientos. Por último, la extracción con sonda o punta de ultrasonido, este equipo genera directamente las ondas de ultrasonido dentro del solvente donde se tiene la masa de extracción, se pueden controlar parámetros como la temperatura, o bien, ser asistido por agitación mecánica.

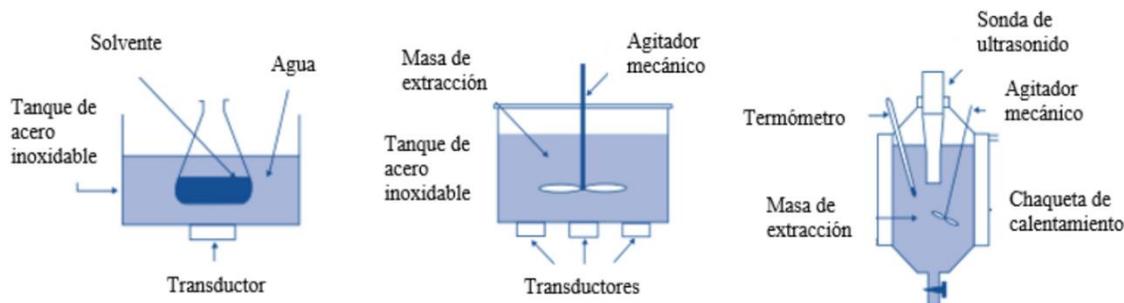


Figura 6.-Distintas configuraciones de la UAE, cada una presenta diferentes rendimientos y puede ser empleada en distintas condiciones (Azuola & Vargas, 2007).

### 1.2.3.5 Extracción por Maceración

EL proceso de extracción por maceración es uno de los primeros procedimientos de extracción empleados. Se considera una extracción fría ya que no se emplea ninguna fuente de calentamiento para realizar la extracción de los metabolitos secundarios. Es un método que consiste en muy pocos pasos. En general los pasos son (Mandal et al., 2015):

- Colocar el material orgánico molido o cortado en partes pequeñas en un recipiente
- Se adiciona el solvente seleccionado y se deja en reposo durante unos días.
- Ocasionalmente puede realizarse pequeñas agitaciones para contribuir a la extracción de los compuestos.
- Al completar los días de reposo el líquido se retira y el material orgánico se exprime para obtener el líquido remanente.
- Se filtra para separar de manera efectiva el líquido de la materia sólida.
- El líquido obtenido se concentra y almacena.

Este método de extracción es uno de los más empleados por la facilidad de no requerir ningún equipo especializado para llevar a cabo el procedimiento. Además, ofrece una ventaja de estabilidad para las moléculas extraídas, ya que al no emplear altas temperaturas no existe el riesgo de degradación o daño a los compuestos de interés.

En la figura 7 se presenta una imagen de cómo se realiza la extracción por maceración, donde observamos el material orgánico inmerso en el solvente que realizará la extracción pasado cierto tiempo.



*Figura 7.- Proceso de maceración en frío (ejemplos) (Puente, 2009).*

#### **1.2.4 Propiedades de los extractos**

Cuando se obtienen extractos de fuentes naturales, independientemente de la técnica empleada para realizarlos, es necesario evaluar las distintas propiedades de los mismos. Su actividad biológica es de suma importancia, ya que normalmente se busca emplearlos en aplicaciones de carácter terapéutico; por ejemplo, como auxiliares antitumorales o como un medio antibacterial (Gavamukulya et al., 2017; Mostafa et al., 2018); por tanto, es necesario entender como medir y realizar los análisis de dichas propiedades. A continuación, se mencionan algunas de las propiedades a considerar, así como algunas de las técnicas existentes para evaluarlas.

#### *1.2.4.1 Antitumorales*

Las propiedades antitumorales de los extractos naturales corresponden a moléculas presentes en dichos extractos con la capacidad de modificar el crecimiento de células cancerígenas, ya sea deteniendo su producción o modificando rutas metabólicas para propiciar la muerte de dichas células. Se han realizado múltiples estudios analizando este comportamiento en diferentes tipos de cánceres a partir de extractos naturales de distintas plantas, obteniendo resultados prometedores, ya que existen distintas moléculas presentes en estos extractos con un potencial terapéutico similar o incluso superior a los quimioterapéuticos utilizados actualmente, reduciendo en muchos casos los efectos adversos que normalmente se presentan en tratamientos antitumorales. (Fabiani, 2020)

Para la evaluación de dichas propiedades es necesario realizar pruebas de viabilidad celular que permitan comprobar el efecto que tienen las moléculas de interés sobre las líneas celulares de cáncer que se desean combatir, así como en células sanas con el objetivo de comprobar que estas moléculas sean inocuas para las células sanas y generen el daño esperado en las células cancerígenas. Uno de los ensayos que se emplea con mayor frecuencia es el ensayo MTT que permite medir la actividad mitocondrial de las células para determinar si aún pueden realizar los procesos correspondientes a células vivas. (Santos et al., 2017)

#### *1.2.4.2 Antibacteriales*

Las propiedades antibacteriales de extractos naturales son de interés principalmente en aplicaciones alimentarias, debido a la capacidad que tienen ciertos compuestos presentes en estos extracto de eliminar bacterias que representan un riesgo a la salud para aquellos que consuman dichos alimentos (Mostafa et al., 2018). La actividad antibacterial puede darse en cualquier tipo de bacteria, o bien ser selectivo a bacterias gram (+) o únicamente actuar sobre bacterias gram (-), incluso la capacidad de ser selectivo sobre cierto tipo de bacterias puede representar una ventaja en el uso de extractos si solo queremos eliminar una parte de las bacterias o generar un efecto distinto sobre las mismas.

#### *1.2.4.3 Antioxidantes*

La capacidad antioxidante de los extractos naturales es una propiedad de gran importancia, es necesaria tenerla en cuenta, ya que los compuestos que presentan esta propiedad ayudan a prevenir, e incluso a tratar, ciertas enfermedades, como son el cáncer, la diabetes, Parkinson, enfermedades del corazón, entre otras. Los antioxidantes actúan previniendo el daño que agentes oxidantes producen en macromoléculas como proteínas, lípidos, enzimas o incluso el ADN. Es gracias a los antioxidantes que muchas plantas han sido utilizadas desde la antigüedad en el tratamiento de diversas enfermedades, por esto actualmente las técnicas de obtención de los mismos se han mejorado, con la finalidad de incrementar los beneficios y su potencia inhibitoria de los efectos negativos que los compuestos oxidantes pueden generar (Gavamukulya et al., 2014).

### **1.3 Nanopartículas**

La nanotecnología es la ciencia encargada de estudiar las propiedades de la materia a escala nanométrica, incluyendo la creación diseño, manipulación y control de la misma; en los años recientes se han presentado logros significativos en diferentes disciplinas, incluyendo el área médica. En dicha área se ha contribuido principalmente con sistemas nanoparticulados tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, dentro de estos sistemas se incluyen a las nanopartículas, las micelas poliméricas, los puntos cuánticos, los liposomas, los dendrímeros, entre otros (Bayat & Ghaidari, 2021; Gómez-Gaete, 2014; Santos-Espinoza et al., 2020). Todos los nanomateriales antes mencionados se conocen como nanomedicinas, cuyo objetivo principal es el balance entre la eficacia de los tratamientos y la toxicidad generada por el sistema terapéutico, es decir incrementar la efectividad del tratamiento sin generar un daño en el huésped, por dicho incremento (Bayat & Ghaidari, 2021).

Las nanopartículas pueden obtenerse por diferentes rutas, existen métodos físicos y químicos, siendo los primeros de mayor costo, mientras que los métodos químicos suelen ser más tóxicos

y de un mayor impacto ambiental negativo; es por esto que se han buscado nuevas opciones para obtener nanopartículas, entre éstas la síntesis verde (Santos-Espinoza et al., 2020). Para poder estudiar las propiedades de las nanopartículas se requieren equipos especializados que permitan estudiar sus propiedades, algunos ejemplos son los microscopios electrónicos, los equipos de Difracción de Rayos X, los espectrofotómetros, entre otros. Estos nanomateriales se pueden encontrar actualmente en diferentes industrias, como la textil, la cosmética, la construcción, entre otras. En el caso de la industria médica se pueden emplear como vehículo de transporte de ciertos fármacos, mejorando la selectividad de los mismo; también se emplean para mejorar el diagnóstico de ciertas enfermedades, actuando como biosensores debido a su capacidad de incorporar sustancias que faciliten el reconocimiento de células y tejidos (Gómez-Garzón, 2018).

### **1.3.1 Naturaleza y Propiedades**

Las nanopartículas son aquellos materiales particulados que tienen por lo menos una dimensión de tamaño menor a 100 nm. Estas pueden tener una naturaleza distinta a partir del material con el que se realizan. Se pueden dividir a partir de distintas características, por ejemplo del material con el que se realizan en: basadas en carbón, metálicas, semiconductoras, cerámicas y poliméricas; sin embargo, no es la única clasificación existente (Khan, Saeed, & Khan, 2017).

Las propiedades de las nanopartículas pueden variar de acuerdo al tamaño de las mismas, al material con el que están hechas, entre otras características por lo que no es posible definir propiedades específicas para todas. Sin embargo, algunas de las propiedades que se han observado que se modifican al trabajar con nanomateriales son el color, y la excitación con radiación UV-Vis que les puede conferir propiedades ópticas únicas. También, debido a la modificación de tamaño, se genera un radio alto de superficie volumen lo que les confiere propiedades particulares en aplicaciones de catálisis, biosensores y sensores químicos. Incluso se han encontrado propiedades antibacteriales y antitumorales de las partículas por sí mismas (Sharmin et al., 2021; Taghizadeh et al., 2019)

Como se presenta en la figura 8, las nanopartículas pueden estar formadas por distintos materiales como polímeros, cerámicos y metales. Existen distintas estructuras y formas de las mismas. Dentro de las estructuras están las nanocápsulas y nanoesferas poliméricas, que como diferencia presentan encapsulados dentro de una cubierta polimérica o entre la matriz polimérica respectivamente. También existen las micelas poliméricas que se forman por polímeros con una parte hidrofílica y una hidrofóbica, de tal forma que es posible encapsular compuestos hidrofóbicos dentro de estas micelas. Ahora bien, en las nanopartículas cerámicas se pueden encontrar nanopartículas mesoporosas de sílice, los nanotubos de carbono u otras estructuras de carbono como los fullerenos. Por último, existen las nanopartículas metálicas que pueden ser nanopartículas de óxidos o de metales como el oro, o bien, los puntos cuánticos. Como se señala antes, la forma es una propiedad importante para las aplicaciones deseadas, y algunos ejemplos que se muestran en dicha figura son las estrellas los cubos, las esferas, los alambres y los platos (Nagwa, 2021).

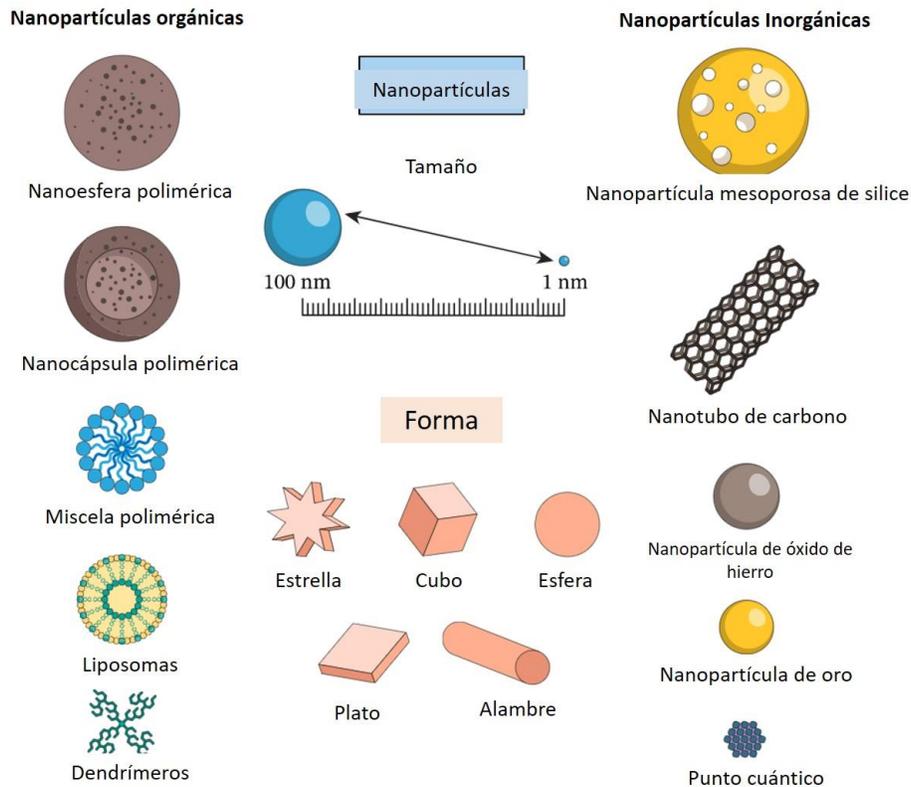


Figura 8.- Posibles estructuras, tamaños y formas de las nanopartículas (Nagwa, 2021).

### **1.3.2 Nanopartículas metálicas**

Las nanopartículas metálicas han sido consideradas como una opción viable para múltiples aplicaciones en los últimos años debido a la posibilidad de optimizar su uso gracias a las grandes áreas superficiales que se logra obtener a partir de la reducción de tamaños de dichas partículas. Esto abre la posibilidad de emplearlas en múltiples aplicaciones como catálisis, sensores, celdas solares, detección de sustancias e incluso en aplicaciones de carácter médico como antimicrobianas y anticancerígenas (Sankar et al., 2021). En aplicaciones de catálisis las propiedades más importantes son la forma, el tamaño y el recubrimiento que tienen las nanopartículas, debido a lo ya mencionado de la relación de superficie-volumen y que dichas propiedades contribuyen a esta relación. Actualmente se busca entender con mayor profundidad las propiedades biológicas de las nanopartículas que no se han estudiado en totalidad, a diferencia de las propiedades fisicoquímicas que han sido ampliamente exploradas (Taghizadeh et al., 2019).

Existen dos categorías distintas de los procesos empleados para la obtención de nanopartículas, una se conoce como de arriba-abajo y la otra es de abajo-arriba. Se entiende como arriba-abajo cuando la nanopartícula se obtiene a partir de la ruptura de un material de gran escala hasta el tamaño nanométrico, empleando métodos que pueden ser físicos o químicos. Sin embargo, para realizar estos procesos se requieren equipos especiales y complejos que son de alto costo y de una manufactura complicada. Por otro lado, el proceso de abajo-arriba las nanopartículas se obtienen de pequeños bloques, por ejemplo, iones metálicos. Esto se puede realizar también con métodos físicos y químicos; teniendo la ventaja de un mayor control de las geometrías de las partículas, así como del tamaño y una reducción de las imperfecciones, teniendo menores gastos que en los procesos de arriba-abajo (Taghizadeh et al., 2019; Vera et al., 2017).

Para la síntesis de las nanopartículas metálicas normalmente se emplean rutas donde son necesarias altas temperaturas, condiciones de vacío y algunos instrumentos muy sofisticados. De igual forma, se emplean reactivos que pueden ser altamente tóxicos y contaminantes por lo que actualmente se buscan alternativas que permitan obtener partículas con características adecuadas para la aplicación, a través de rutas de síntesis más amigables con el medio ambiente, así como poder reducir los costos de las mismas (Sankar et al., 2021).

Las nanopartículas metálicas se pueden obtener a partir de compuestos que contienen un metal, por ejemplo, sales, óxidos, entre otros. En el caso de nanopartículas metálicas con fines biomédicos normalmente se usa hierro, zinc, cobre, oro y plata. El uso de aceites esenciales en la obtención de estas nanopartículas va en aumento, aprovechando los grupos funcionales de distintos metabolitos secundarios presentes en dichos aceites; estos metabolitos actúan como reductores y estabilizadores de las nanopartículas (Kuchur et al., 2020; Sankar et al., 2021).

#### *1.3.2.1 Nanopartículas de Oro*

Las nanopartículas de oro han llamado recientemente la atención debido a las múltiples cualidades que se han demostrado que presentan en una relación directa con su tamaño y morfología. Debido a esto las aplicaciones que se han encontrado para las mismas corresponden a campos como catálisis, procesos de liberación de drogas, terapias fototérmicas entre otras. Los métodos tradicionales de obtención de nanopartículas de oro como reducción fotoquímica, ablación laser, entre otros han presentado distintos conflictos al momento de emplearlos, tales como el costo, los riesgos a la salud e incluso el empleo de reactivos químicos tóxicos que generan un daño al medio ambiente (Bayat & Ghaidari, 2021; Gangapuram et al., 2018; Priya M R & Iyer, 2020; Taghizadeh et al., 2019).

Las nanopartículas de oro se han analizado para aplicaciones en tratamientos de distintos tipos de cáncer, además se ha notado que presentan propiedades antibacteriales (Taghizadeh et al., 2019).

La primera síntesis reportada de nanopartículas de oro se da en el año 1940 a partir de una reacción entre  $\text{HAuCl}_4$  y citrato de trisodio, lo que dio como resultado oro coloidal. A partir de ese momento el proceso se ha modificado buscando optimizar las características del material de acuerdo a la aplicación deseada, siendo el procedimiento de reducción química de una sal metálica en presencia de un agente estabilizante el más empleado desde hace tiempo. Existen aún desafíos para poder controlar características de las nanopartículas además de encontrar métodos que sean rentables y más amigables con el ambiente (Bayat & Ghaidari, 2021; Priya M R & Iyer, 2020; Taghizadeh et al., 2019). Las nanopartículas de oro se han convertido en un

material de interés ya que se han logrado obtener diferentes geometrías como esférica, octaédrica, decaédrica, tetraédricas, entre otras, esto le confiere distintas propiedades ya que, como se mencionó antes, la geometría de las partículas le confiere propiedades particulares.

Actualmente se emplea también lo que se conoce como síntesis verde. Ésta consiste en una síntesis con extractos naturales de plantas, el uso de bacterias, hongos, entre otros como precursores, además de las sales metálicas de acuerdo al tipo de nanopartícula que se desea. Este tipo de síntesis se considera amigable con el ambiente, rentable económicamente e incluso permite tener cierto control sobre las estructuras y distribuciones de tamaños obtenidos. Este tipo de síntesis presenta una importante oportunidad para contribuir en el uso de las AuNP en el área biomédica, principalmente en tratamientos y detección de cáncer, ya que dentro de esta ruta se evita el uso de sustancias químicas tóxicas para la obtención del material, por lo tanto se evade el riesgo de afectar al cuerpo con residuos de la síntesis (Bayat & Ghaidari, 2021; Priya M R & Iyer, 2020).

La presencia del plasmón de resonancia de superficie en las nanopartículas de oro que se muestra en la caracterización con espectrómetro UV-Vis es una propiedad que permite su identificación en los procedimientos de síntesis, así como un primer acercamiento a ciertas propiedades ya que la intensidad y forma de dicho plasmón están relacionadas con el tamaño, la forma, la estructura y la composición de las partículas así como con la constante dieléctrica del medio en el que dichas partículas se encuentran (Bayat & Ghaidari, 2021; Taghizadeh et al., 2019).

#### *Aplicaciones de las nanopartículas de oro*

Como se menciona anteriormente las nanopartículas de oro tienen múltiples posibilidades de aplicaciones. A continuación, se detallan algunas de dichas aplicaciones dentro del diagnóstico y tratamiento del cáncer hepático.

- Aplicación en imagen

Las nanopartículas de oro (AuNP) se han perfilado como candidatas a su uso como agentes de contraste en las tomografías por rayos X, debido al mayor número atómico en comparación al

Yodo que es el usado actualmente, además de que las AuNP presentan un coeficiente de absorción de rayos X mayor, así como la presencia del efecto del plasmón de superficie. Debido a esas características ópticas únicas de las nanopartículas se pueden emplear tanto en la detección como en la focalización de ciertos materiales, en este caso para identificar tejido cancerígeno. Algunas de las pruebas que se han realizado actualmente consisten en la unión de las nanopartículas con anticuerpos, su recubrimiento con polímeros biocompatibles e incluso la incrustación en materiales compuestos con sílice y acrílicos; logrando mayor resolución de imágenes o aumento en el efecto de fluorescencia de las partículas (Taghizadeh et al., 2019).

- Aplicación en liberación de medicamentos y genes

La entrega de medicamentos a zonas específicas es una acción muy buscada en la actualidad y las AuNP han mostrado posibilidades de realizar esta acción, ya que es posible conjugar las nanopartículas con moléculas terapéuticas y ajustar la velocidad de liberación, llevándolo a los tejidos donde es necesaria la acción terapéutica. Incluso, con la modificación superficial correcta, las AuNP pueden ser empleadas como tratamiento en ciertos tejidos tumorales. Actualmente se ha probado como transporte para medicamentos con Doxorubicina, Capecitabina y Cisplatino. También se ha encontrado que en la síntesis verde con plantas como el *Sargassum glaucescens* las AuNP presentan un potencial de agente antitumoral al actuar in vitro sobre la línea celular HepG2 (Bayat & Ghaidari, 2021; Taghizadeh et al., 2019).

- Aplicación radioterapia

La radioterapia es uno de los tratamientos más empleados para combatir el cáncer. A pesar de usar otro tipo de tratamiento, los pacientes normalmente se benefician de la radioterapia como complemento. Lo que se ha buscado es sensibilizar a los tumores, de tal forma que la efectividad del tratamiento de radioterapia sea mayor y los efectos secundarios disminuyan; para esta aplicación uno de los principales candidatos son las AuNP, ya que, como se ha venido mencionando, sus propiedades ópticas le confieren la capacidad de realizar dicha aplicación de manera localizada. Cuando se encuentran presentes nanopartículas de oro en las células cancerígenas se produce estrés oxidativo en las mismas, así como daño en el ADN y efectos

sobre el ciclo celular. Se ha mostrado en estudios que es posible mejorar la ablación térmica por ondas de radio con ayuda de las nanopartículas (Taghizadeh et al., 2019).

### **1.3.3 Efecto tóxico de las nanopartículas**

Para poder determinar la biocompatibilidad de cualquier material es necesario realizar una serie de pruebas que permitan estudiar su comportamiento y evaluar si es preciso eliminar productos o componentes que puedan causar una lesión o daño en los tejidos u órganos del cuerpo humano. Existen tres fases de pruebas antes de que un producto sea considerado apto de salir al mercado y usarse en aplicaciones terapéuticas, siendo las primarias aquellas que evalúan la citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos celulares; son estas pruebas a las que se realiza un acercamiento en el presente proyecto. (Restrepo & Ardila, 2010)

Por otro lado, existen materiales que presentan actividad antibacterial y es preciso determinar esta actividad para conocer si, además de no generar un daño en el cuerpo humano, se puede generar un efecto preventivo a infecciones bacterianas o bien ayudar en el combate del presente aumento en la resistencia bacteriana a las sustancias antibacteriales actualmente empleadas (Ramírez Aristizábal & Marín Castaño, 2009).

En el caso particular de las nanopartículas de oro es importante analizar si interfieren en la viabilidad celular, ya que aún existe un debate sobre si estas partículas son totalmente seguras, ya que se han encontrado resultados donde se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), daño a la mitocondria e incluso necrosis (Bayat & Ghaidari, 2021). Si bien el oro elemental (con valencia cero) es considerado inerte se ha encontrado que en el caso de las nanopartículas la toxicidad puede depender del tamaño, la forma, la estructura cristalina y su composición superficial o conjugados presentes (Krishnamurthy et al., 2014).

#### *1.3.3.1 Actividad antibacterial*

Existen múltiples métodos que permiten evaluar la susceptibilidad *In vitro* de las bacterias ante agentes microbianos, sin embargo, cada uno de los métodos puede generar variantes en los resultados, por lo que debe elegirse el correcto para obtener los resultados adecuados. Estas variantes son dependientes del método, los microorganismos empleados e incluso el grado de solubilidad de cada uno de los compuestos evaluados (Ramírez Aristizábal & Marín Castaño, 2009).

Los principales métodos se clasifican en: métodos de difusión y métodos de dilución. En general es propuesto que se empleen los métodos de difusión si sabemos que la muestra a evaluar presenta compuestos polares principalmente; en cambio se sugiere emplear métodos de dilución cuando se evalúan muestras con compuestos polares y no polares. Independientemente de la metodología empleada se considera la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, de esta forma se evita el uso de una mayor cantidad de agente bactericida en algunas muestras y se evita una mayor dispersión en los resultados. Actualmente se ha estandarizado la concentración de bacterias usada en estudios de susceptibilidad en el laboratorio a  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (ufc)/mL. El método de macrodilución es un caso particular de los métodos de dilución, empleado para determinar el nivel de resistencia que se puede presentar hacia el extracto. En este método se busca establecer la concentración mínima inhibitoria, que es aquella dilución más alta a la que se previene el crecimiento bacterial. (Ramírez Aristizábal & Marín Castaño, 2009).

#### *1.3.3.2 Viabilidad celular*

El análisis de la viabilidad celular se realiza para determinar si una sustancia genera daño en cierta línea celular. Suelen evaluarse líneas no tumorales y líneas tumorales para estudiar la selectividad de los agentes estudiados.

Las células IMR-90 son fibroblastos de pulmón de un feto femenino humano de 16 semanas de gestación, comercializadas por la ATCC. No se les considera agentes de riesgo biológico. La línea HepG2 por su parte son derivadas de un carcinoma hepatocelular, bien diferenciadas, de un

hombre caucásico de 15 años de edad, también comercializadas por la ATCC. Al igual que las IMR-90 no se consideran de riesgo biológico.

Uno de los métodos más empleados para determinar los efectos citotóxicos, así como la viabilidad celular de emplear ciertas sustancias es el ensayo MTT.

#### *Ensayo MTT*

El ensayo MTT es un estudio realizado para evaluar los efectos citotóxicos de las sustancias. Está basado en la evaluación de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetitiazol-2-ilo)-2,5-difenitetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), con lo que se determina la funcionalidad mitocondrial de las células. De esta forma se mide la supervivencia y proliferación celular evaluando la cantidad de formazán producido (de Castro de Pardo, 2006).

## **1.4 Métodos de Síntesis**

Los métodos de síntesis para la obtención de nanopartículas, independientemente de la naturaleza de la misma son variados. Se presenta uno que se emplea en la obtención de nanopartículas metálicas, recientemente muy estudiado debido a la posibilidad de emplear extractos naturales que les otorguen propiedades extras a las mismas partículas de acuerdo a la aplicación deseada, así como disminuir el uso de agentes tóxicos en la obtención de dichas nanopartículas, este método se conoce como síntesis verde.

### **1.4.1 Síntesis Verde**

La química verde se encarga de desarrollar e innovar procesos químicos que permitan obtener materiales de tal forma que se evite el uso de compuestos tóxicos, se reduzca la energía empleada y se proteja al medio ambiente. Es aquí donde se desarrolla la síntesis verde. Como se menciona anteriormente la síntesis verde consiste en la reducción de un precursor metálico a través de medios naturales, como pueden ser extractos de plantas, algas, bacterias, hongos, etc. Algunos de los metales más explorados en las síntesis verdes son: cobalto, cobre, plata,

oro, paladio y platino (Parveen, Banse, & Ledwani, 2016; Santos-Espinoza et al., 2020; Vera et al., 2017).

En el caso de emplear extractos de plantas el proceso de síntesis consiste en mezclar el precursor metálico en solución con el extracto en una relación específica, ya sea en volumen o peso, permitiendo que pase un tiempo determinado para que se lleve a cabo la reacción. Se considera como un proceso de un solo paso ya que no es necesario realizar otros procedimientos para obtener las nanopartículas. Se puede modificar las características de las partículas aplicando agitación, modificación del pH de la reacción, aplicación de temperatura entre otros (Parveen et al., 2016). Los polifenoles, grupo más grande de antioxidantes existente, se consideran como uno de los principales participantes en la síntesis y estabilización de las nanopartículas en la síntesis verde (Latif M S, Abbas S, Kormin F, & Mustafa MK, 2019; Santos-Espinoza et al., 2020; Vera et al., 2017).

De acuerdo con la literatura, los polifenoles deben su potencial reductor a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura. Este potencial reductor les confiere la capacidad de actuar de manera importante en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. Este tipo de síntesis dependerá del elemento metálico que se emplee, así como del extracto utilizado; esto se debe a que el potencial reductor global del extracto dependerá de la cantidad de polifenoles presentes en el mismo, siendo esto responsable de la reducción y estabilización de las nanopartículas. Debido a esto los polifenoles se consideran como compuestos de gran importancia en la síntesis verde (Santos-Espinoza et al., 2020).

El principal beneficio de la síntesis verde es evitar el uso de reactivos tóxicos, además de ser un método efectivo en relación al costo para sintetizar estos materiales ya que es posible aprovechar sustancias que se pueden considerar como “residuos” (Krishnamurthy et al., 2014; Priya M R & Iyer, 2020). Además, las nanopartículas obtenidas por medio de la síntesis verde presentan una toxicidad significativamente baja, lo que brinda la posibilidad de un mayor uso en aplicaciones de medicina (Santos-Espinoza et al., 2020).

## Capítulo 2.- Materiales y metodología

La extracción de los compuestos activos de la *Annona cherimola* Mill. fue la primera instancia del proyecto, se realizó la evaluación de sus propiedades. Posteriormente se emplearon los extractos en la síntesis de AuNP. Como última etapa se evaluaron las propiedades de las nanopartículas, así como algunas posibles aplicaciones de las AuNP obtenidas y de los extractos.

### 2.1 Extractos

Se realizó la extracción de los metabolitos secundarios de la *Annona muricata* (Guanábana) y de la *Annona cherimola* (Chirimoya). Esta extracción se llevó a cabo empleando distintos métodos: extracción con equipo Soxhlet, extracción por maceración y extracción asistida por ultrasonido (UAE). Una vez realizadas las extracciones se hizo la comparación de los métodos empleados; para esto, se evaluaron los rendimientos de extracción proporcionados por las distintas técnicas, así como diferentes propiedades empleando distintos métodos de caracterización: Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia FTIR y Voltametría diferencial de pulso. De igual manera se analizaron las diferencias de los extractos de acuerdo a los solventes empleados. Las propiedades caracterizadas fueron capacidad antioxidante, cantidad de compuestos fenólicos y cantidad de flavonoides, debido a que estas propiedades y compuestos pueden representar un beneficio importante en las distintas aplicaciones donde se empleen dichos extractos.

#### 2.1.1 Métodos de extracción

Para la chirimoya se utilizaron los métodos de extracción por soxhlet, maceración en frío y UAE, mientras que para la guanábana solo se empleó la técnica de extracción por soxhlet, ya que el extracto de guanábana únicamente funcionó como un comparativo con el extracto de chirimoya. Los solventes usados fueron agua desionizada y etanol grado reactivo por separado. En la tabla 1 se muestran las diferentes condiciones empleadas para las extracciones, así como la clave para identificarlas.

Tabla 1.- Condiciones empleadas para realizar las extracciones de las especies de Annonaceae.

Tipo de extracción	Hojas usadas	Solvente	Muestra	Tiempo	Amplitud (%)	Rendimientos (%)	
Soxhlet (SX)	Guanábana	Agua	GW-SX	48 horas	NA*	28.3	
		Etanol	GE-SX			12.8	
	Chirimoya	Agua	CW-SX			28.4	
		Etanol	CE-SX			12.5	
Maceración (MC)	Chirimoya	Agua	CW-MC	7 días	NA*	8.7	
		Etanol	CE-MC			3	
Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	Chirimoya	Agua	CW-US13	5 min	100	12.7	
			CW-US16	10 min		12.4	
			CW-US19	15 min		11.9	
			CW-US73	5 min		9	
			CW-US76	10 min		75	11.7
			CW-US79	15 min		11.8	
		Etanol	CW-US53	5 min	0.8		
			CW-US56	10 min	50	1.3	
			CW-US59	15 min	3.6		
			CE-US13	5 min	5		
			CE-US16	10 min	100	3.9	
			CE-US19	15 min	3.5		
			CE-US73	5 min	1.8		
CE-US76	10 min	75	2.7				
CE-US79	15 min	3.2					

CE-US53	5 min		0.8
CE-US56	10 min	50	1.3
CE-US59	15 min		2.8

\*No aplica para extracción por soxhlet ni maceración.

Las primeras dos letras indican la especie utilizada en la extracción y el solvente de la misma. La G es utilizada para la *Annona muricata* mientras que la C es *Annona cherimola*; la W es utilizada para indicar el uso de agua mientras que la E es empleada para indicar que el etanol fue utilizado. Las siguientes dos letras indican la técnica, SX es soxhlet, MC maceración y US es ultrasonido.

Dentro de la técnica UAE, los números indican la variación en las condiciones de los experimentos, el primer número indica la amplitud utilizada, 1=100%, 7=75% y 5=50%, mientras que el segundo número indica el tiempo, 3=5 min, 6=10 min y 9=15 min.

Para realizar todos los procesos de extracción se lavaron las hojas con agua y jabón, sin aplicar trabajo mecánico, posteriormente se secaron las hojas a 40 °C en un horno convencional. Una vez secas, las hojas se molieron utilizando una licuadora convencional; después se pulverizaron en un molino de café. Una vez en polvo se procedió a realizar la extracción como se describe a continuación.

#### 2.1.1.1 Extracción por Soxhlet

La extracción por soxhlet consiste en un reflujo del solvente a emplear en punto de ebullición, que posteriormente es condensado sobre la muestra para generar la extracción y el extracto se concentra en un matraz bola. Para realizar el procedimiento se utilizó el polvo de las hojas de la Chirimoya y Guanábana por separado. Diez gramos de polvo se colocaron dentro de un cartucho de papel filtro. Este cartucho se introdujo dentro de la cámara del equipo soxhlet. Se utilizaron 150 mL de solvente que se depositaron en el matraz bola. El matraz se calentó empleando una mantilla de calentamiento, dentro del matraz, junto al solvente, se colocaron 18 perlas de ebullición de sílice para contribuir a la estabilidad de la temperatura. El solvente se

llevó al punto de ebullición y el procedimiento se mantuvo por 48 horas hasta agotar la muestra. Una vez terminado el procedimiento, el extracto se dejó enfriar y se guardó en frascos ámbar en condiciones de refrigeración hasta su uso en los diferentes procedimientos.

#### *2.1.1.2 Extracción por maceración*

La extracción por maceración es uno de los métodos más antiguos y consiste en colocar el polvo de las hojas dentro del solvente y dejar en reposo. Para esto se armaron cartuchos de papel filtro con 10 g de hojas en polvo, al igual que en el caso de extracción por soxhlet. Este cartucho se colocó dentro de 150 ml de solvente en un vaso de precipitado. El vaso se selló y se mantuvo en condiciones ambientales durante 7 días. Una vez finalizados los días se almacenó en frascos ámbar y en refrigeración hasta su posterior uso.

#### *2.1.1.3 UAE*

Para el procedimiento de extracción asistido por ultrasonido (UAE) se utilizó un homogeneizador ultrasónico portátil UP200Ht de Hielscher. Se empleó un gramo de polvo de hojas y 15 mL de solvente para cada una de las pruebas. Como se muestra en la tabla 1 se variaron condiciones en cada muestra buscando las mejores para igualar o estar próximo a rendimientos de técnicas tradicionales como el Soxhlet y la maceración.

Para este procedimiento se redujeron las cantidades empleadas de solvente y polvo de hojas, debido a la cantidad tan amplia de muestras a realizar y con la finalidad de maximizar el aprovechamiento de los recursos disponibles, sin embargo, se mantuvo la relación de muestra:solvente. Se emplearon tubos falcón para incrementar la zona de contacto entre el sonotrodo del equipo y el solvente.

El proceso consistió en colocar el polvo de las hojas en el solvente de manera directa, el sonotrodo se introdujo en esta mezcla y se aplicó el ultrasonido durante el tiempo especificado en la tabla uno, así como la amplitud. Una vez concluido este procedimiento cada muestra se filtró y se guardó en frascos ámbar, en condiciones de refrigeración.

### 2.1.2 Secado

El procedimiento de secado es igual para todas las muestras. Se realizó una concentración utilizando un rotavapor BUCHI, bajo condiciones seleccionadas de acuerdo al solvente que se deseaba eliminar. El proceso se mantuvo aproximadamente 5 minutos. Una vez concentrado se depositó en una caja Petri y se colocó en un desecador a vacío durante 3 días. Ya que estaba seco, se raspó de la caja Petri, para poderlo emplear en las pruebas donde se requirió el extracto seco, además de medir el rendimiento de extracción de cada una de las técnicas.

### 2.1.3 Análisis espectroscópico de los extractos de las especies de *Annonaceae* (FT-IR y UV-Vis)

Se obtuvo el espectro FT-IR de los extractos secos. Se empleó un equipo Perkin Elmer Spectrum Two (Figura 9) para obtener la reflexión atenuada total (ATR) de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Con esto se obtuvieron los modos vibracionales característicos de los principales grupos presentes en la pasta formada por los extractos de las especies *Annonaceae* una vez que se secan. Los resultados se compararon con la densidad teórica funcional (DFT). Esta simulación se realizó sobre las principales acetogeninas presentes en las especies *Annona cherimola* Mill. y *Annona muricata* L.



Figura 9.- Equipo empleado para las pruebas FT-IR

Los cálculos de las frecuencias teóricas de las dos acetogeninas, bullatacina y aromina fueron realizados utilizando el software Gaussian. La geometría de ambas moléculas se optimizó asumiendo una celda de integración numérica ultrafina, sin restricciones de simetría y a una temperatura de 278 K, empleando el funcional híbrido Becke 3-Lee-Yang-Par (B3LYP).

Una vez obtenida la geometría adecuada y no teniendo vibraciones imaginarias se consideró como óptima la simulación y se pudieron analizar las vibraciones teóricas empleando el software Gaussian View para compararlas con los datos experimentales.

También se obtuvo el espectro UV-Vis de cada muestra, los resultados obtenidos permitieron determinar las mejores condiciones de la extracción UAE, también se compararon los métodos de extracción. Para la caracterización UV-Vis todas las muestras se diluyeron en una relación 1:200 v/v y se empleó una celda de cuarzo. El equipo para realizar estas mediciones fue un espectrómetro VWR 1600-PC (Figura 10). De igual forma que en el caso de FTIR se empleó una simulación para obtener el espectro UV-Vis teórico de la Aromina, una de las acetogeninas presentes en la *Annona cherimola* Mill. de acuerdo a la literatura. Este espectro teórico se comparó con los resultados experimentales.



Figura 10.- Equipo empleado para las pruebas UV-Vis

#### **2.1.4 Capacidad antioxidante**

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos realizados de la Guanábana y la Chirimoya. Para esto se emplearon las metodologías listadas a continuación, con ácido ascórbico como estándar para la realización de las curvas de calibración, empleando concentraciones de 100, 200, 400, 600 y 800  $\mu\text{M}$ .

##### *2.1.4.1 DPPH*

El método de evaluación de actividad antioxidante DPPH se nombra de esta manera al realizarse por la acción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidricilo (DPPH por sus siglas en inglés).

Para la medición se requirió una solución de DPPH con una concentración  $50\mu\text{M}$  en metanol “bufereado”. El metanol “bufereado” se preparó con una solución de 100 mL donde 40 mL son de buffer acetato (0.1 M, pH 5.5) y 60 mL de metanol. Utilizando este metanol se preparó la solución de DPPH.

En el caso de los extractos de Guanábana y Chirimoya se realizó una dilución de 1:100 v/v antes de colocar 150  $\mu\text{L}$  de extracto diluido con 2850  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH. Se dejó incubar durante 30 minutos en la oscuridad, transcurrido este tiempo se realizó la medición de la absorbancia a 515 nm usando el espectrómetro UV-Vis.

##### *2.1.4.2 Capacidad Antioxidante Reductora CUPrica (CUPRAC)*

El método de medición de la Capacidad Antioxidante Reductora CUPrica (CUPRAC, por sus siglas en inglés) consiste en realizar la medición de la absorbancia que genera el complejo Cu(I)-Neocuproina, que se genera una vez que se produce la reacción REDOX entre los antioxidantes presentes en la muestra y el reactivo CUPRAC. La absorbancia se mide en la longitud de onda de 450 nm mediante un equipo UV-Vis (Özyürek et al., 2011).

La metodología seguida fue la desarrollada por Apak (Apak, Güçlü, Özyürek, & Karademir, 2004). El reactivo CUPRAC está constituido por 1 mL de cloruro de cobre ( $10^{-2}$  M), 1 mL de solución de neocuproina ( $7.5 \times 10^{-3}$  M) y 1 mL de buffer acetato de amonio (1 M, pH 7). El

reactivo CUPRAC se mezcló con 100  $\mu$ L de extracto diluido. Para este ensayo los extractos se diluyeron en una relación 1:400 v/v con agua destilada. La solución formada se dejó en reposo durante 1 hora. Y finalmente la absorbancia se midió a la longitud de onda antes mencionada.

#### *2.1.3.3 Poder antioxidante/reductor del hierro (FRAP)*

El ensayo del Poder antioxidante/reductor del hierro (FRAP, por sus siglas en inglés) consiste en la reducción de iones férricos a ferrosos en un pH bajo, partiendo de un complejo ferroso-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) que se reduce a  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , que tiene un color azul intenso con una absorción máxima en 593 nm de longitud de onda. Esta prueba ofrece una caracterización de bajo costo para las propiedades antioxidantes o reductoras de diferentes soluciones o compuestos (Benzie & Strain, 1996).

El procedimiento seguido es el dado por Benzie y Strain, donde se usó un reactivo FRAP formado por buffer acetato (300mM, pH3.6), TPTZ (10mM) en HCl (40mM) y  $\text{FeCl}_3$  (20mM) en una relación de volumen 10:1:1, respectivamente. Se utilizaron 3 mL del reactivo FRAP y se mezclaron con 100  $\mu$ L de extracto diluido. Esta dilución se hizo en una relación 1:100 v/v. Esta solución se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 10 minutos. Una vez terminado este tiempo, la absorbancia se midió a 593 nm en un espectrómetro UV-Vis (Benzie & Strain, 1996).

En la tabla 2 se resumen las condiciones, así como los parámetros obtenidos una vez que se realizaron los ajustes lineales a las curvas de calibración de cada una de las técnicas antes mencionadas para la medición de la capacidad antioxidante. Para los ajustes lineales las curvas se graficaron en Origin y se realizó el ajuste lineal preestablecido del programa, obteniendo una buena aproximación.

Tabla 2.- Condiciones empleadas para la realización de las curvas de calibración de cada técnica, así como los parámetros obtenidos a partir del ajuste lineal de las mismas.

	DPPH	CUPRAC	FRAP
$\lambda_{\max}$ (nm)	517	450	593
Concentración		100 – 800 $\mu$ M	
Pendiente	$-3.2829 * 10^{-4}$	$2.0121 * 10^{-4}$	$1.6296 * 10^{-4}$
Intercepción	-0.2841	-0.1163	-0.0748
Coefficiente de correlación	0.9702	0.9845	0.9140

### 2.1.5 Determinación del Contenido Total de Fenoles (TPC) y el Contenido Total de Flavonoides (TFC)

Es preciso no solo evaluar la capacidad antioxidante de los extractos, sino que es necesario conocer la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides que están presentes en dichos extractos. Para esto se utilizaron dos técnicas espectroscópicas distintas, empleando celdas de cuarzo y el equipo UV-Vis VWR 1600-PC para el análisis de los resultados.

En el caso del contenido total de fenoles se empleó el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo a la norma ISO 14502-1-2005 E (Agbor, Vinson, & Donnelly, 2014). Para realizar las mediciones el extracto se diluyó en una relación 1:100 v/v. Empleando 1 ml de los extractos diluidos se procedió a mezclar con 5 mL de solución Folin-Ciocalteu al 10% y con 4 mL de solución de carbonato de sodio (7.5% w/v). Una vez mezclados se dejó en reposo durante una hora y se midió la absorbancia al final de este tiempo, empleando la longitud de onda de 765 nm en el equipo UV-Vis.

Para este análisis se empleó ácido gálico como estándar para la curva de calibración, empleando una concentración máxima para la curva de 50  $\mu$ g/mL. Por lo tanto, los resultados se expresan como microgramos por mililitro de ácido gálico equivalente. ( $\mu$ g/mL GAE).

Para el caso de la medición del contenido total de flavonoides se empleó el procedimiento descrito por Baba y Malik (Baba & Malik, 2015) con algunas modificaciones. Al igual que en el

caso de fenoles totales, se diluyo en un principio el extracto empleando una relación 1:100 v/v. Se tomaron 125  $\mu\text{L}$  del extracto diluido y se mezclaron con 75  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{NaNO}_3$  al 5% y se dejó en reposo durante 6 minutos. Posteriormente se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de solución  $\text{AlCl}_3$  al 10% y se dejó en reposo durante 5 minutos. Finalmente 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  (1M) se añadieron y se ajustó el volumen a 2500  $\mu\text{L}$  en total con agua destilada. La solución final se dejó en reposo durante 15 minutos y se midió la absorbancia, una vez pasado el tiempo, empleando 510 nm de longitud de onda en el espectrómetro UV-Vis.

El estándar empleado para la medición del contenido de flavonoides fue quercetina y, de la misma forma que con el ácido gálico, la concentración máxima fue de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por lo tanto, los resultados se muestran como microgramos por mililitro de quercetina equivalente ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  QE)

En la tabla 3 se muestran los parámetros que se obtuvieron al emplear el ajuste lineal de las curvas de calibración de ambos procedimientos antes descritos, así como las condiciones utilizadas para la medición de la absorbancia.

*Tabla 3.- Parámetros obtenidos por el ajuste lineal a la curva de calibración de TPC y TFC y condiciones usadas en la medición de la absorbancia.*

	<b>Contenido Total de Fenoles (TPC)</b>	<b>Contenido Total de Flavonoides (TFC)</b>
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	765	510
Estándar	Ácido gálico	Quercetina
Rango de concentración	10-50 $\mu\text{L}$	
Pendiente	0.0105	0.0058
Intercepción	-0.0014	-0.0381
Coefficiente de correlación	0.9956	0.9587

### **2.1.6 Análisis electroquímico del contenido total fenólico (e-TPC) y el contenido total de flavonoides (e-TFC)**

Con la finalidad de dar mayor validez a los resultados obtenidos a partir de los análisis espectroscópicos se realizaron análisis electroquímicos del contenido total fenólico y del contenido total de flavonoides por medio de voltametría diferencial de pulso (DPV, por sus siglas en inglés).

La DPV ha mostrado ser una técnica rápida y precisa para la determinación y diferenciación de ácidos fenólicos y flavonoides, empleando un electrodo de carbón vitreo en valores de pH de 2 y 7.5 respectivamente.

Las mediciones de DPV se realizaron en una celda de tres electrodos: Carbón vitreo, Platino y Ag/AgCl (saturado con KCl) se usaron como electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia respectivamente. Entre mediciones el electrodo de trabajo fue pulido utilizando alúmina nanométrica seguido de un baño ultrasónico por 10 minutos, todos los procedimientos se hicieron por triplicado.

Como electrolito de soporte se empleó el Buffer Britton Robinson (Solución stock de ácido bórico, ácido fosfórico y ácido acético 4mM) ajustándolo a dos pH distintos, como se menciona anteriormente, para el caso de la medición de contenido total fenólico se empleó pH 2 con HCl y para la medición de contenido total de flavonoides se ajustó a 7.5 empleando NaOH para dicho ajuste.

Los voltamperogramas fueron obtenidos empleando un potenciostato Bio-Logic VP-50 y el software de adquisición de datos fue el EC-Lab. Para el análisis se empleó una velocidad de escaneo de 5 mV/s y una amplitud de pulso de 70 mV.

Como estándares para la obtención de curvas de calibración se usaron ácido gálico, en el caso de fenoles, y quercetina para la estandarización de flavonoides, de tal forma que podemos comparar los resultados obtenidos en las técnicas espectroscópicas y electroquímicas. La curva de calibración se obtuvo en términos de corriente ( $\mu\text{A}$ ) contra concentración ( $\mu\text{M}$ ) y los

resultados se expresan como microgramos de ácido gálico equivalente por mililitro de extracto ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  GAE) y microgramos de quercetina equivalentes por mililitro de extracto ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  QE).

Para la medición se utilizaron 4 mL de electrolito soporte (Buffer Briton Robinson) y 1 mL del estándar o bien del extracto, dependiendo si era una medición para la formación de la curva de calibración o una medición de las muestras seleccionadas para analizarse por medio de esta técnica.

### **2.1.7 Determinación de la presencia de acetogeninas (HPLC)**

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) es un método ampliamente utilizado para estudiar mezclas, por su capacidad de identificar y cuantificar compuestos presentes en una muestra. Es una técnica muy empleada en industrias como la farmacéutica, bioquímica, química forense, alimentaría, entre otras.

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta quien emplea esta técnica es la selección de parámetros de medición, ya que estos dependen de la información que se desea obtener, así como de las propiedades de la mezcla en sí. La técnica consiste en la interacción de dos fases inmiscibles entre sí, la fase móvil y la estacionaria, con la mezcla a analizar. Esto permite la separación y análisis de los componentes químicos de dicha mezcla. La función de la fase móvil, que siempre es líquida, es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida, y por diferentes fuerzas e interacciones los compuestos que están en la mezcla se detienen, a diferentes tiempos, debido a la afinidad de dichos compuestos con la fase estacionaria; estos tiempos se conocen como tiempos de retención. (Suarez Ospina & Morales Hernández, 2018)

Antes de realizar las mediciones es preciso establecer ciertos parámetros que se eligen a partir de las propiedades de la mezcla y de las metas de separación que se tengan. Entonces es necesario determinar el número de compuestos presentes, o una aproximación, la estructura química de los mismos, así como su espectro UV. También se debe conocer la solubilidad de la muestra para elegir el solvente más adecuado, así como las fases a emplear. (Suarez Ospina & Morales Hernández, 2018)

Para determinar la presencia de acetogeninas en los extractos acuosos y etanólicos de la *Annona cherimola* Mill se empleó el protocolo establecido por Yang y colaboradores (Yang et al., 2010). La cromatografía se realizó empleando un HPLC Waters 600S, equipado con una columna fase reversa RP-C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) acoplado a un detector de red de diodos. Para el análisis 1 mg de extracto seco fue reconstituido en 1 mL de una solución metanol: agua 85:15 (v/v), filtrando con una jeringa de nylon Acrodisc de 0.45 µm. La fase móvil consiste de la fase A (metanol) y la fase B (agua), siguiendo las siguientes condiciones de gradiente: 85% fase A por 40 minutos, seguido de 85-95% fase B por 20 minutos. La velocidad del flujo se estableció en 1 mL/min y la longitud de onda de detección en 220 nm.

## 2.2 Nanopartículas metálicas

La síntesis de nanopartículas metálicas se realizó mediante la reducción del  $\text{HAuCl}_4$  con los extractos acuosos y etanólicos, sin secado previo. Este método de síntesis se conoce como síntesis verde ya que se evita el uso de compuestos considerados como tóxicos. Para el procedimiento se utilizó  $\text{HAuCl}_4$  trihidratado de la marca Sigma-Aldrich.

### 2.2.1 Síntesis

Para el procedimiento de síntesis de nanopartículas de oro se utilizaron tanto los extractos acuosos como los etanólicos obtenidos de la *Annona cherimola* Mill. El procedimiento consiste en mezclar una solución 5 mM de  $\text{HAuCl}_4$  con el extracto a evaluar. Los extractos utilizados fueron los obtenidos por UAE en condiciones de 5 minutos de tiempo con 100% de amplitud.

Se realizaron pruebas con distintas relaciones extracto: $\text{HAuCl}_4$  en volumen. Inicialmente se evaluó el extracto etanólico en estas concentraciones, debido a la posibilidad de que las acetogeninas (metabolito de interés de la *Annona Cherimola* Miller) tenga una mayor presencia en estos extractos, de acuerdo a lo reportado en la literatura. Las relaciones probadas en v:v se enumeran en la tabla 4

Tabla 4.- Relación H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>:Extracto de las muestras realizadas por síntesis verde.

Nombre de la muestra	Extracto empleado	Relación H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> :Extracto
Et2:1		2:1
Et1:1	CE-US13	1:1
Et1:2		1:2

Una vez mezclado el H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub> con el extracto se dejó en agitación magnética por 2 horas. Una vez finalizado ese periodo de tiempo se dejó en reposo durante 24 horas para permitir que se complete la reacción. Después se analizó el espectro UV-Vis para observar el plasmón característico de las nanopartículas de oro. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó la muestra Et2:1 como la mejor, por lo que se procedió a emplear la relación 2:1 H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>:Extracto en volumen con todas las pruebas restantes.

Posterior a esto, se hizo la comparación entre extractos. Se realizó una síntesis con el extracto acuoso empleando la relación antes mencionada, el proceso fue exactamente igual al antes descrito. Una vez finalizada la síntesis se midió el espectro UV-Vis. A esta muestra se le denominó Aq2:1.

Tanto la síntesis Et2:1 como la Aq 2:1 se lavaron, para esto se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue desechado mientras que el precipitado se dispersó en agua desionizada utilizando un baño ultrasónico durante 30 minutos.

Una vez lavadas las muestras se midió el tamaño de partícula por DLS, se analizó el potencial Zeta y se observó la morfología utilizando un MEB. De igual forma se obtuvo el patrón de difracción por DRX y la señal IR para observar los grupos orgánicos presentes en las partículas, que permanecen después del lavado.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó modificar el pH de la síntesis buscando obtener una mejor distribución de tamaños y una mayor estabilidad que la observada en el potencial Zeta. Para estas modificaciones se usaron soluciones de NaOH a diferentes pH, 10, 12 y 14. Las pruebas realizadas se enlistan en la tabla 5.

Tabla 5.- Muestras modificadas por solución de NaOH con distintos pH.

Nombre de la muestra	Extracto empleado	Relación	pH solución NaOH
		HAuCl <sub>4</sub> :Extracto:solución NaOH	
Aq2:1 10		2:1:1	10
Aq2:1 12	CW-US13	2:1:1	12
Aq2:1 14		2:1:1	14

Al igual que con las muestras anteriores una vez finalizado el procedimiento se obtuvo el espectro UV-Vis. Se seleccionó la modificada con pH de 12 como la mejor para realizar el proceso de lavado, la medición de tamaño de partícula y el potencial Zeta. Además, se observó la morfología utilizando el MEB.

## 2.3 Caracterización

Las pruebas mencionadas en la sección de caracterización, así como las preparaciones mencionadas, corresponden a los análisis realizados sobre las nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde.

### 2.3.1 Caracterización Composicional

Las distintas técnicas de caracterización composicional permiten definir cuáles son los compuestos, o bien la composición elemental, que conforma a un material o sustancia. Para esto existen técnicas cualitativas, que permiten conocer solo la composición; y técnicas cuantitativas que permiten definir la cantidad de cada compuesto presente en la muestra. Estas técnicas pueden ser por radiación incidida sobre la muestra, en las que se puede medir la absorbancia o la transmitancia de la energía que se hace incidir en el mismo, o bien por descomposición de la misma en partes elementales, de tal manera que sea posible definir lo que se tiene en un material.

### *2.3.1.1 Espectroscopía Ultra Violeta-Visible*

La espectroscopía UV-Vis utiliza la radiación del espectro electromagnético que se encuentra entre los 100 y 800 nm de longitud de onda. Al incidir la radiación de dicha longitud sobre los electrones de la materia se provoca una excitación del estado de energía, por lo que pasa de un estado basal a uno excitado. Este proceso genera un gráfico, llamado espectro, donde se muestra una señal por cada transición electrónica del estado fundamental al excitado, si se trata de un átomo veremos líneas agudas, mientras que las moléculas poliatómicas dan señales en forma de bandas ya que la energía utilizada puede dar paso a otros fenómenos como vibración o rotación. (Litter, Armienta, & Farías, 2009)

Para el análisis de las nanopartículas se empleó un espectrómetro 1600 PC de VWR, empleando cubetas de cuarzo. Se diluyeron las nanopartículas, tomando 100 microlitros en 3 mL de agua desionizada para realizar el análisis. El blanco empleado fue agua desionizada y se realizó la medición con un paso de 1 nm, en el espectro de 800 a 200 nm.

### *2.3.1.2 Espectroscopía Infrarroja*

La espectroscopia infrarroja permite realizar un análisis cualitativo de la composición de un material, de acuerdo con la absorción de radiación infrarroja de los grupos funcionales presentes en la sustancia o material. La detección de las ondas infrarrojas se da en el infrarrojo cercano, o bien, en el infrarrojo medio, dependiendo del detector del equipo; cada grupo funcional presente en los materiales orgánicos muestra una acción diferente al ser sometido a la radiación infrarroja, lo cual manda una señal que funciona como identificador de dicho grupo (Nicolet, 2001).

Para realizar este análisis sobre las nanopartículas se secaron a 50 °C, de esta forma se elimina el agua, pero se evita el daño a los compuestos orgánicos presentes. La medición se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer Spectrum Two para obtener la reflexión atenuada total (ATR) de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  teniendo las muestras en polvo.

## **2.3.2 Caracterización estructural**

### *2.3.2.1 Morfología*

Para el estudio de la morfología de los materiales se emplean métodos de microscopía electrónica, donde la resolución es mil veces mayor que en un microscopio óptico, lo que permite alcanzar tamaños de nanómetros. Tanto para la microscopía electrónica de barrido como para la de transmisión es necesario realizar el análisis en condiciones de bajo vacío, para no generar ruido en la señal por interferencia del aire con el rayo de electrones (Fahlman, 2007).

#### *Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)*

La microscopía electrónica de barrido utiliza un filamento que puede ser de distintos materiales (tungsteno, hexaboruro de lantano, hexaboruro de cerio, etc.); este filamento se calienta hasta superar la función de trabajo del material y generar liberación térmica de electrones (emisión termoiónica). Estos electrones se enfocan mediante lentes electromagnéticas y se aceleran a través de la columna del microscopio hasta la muestra, donde los electrones interactúan con los átomos de la misma y producen diferentes tipos de dispersión, lo que da diferentes señales e información (Fahlman, 2007).

En el caso de las nanopartículas de oro se depositó una gota de las nanopartículas ya lavadas en suspensión sobre una rejilla de Cu con membrana de carbón ultradelgada de malla 300. Se dejó secar en condiciones ambientales y una vez seco se procedió a la observación en el equipo.

El equipo empleado fue un microscopio electrónico de barrido SEM/STEM Hitachi SU8230 con filamento de emisión de cátodo frío. El análisis se realizó a 30 kV, con distancia de trabajo de 7.9mm y ampliaciones de x20, x50, x100, x200 y x400.

### *2.3.2.2 Tamaño promedio de partícula*

#### *Dispersión de Luz*

La dispersión de la luz por partículas se produce mediante diferentes fenómenos. Si las partículas tienen un tamaño menor a la décima parte de la longitud de onda utilizada la dispersión producida no dependerá de la dirección en que incide la luz, lo que provocará una dispersión elástica, también conocida como Rayleigh. Si la partícula tiene un tamaño menor entonces si habrá una modificación en la energía y la dispersión dependerá de la posición donde se incida, efecto conocido como dispersión Mie. Las partículas que se encuentran en un sistema coloidal provocan una dispersión de un láser que incide sobre ellas, la intensidad de la luz dispersada es detectada por el DLS. En general el equipo consta de tres partes: láser, muestra y detector de luz. El láser otorga la fuente de luz monocromática con una estabilidad elevada; tiene un atenuador que permite la modificación de la potencia del láser. La muestra se coloca en celdas de vidrio o de plástico desechable que son traslúcidas, y dicha muestra debe estar limpia, ser homogénea y transparente sin precipitaciones; normalmente el volumen utilizado ronda entre 1 y 2 mL. La preparación de la muestra es importante para obtener buenos resultados en el análisis. El primer paso es la selección del solvente, debe interferir lo menos posible con la muestra y ser capaz de suspender de manera adecuada las partículas de tal manera que las muestras sean claras y homogéneas. Respecto a la concentración de la muestra no debe ser muy alta ni muy baja. En el caso de que sea demasiado alta esto puede provocar un resultado donde el tamaño de partícula sea menor por múltiple dispersión de la luz lo que disminuye su intensidad antes de llegar al detector, además de la posible aglomeración y precipitación que se puede provocar. En cambio cuando es muy baja la dispersión puede no ser suficiente para generar una medición (Bhattacharjee, 2016).

Para la medición del tamaño de partícula se empleó DLS; para esto se utilizó el equipo Litesizer 500. Se tomaron 100  $\mu$ L de cada muestra y se dispersaron en 1 mL de agua desionizada. Se utilizó la cubeta Univette que permite la medición del tamaño de partícula y el potencial Zeta sin necesidad de cambiarla.

### *2.3.2.3 Análisis térmico*

#### *Análisis Termogravimétrico*

Los análisis térmicos se realizan estudiando una propiedad de una muestra que puede verse modificada con relación a la temperatura y el tiempo, ya sea en una atmosfera específica o con cambios programados de la temperatura. Particularmente en el análisis termogravimétrico se lleva el registro de la pérdida de peso de la muestra conforme se incrementa la temperatura. Normalmente se realizan bajo condiciones controladas de calentamiento y pueden emplearse diferentes atmosferas de reacción. (Manals-Cutiño, Penedo-Medina, & Giralt-Ortega, 2011)

Es común no solo utilizar la curva TGA para la interpretación de los fenómenos ocurridos en nuestra muestra; algunas de las curvas empleadas son: La primera derivada (DTG) que proporciona la velocidad de la variación de la muestra; la curva SDTA que muestra los procesos exotérmicos o endotérmicos y la EGA (Evolved Gas Analysis) que permite el análisis de los gases y vapores liberados. La mayoría de curvas TGA presentan pérdidas de peso, que se originan en reacciones químicas de descomposición, combustión entre otras, y en transformaciones físicas como la evaporación, la sublimación, desorción u otros (Widmann, 2001).

Se realizó un análisis TGA en un equipo Mettler Toledo TGA/DSC Model 2 Stare System, para obtener la concentración obtenida de nanopartículas en solución. Para esto se calentó hasta 250 °C para evaporar el agua y carbonizar los compuestos orgánicos. Obteniendo el contenido total de oro en peso.

### *2.3.2.4 Potencial Zeta*

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la carga electrostática o la carga de atracción-repulsión entre partículas. Esta propiedad afecta directamente a la estabilidad lo que se traduce en dispersión o agregación de las partículas, afectando en el caso de dispersiones, emulsiones o suspensiones. El control de este potencial tiene importantes aplicaciones en diferentes industrias, como la farmacéutica, la medicina, los electrónicos entre otros (Malvern Panalytical, 2018).

El potencial Zeta de las partículas en solución se midió en el equipo Litesizer 500. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se dispersaron en 1 mL de agua desionizada. Se utilizó la cubeta Univette que permite la medición del tamaño de partícula y el potencial Zeta sin necesidad de cambiarla.

Con el potencial Zeta se determinó la estabilidad de las partículas en solución en distintos pH. Se emplearon pH ácidos de 3 y 5, pH neutro de 7 y básicos de 9 y 11.

#### *2.3.2.5 Cristalinidad*

##### *Difracción de Rayos X*

La técnica de difracción de rayos X se emplea para estudiar la cristalinidad de los materiales. Para esto se emplea radiación X, que es producida cuando una partícula de masa pequeña con alta energía, particularmente energía cinética, incide en un elemento material. Esta colisión genera una perturbación en la materia que genera dicha radiación. Normalmente se emplean electrones como partículas de alta energía.

La difracción de rayos X es un caso particular la radiación dispersa coherente, básicamente se trata de un proceso de interferencias constructivas, que se produce en direcciones concretas del espacio. Esto permite definir el tipo de estructura presente, así como la dirección de crecimiento dominante en la misma.

El análisis de Difracción de Rayos x se realizó con la muestra en polvo, secándola a 50 °C, el estudio se realizó por polvos cualitativos empleando la longitud de onda de 1.54Å, correspondiente a la radiación del cobre. El intervalo de medición es de 5 a 80° en  $2\theta$  con una velocidad de 10°/min con DTeX y de 2°/min con Centelleo. Esto se realizó en un difractómetro Rigaku modelo Ultima IV.

## 2.4 Actividad antitumoral

Para la actividad antitumoral se empleó el ensayo MTT, se emplearon 3 líneas celulares diferentes: IMR-90 (Fibroblastos de pulmón, no tumoral), MCF-7 (cáncer de mama), HepG2 (Hepatocarcinoma).

Se evaluó el extracto acuoso y las nanopartículas de oro obtenidas con extracto acuoso. Se emplearon 96 pocillos con medio DMEM, suplementado con SFB al 10% y 1% de antibiótico/antifúngico, se dejaron las células durante 24 horas a 37 °C con el 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas se aplicaron los tratamientos, manteniendo el medio y el antibiótico, mientras que el SFB se cambió al 2% por otras 24 horas. Pasado el tiempo se retiró el tratamiento y se administraron 150 µL de MTT en solución con una concentración de 0.5 mg/mL en DMEM, esto se incubó durante 4 horas. Se retiró el medio y se adicionaron 100 µL de DMSO, dejándolo en agitación durante 16 horas. Por último, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm.

Como control negativo se empleó el medio DMEM y todas las pruebas se realizaron por triplicados. El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo con la ecuación 1:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia tratamiento}}{\text{Absorbancia contro negativo}} * 100 \text{ ----- (1)}$$

## 2.5 Actividad antibacterial de los extractos etanólicos de *Annona cherimola* Miller

La actividad antibacterial de los extractos se midió empleando el método de macrodilución en tubo. Las pruebas se realizaron en tres experimentos independientes, uno para cada método de extracción (Soxhlet, Maceración y UAE (US-CE13)) y en duplicado. Cada extracto se suspendió en agua a diferentes concentraciones: 2000, 1000 y 200 µg/mL, respectivamente. Estas concentraciones se seleccionaron a partir de lo reportado para otras acetogeninas *Annonaceae* (Bento et al., 2013; da Trindade et al., 2020). A la par un inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC No. 6538 se hizo crecer a 37 °C en medio LB por 16 horas, este se diluyó a una concentración

final de  $2 \times 10^5$  CFU/mL. Las suspensiones de los extractos se sonicaron por 2 minutos al 70% de amplitud para homogeneizarlos. Cada muestra se colocó en tubos Eppendorf estériles (1mL) y se mezcló con 1ml de la suspensión de bacterias, esta solución se incubó durante 1 y 2 horas respectivamente. Se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de cada muestra extracto/bacteria y se plantaron en agar LB, incubándolos por 16 horas a 37 °C para realizar el conteo de bacterias vivas. Se empleó Búfer fosfato estéril (PBS) como control positivo. La actividad antibacterial (AA) fue calculada de acuerdo a la ecuación 2, Donde  $C_o$  es el número de colonias sobrevivientes en el control PBS y C son las colonias sobrevivientes en cada muestra de extracto.

$$(AA) \% = (C_o - C/C_o) * 100 \text{ ----- (2)}$$

## Capítulo 3.- Resultados

Los resultados obtenidos en la presente investigación se resumen en este capítulo, presentados en el mismo orden en que se describe la metodología.

### 3.1 Extractos

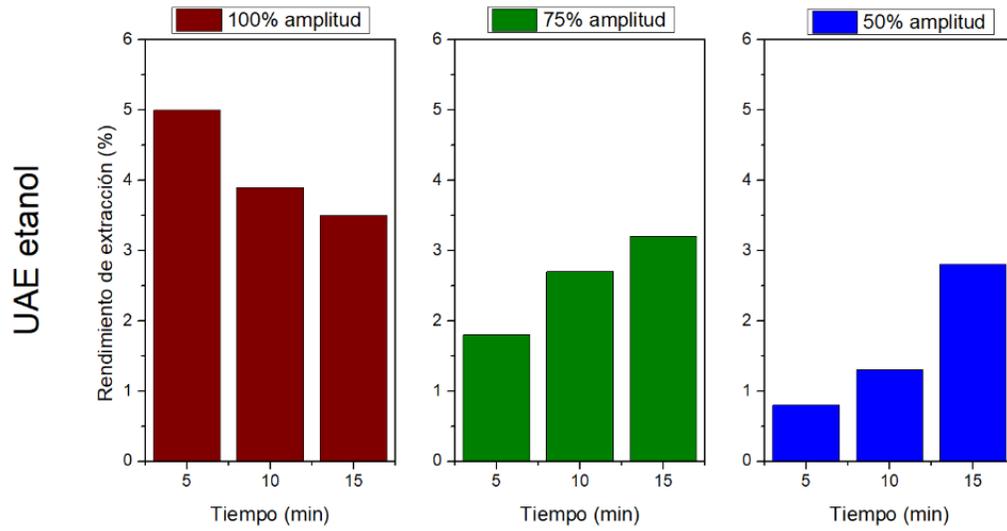
#### 3.1.1 Métodos de extracción

En todas las extracciones realizadas con agua se obtuvo un extracto color café, variando en intensidad de color de acuerdo a la técnica empleada; por otro lado, en el caso de los extractos etanólicos, se obtuvieron extractos verdes brillantes, con una variación similar en la intensidad del color que en el caso de los extractos acuosos.

Los distintos métodos de extracción generaron variación en los rendimientos de extracción. En la tabla 1 se muestran los mencionados rendimientos, correspondientes a cada uno de los métodos utilizados y los solventes empleados.

En el caso de las extracciones obtenidas con el método UAE observamos mayores rendimientos con amplitud del 100% y en tiempos de solo 5 minutos, al aumentar el tiempo de extracción los rendimientos disminuyen cuando se mantiene la amplitud de 100%. Ahora bien, si disminuimos la amplitud utilizada se obtienen mayores rendimientos al incrementar el tiempo de extracción, como podemos observar en los casos de 75% y 50% de amplitud. Sin embargo, estos rendimientos no superan a los obtenidos en el caso de tener la amplitud al 100% por 5 minutos; toda esta información se resume en la figura 11 donde podemos observar dichos rendimientos y queda en evidencia que las mejores condiciones, independientemente del solvente usado, son la amplitud de 100% y un tiempo de extracción de solo 5 minutos.

A)



B)

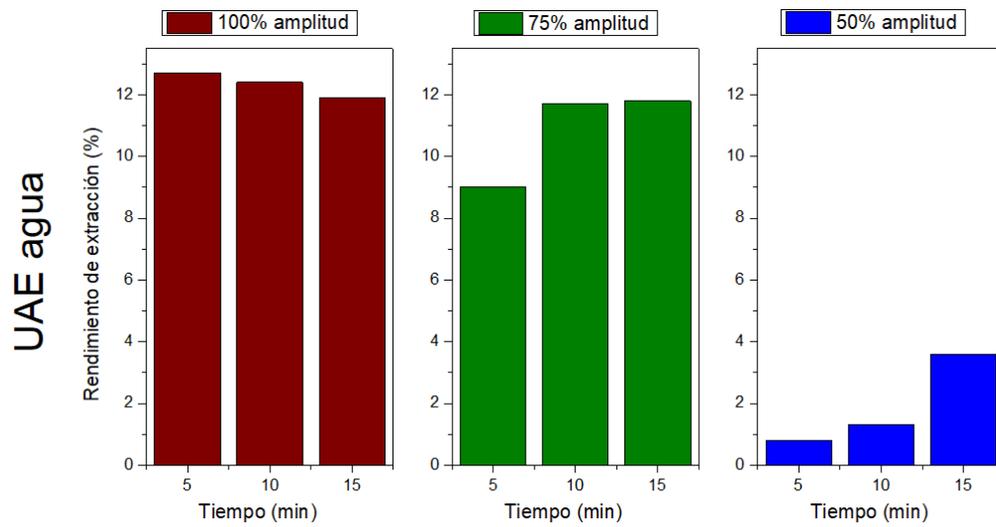


Figura 11.- Rendimientos de las extracciones realizadas por UAE con a) etanol y b) agua.

A partir de esto, se toman los resultados de la UAE con 100% de amplitud durante 5 minutos en ambos casos de los distintos solventes, con la finalidad de comparar los diferentes métodos de extracción. Se observa un mayor rendimiento en las extracciones realizadas con agua como solvente, y aquellos obtenidos por el método de Soxhlet. Esto se presenta con mayor detalle en la figura 12 donde vemos una comparación de los rendimientos de cada uno de los métodos y la comparación entre sí de los dos solventes empleados.

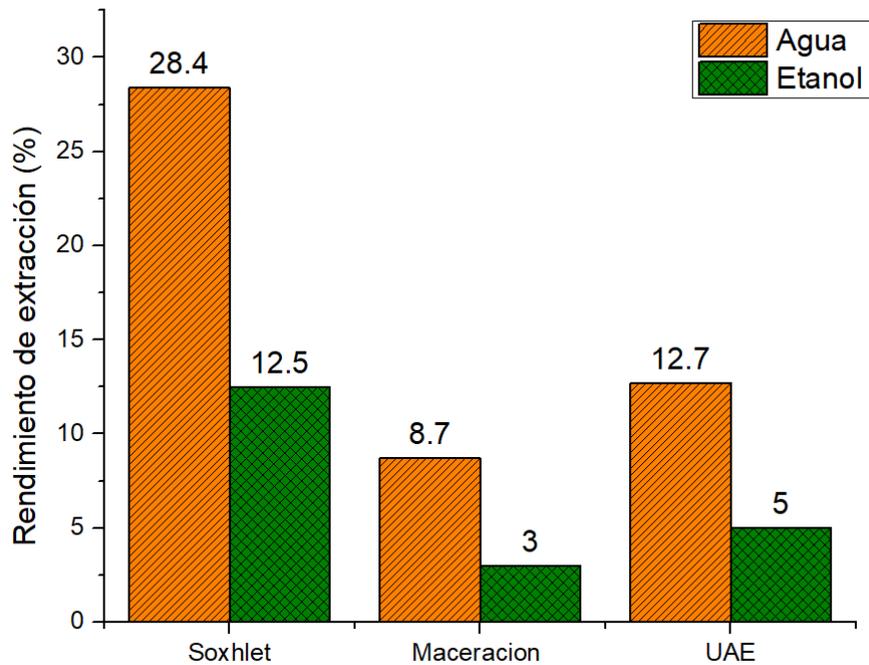


Figura 12.- Rendimientos de las diferentes técnicas de extracción

Si observamos exclusivamente los rendimientos obtenidos por cada uno de los métodos, queda en evidencia que se realiza una mayor extracción al emplear el método de soxhlet; sin embargo, al tener en cuenta los tiempos de extracción, tenemos una disminución del tiempo superior al 99% al usar el método UAE, donde tenemos rendimientos cercanos al 50% del rendimiento de soxhlet. Por lo tanto, el método UAE se considera como un método adecuado para la extracción, considerando la relación tiempo-rendimiento.

Es importante destacar que los rendimientos están expresados como porcentaje en peso del material original empleado en la extracción.

### 3.1.2 Análisis espectroscópico de los extractos de *Annona cherimola* Mill (FT-IR y UV-Vis)

En las siguientes páginas, se muestran los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados a los extractos, por IR y UV-Vis. En estos se muestran tanto resultados experimentales como aquello obtenido por las simulaciones.

#### 3.1.2.1 FTIR Experimental vs DFT

Como podemos observar en la figura 13 los espectros IR de los extractos de las hojas de las dos especies de la familia *Annonaceae* son muy similares. La principal diferencia es en el ancho de las bandas, así como en la intensidad. Esto nos indica que se tiene una composición química similar entre ambos. Este resultado es esperado debido a que ambas plantas pertenecen a la misma familia. Los principales modos vibracionales (figura 13 a)) reportados para la *Annona muricata* L. están presentes en ambos extractos; una banda gruesa localizada en  $3340\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye al estiramiento de los enlaces O-H, en  $2396$  y  $2846\text{ cm}^{-1}$  se presentan las vibraciones simétricas y asimétricas de los alcanos C-H respectivamente. Una banda importante es la presente en  $1735\text{ cm}^{-1}$  que se asigna a las vibraciones de estiramiento del enlace C=O. La banda que se localiza en  $1608\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de estiramiento de un alqueno C=C, mientras que en  $1040\text{ cm}^{-1}$  está la vibración de estiramiento atribuida a los anhídridos C-O. Por último, se encuentra una banda localizada en  $826\text{ cm}^{-1}$  que se refiere a las estructuras de bencenos sustituidos. De manera más puntual hay pequeñas bandas en las zonas que se marcan dentro de rectángulos con el nombre de Zona I y Zona II. En la primera existen bandas en  $1512\text{ cm}^{-1}$ ,  $1456\text{ cm}^{-1}$ ,  $1369\text{ cm}^{-1}$ ,  $1238\text{ cm}^{-1}$  que se consideran señal de vibración de flexión de alquenos, una banda múltiple de grupos aromáticos C=C, una vibración por movimiento de los enlaces C-C de los alcanos y una banda del grupo éster =COC, respectivamente.

Finalmente, en la Zona II, la banda que se presenta en  $716\text{ cm}^{-1}$  se asigna a los grupos C-H presentes en anillos aromáticos y fuera del plano, la banda localizada en  $666\text{ cm}^{-1}$  es de grupos cloruro (C-X), y la banda en  $765\text{ cm}^{-1}$  que solamente se presenta en la *Annona cherimola* Mill y es asignada a anillos benceno tri o bi sustituidos.

Todos los grupos que se mencionan anteriormente, particularmente aquellos que hacen referencia a enlaces O-H y C=O se atribuyen y consideran como parte de flavonoides, triterpenoides y compuestos fenólicos. También puede hacerse mención a las acetogeninas, que por su estructura puede presentar algunas de estas señales.

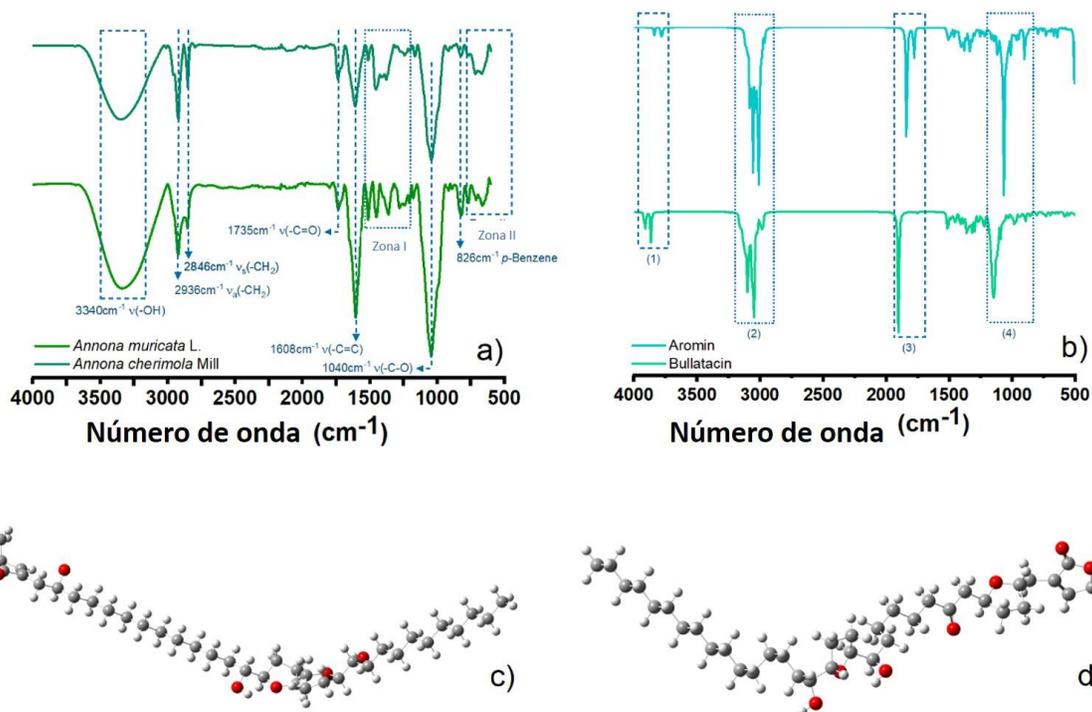


Figura 13.- Resultados de las pruebas realizadas por FT-IR. a) Espectros experimentales, b) Simulación de la señal de las acetogeninas más representativas de la guanábana y la chirimoya, c) Estructura optimizada de la bullatacina, d) Estructura optimizada de la aromina.

Como parte del análisis por señales IR se realizó la simulación mencionada en la metodología y se obtuvo la tabla 6. Como se puede observar, en esta tabla se presentan las señales de vibración obtenidas a partir de la estructura optimizada de dos de las acetogeninas presentes en la *Annona cherimola* Mill y la *Annona muricata* L., esta presencia va de acuerdo a lo reportado en la literatura (C. Chen, 1999; Yang et al., 2010), así como la comparación con las señales obtenidas de manera experimental. Al igual que en el caso de los espectros experimentales, tenemos coincidencia en las señales generadas por las dos acetogeninas; dividiendo las señales en 4 grupos. En el primer grupo (1) están las señales que se atribuyen a

los enlaces OH. En el grupo (2), se tienen las señales que corresponden a CH<sub>2</sub> y CH. En el grupo (3) se presentan las señales correspondientes a la presencia de enlaces C=O y C=C. Por último, en el grupo (4) hay señales atribuidas a enlaces CH<sub>2</sub>, OH, CH, C-C-C, C-C-O y CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>.

Tabla 6.- Vibraciones teóricas obtenidas de la Aromina y la Bullatacina

Frecuencia teórica [cm <sup>-1</sup> ]	Frecuencia Experimental [cm <sup>-1</sup> ]	Asignación
3829w		
	3340	$\nu[-OH]$
3779m		
3118m	---	$V_{as}[-CH_3]$
3104s		
	---	$V_{as}[-CH_2]$
3095s		
3079s	---	$V_{as}[-CH_2; -CH_3]$
3056vs		
	2936	$V_{as}[-CH_2]$
3040s		
3010vs	2846	$V_s[-CH_2]$
2982s		
	---	$\nu[-CH]$
2963s		
1837vs		
	1735	$\nu[C = O]$
1779s		
1705w	1608	$\nu[C = C]$
1517w		
	1512	
1505w		
		$\tau[CH_2]$
1490w		
	1456	
1460w		

1439w	---	$\delta[-OH; -CH]$
1418w	---	$\delta[-CH]$
1403m		
1382m		
1365w	1369	$\rho[CH_2]$
1339s	---	$\delta[-CH]$
1319m	---	$\rho[CH_2]$
1299w		
1287w	1280	$\delta[-OH; -CH] \rho[CH_2]$
1256w	1238	
1234w	---	$\rho[CH_2]$
1216w	---	$\delta[-CH]$
1186w		
1167w	1196	$\delta[-OH; -CH] \rho[CH_2]$
1145w	---	$\rho[CH_3]$
1121s		
1113m	---	$\rho[CH_2]$
1064vs	1159	$V_{as}[C - O - C]$
1043vs		
1029m	1040	$V_s[C - C]$
1014vs		
971m		
951m	914	$V_s[C - C] \delta[-CH]$
901s	---	$\rho[CH_2 - CH_2]$

879w		
795w		
760w	765	$\rho[CH_2]$
728w		
700w		
670w	---	$V_{as}[C - C]$
644w		
567w	---	$\rho[CH_2]$
557w	---	$V_{as}[O = C - C]$
542w	---	$V_{as}[C - C - C]$
507vs	---	$\delta[-OH]$
406w		
349w	---	$\rho[CH_2]$
309w		
216vs	---	$\delta[-OH]$
199w		
189w		
170w	---	$\rho[CH_2]$
31w		

---

\* v = muy; s = fuerte; m = medio; w = debil; v = estiramiento; v s = estiramiento simétrico; v as = estiramiento asimétrico;  $\delta$  = doblamiento;  $\gamma$  = vibración;  $\tau$  = rotación;  $\rho$  = balanceo.

### 3.1.2.2 UV-Vis señal experimental vs TD-DFT

La señal UV-Vis que se presenta en la región de los 200 a 300 nm puede atribuirse a la presencia de ciertos compuestos en un extracto natural, entre estos están los compuestos polifenólicos y las acetogeninas. En la figura 14 se muestra el espectro generado de manera experimental en la extracción por soxhlet con agua, comparado con el que se predice a partir del cálculo TD-DFT de la acetogenina aromina en presencia de agua. En el caso del espectro experimental se destacan dos bandas, una en 205 nm y otra débil en 265 nm; mientras que el teórico se obtiene la presencia de solo una banda con un máximo en 257 nm. Previamente se ha reportado que los cálculos de espectros de UV-Vis por B3LYP (que es el mismo perfil empleado en esta investigación) se producen corrimientos de la señal generada de manera experimental, debido a que en la simulación no se tienen en cuenta las interacciones con otras moléculas y la temperatura se considera cercana a 0 K (Hidalgo et al., 2019).

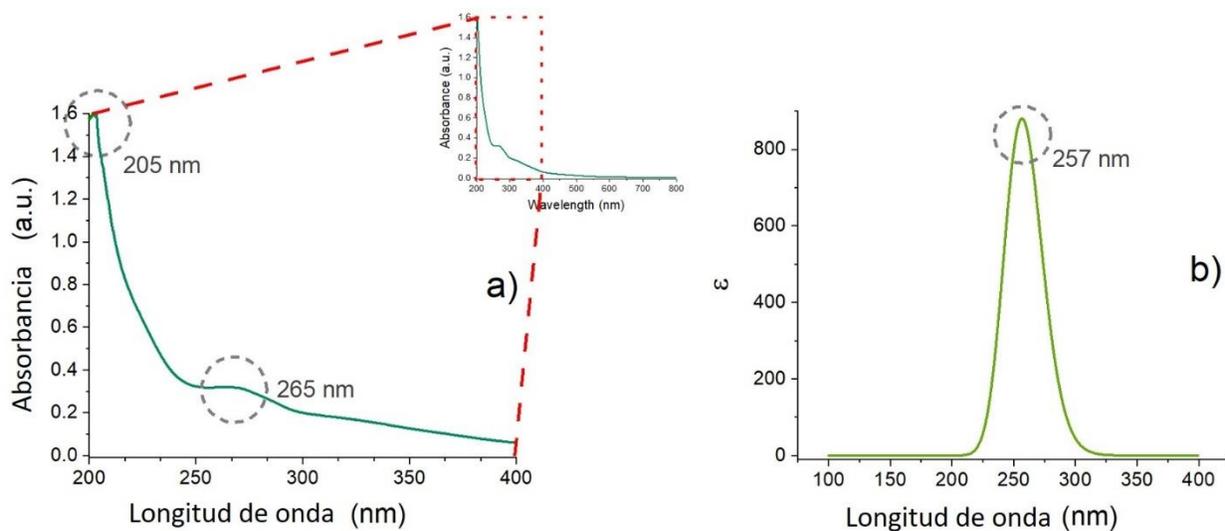


Figura 14.- a) Espectro experimental obtenido por UV-Vis, b) Señal teórica obtenida de la acetogenina aromina

En la investigación se presenta este corrimiento de 205 nm a una longitud de onda mayor (257 nm), como se menciona antes, estas diferencias se atribuyen a la interacción entre moléculas, situación que no se toma en cuenta en la simulación. Las bandas se asocian a transiciones de electrones en los enlaces  $\pi$  de las uniones C=C y C=O que están presentes en el anillo  $\gamma$ -lactona que está presente en la acetogenina aromina. Por su parte la banda que se localiza en 265 nm

suele atribuirse a compuestos ricos en enlaces OH, como pueden ser los polifenoles, por lo tanto, se debe tener cuidado al tratar de definir la presencia de acetogeninas con la técnica de FTIR y UV-Vis, ya que las señales arrojadas por las acetogeninas se pueden confundir y traslapar con las señales dadas por otros compuestos, principalmente compuestos polifenólicos.

Es importante resaltar que, la presencia de polifenoles en el extracto cubriendo la señal de las acetogeninas, no se considera como algo negativo, ya que, al tener una alta presencia de polifenoles, es posible emplear los extractos de la *Annona cherimola* Mill en aplicaciones de síntesis verde, como lo plantea el presente proyecto. Ahora bien, es importante destacar que, si bien las acetogeninas son aquellas a las que se les atribuye el mayor potencial antitumoral, no son los únicos metabolitos secundarios presentes en esta planta con dicho potencial.

El análisis UV-Vis no solamente se empleó para considerar un acercamiento a la presencia de acetogeninas, sino también como una herramienta de selección de parámetros adecuados para la extracción por UAE. En conjunto con la medición de los rendimientos en porcentaje por peso se realizó una medición del espectro de cada uno de los extractos, obteniendo los resultados mostrados en la figura 15. En esta figura se comparan los espectros obtenidos al variar la amplitud, el solvente y los tiempos. Como es posible observar, tal como se hacía mención únicamente con los rendimientos en porcentaje de peso, tenemos que las extracciones realizadas con agua presentan una mayor intensidad en la señal dada en la región de interés (200-400 nm). Sin embargo, existe una variación con respecto a los rendimientos, ya que al tener 15 minutos con el 100% de amplitud los rendimientos disminuyen, pero la calidad de la señal se incrementa, lo que nos indica, una mayor presencia de compuestos, ya sean polifenoles o acetogeninas. Aun así, tanto en el caso de extracciones con etanol, como con extracciones con agua, al realizarse por 5 minutos con el 100% de amplitud, tenemos una mejor señal, con mayor intensidad y definición de las bandas antes mencionadas, lo que coloca a estas muestras como las óptimas en condiciones de extracción tanto por el rendimiento como la presencia de compuestos de interés.

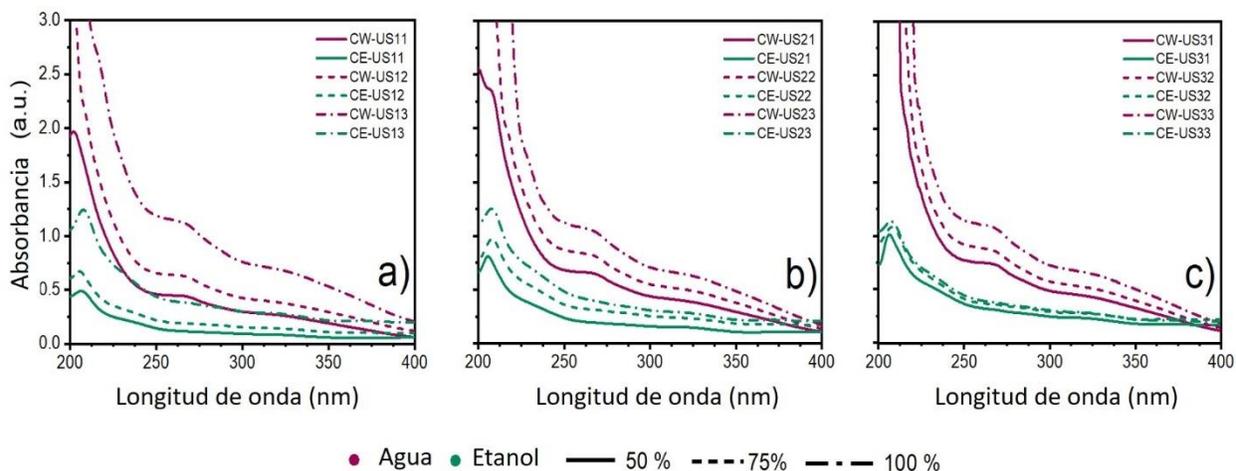


Figura 15.- Absorbancia de UV-Vis presentada por los extractos en distintos tiempos. a) 5 minutos, b) 10 minutos, c) 15 minutos

Al comparar las tres técnicas de extracción se tiene que, como se muestra en la figura 16, en todas las técnicas, el solvente más efectivo es el agua, esto confirma los resultados ya obtenidos en el rendimiento de extracción en porcentaje de peso. En esta figura, se presentan las técnicas de izquierda a derecha: maceración, soxhlet y UAE. Ahora bien, al revisar la intensidad de las señales tenemos el siguiente orden en efectividad de extracción  $SX > UAE > MC$ . Esto aplica tanto en agua como en etanol como solvente. De nueva cuenta, al revisar los tiempos que requiere cada una de las técnicas, la extracción por UAE presenta una ventaja importante ya que la señal otorgada es más que aceptable y los tiempos son muy pequeños en comparación con las otras técnicas.

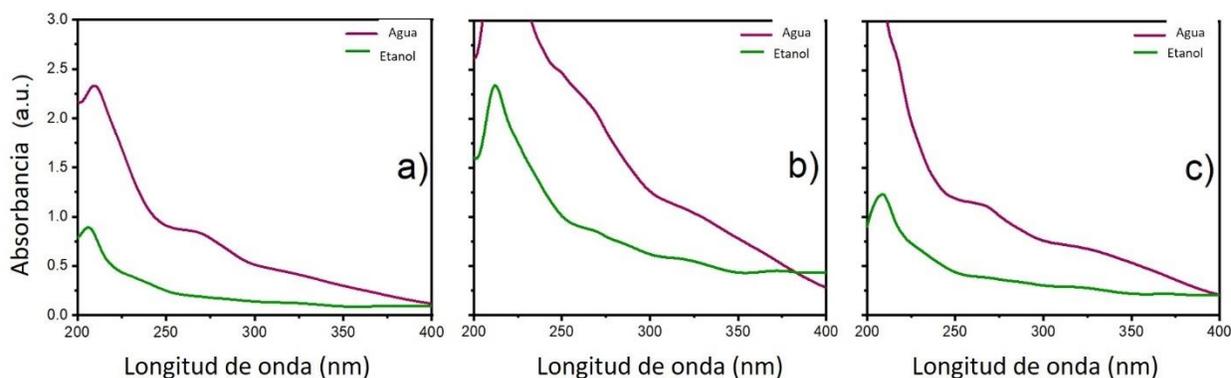


Figura 16.- Absorbancia UV-Vis de cada una de las técnicas de extracción analizadas: a) Maceración, b) Soxhlet, c) UAE.

### 3.1.3 Capacidad antioxidante

En la tabla 7 se resume la información respecto a la capacidad antioxidante obtenida con cada una de las técnicas espectroscópicas. Puede observarse que, en el caso de las pruebas de FRAP, los valores más altos de  $\mu\text{M}$  equivalentes de ácido ascórbico fueron obtenidos en los extractos etanólicos, mientras que en el caso del DPPH y CUPRAC, los valores más altos fueron obtenidos con los extractos acuosos.

Tabla 7.- Resultados de las pruebas realizadas de capacidad antioxidante.

Muestra	DPPH		CUPRAC		FRAP	
	Abs.	Concentracion ( $\mu\text{M AE}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Abs.	Concentracion ( $\mu\text{M AE}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Abs.	Concentracion ( $\mu\text{M AE}\cdot\text{g}^{-1}$ )
GW-SX	0.059	638.02	0.3686	679.59	0.2023	783.15
GE-SX	0.1075	537.92	0.2539	356.27	0.2088	822.68
CW-SX	0.0346	759.88	0.3327	577.11	0.1745	612.22
CE-SX	0.0935	580.26	0.2934	466.79	0.1872	690.05
CW-MC	0.1852	309.66	0.1073	152.252	0.1104	218.70
CE-MC	0.2473	235.95	0.13332	31.75	0.1218	288.66
CW-US13	0.1616	373.02	0.1700	266.83	0.1255	311.37
CE-US13	0.2066	301.13	0.1470	83.94	0.1452	432.26

Estos resultados brindan un acercamiento a los posibles mecanismos antioxidantes de los extractos evaluados. Todas las muestras reaccionaron en las tres pruebas, sin embargo, cada una de las pruebas otorgan información distinta de los posibles mecanismos antioxidantes. El que reaccione al ensayo DPPH nos indica que existe un mecanismo mixto de transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrogeno. La diferencia en los resultados de las

pruebas de FRAP y CUPRAC se pueden explicar debido al potencial de oxidación más alto de FRAP (0.7 V) respecto al de CUPRAC (0.6 V) lo que provoca que los compuestos fenólicos se oxiden más rápido.

Es importante destacar que la *Annona cherimola* presenta valores más altos en las metodologías DPPH y CUPRAC que la *Annona muricata*, mientras que para la metodología FRAP los valores de guanábana son más altos que de la chirimoya. Esto refuerza la idea de que se presentan diferentes mecanismos de acuerdo a los compuestos fenólicos extraídos, e incluso puede estar relacionado a una mayor presencia de acetogeninas, ya que se ha relacionado en algunos casos que la presencia del anillo lactona que se encuentra en las acetogeninas contribuye en la actividad de la metodología DPPH.

Comparando todos los métodos de extracción es posible hablar de consistencia en los resultados. Existe una mayor capacidad antioxidante en los extractos por Soxhlet, seguido por UAE y finalizando con Maceración; esto coincide con los resultados encontrados en el rendimiento y, como se verá más adelante, con la presencia de contenido fenólico. Esto nos indica una relación directa entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico, que como se ha reportado, son compuestos que se consideran como los principales responsables de dicha capacidad. Por lo tanto, entre más concentración de fenoles exista, se tendrá una mayor capacidad antioxidante.

Estos resultados muestran que, si bien la maceración es aún muy utilizada, no es el mejor método de extracción para obtener buenos resultados y alta efectividad en dichas extracciones. De nueva cuenta, considerando que la UAE tiene una capacidad antioxidante de al menos el 50% de la que presenta la extracción por Soxhlet, y que sus tiempos de extracción se reducen en más del 99% se convierte en una opción altamente atractiva.

### 3.1.4 Determinación del Contenido Total de Fenoles (TPC) y el Contenido Total de Flavonoides (TFC)

Determinar el contenido total de fenoles y flavonoides presentes en un extracto natural es de suma importancia debido a que son metabolitos secundarios responsables en gran medida de la capacidad antioxidante del mismo, y por lo tanto de la capacidad reductora; capacidad que es fundamental al utilizar dichos extractos en aplicaciones como la síntesis verde, o aplicaciones alimentarias y médicas. Como se observa en la tabla 8, la mayor concentración de compuestos fenólicos está en las muestras obtenidas por la extracción soxhlet, tanto en el caso de la extracción con agua como en las de etanol, estas concentraciones fueron de 12.82 y 9.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GAE, respectivamente. Con estos resultados nuevamente se comprueba que con agua como solvente se obtiene un mayor rendimiento de compuestos fenólicos. Los resultados de contenido fenólico coinciden con lo arrojado por la prueba de medición de flavonoides, manteniendo la tendencia de una mayor presencia en extractos acuosos que en etanolicos con concentraciones de 10 y 9.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$  QE, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de las muestras analizadas no muestran presencia de flavonoides, y en particular la muestra CW-US13 presenta un mayor contenido de flavonoides que de fenoles lo cual no puede ser, ya que los flavonoides siempre se identificaran como parte del contenido fenólico. Estos resultados contradictorios obligaron a realizar una prueba de mayor precisión para determinar la presencia de estos compuestos.

Tabla 8.- Resultados de las pruebas de contenido fenólico y flavonoides.

Muestra	Fenoles		Flavonoides		Fla/Fen	e-Fenoles		e-Flavonoides
	Abs.	Concentración ( $\mu\text{M GE}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Abs.	Concentración ( $\mu\text{M QE}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		Corriente (mA)	Concentración ( $\mu\text{M GE}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
CW-SX	0.133	12.82	0.020	10	0.78	0.00784	51.27	----
CE-SX	0.100	9.69	0.016	9.37	0.97	0.00737	46.39	-----
CW-MC	0.064	6.29	----	----	----	NM	NM	NM
CE-MC	0.246	2.48	----	----	----	NM	NM	NM

CW- US13	0.070	6.80	0.010	9.32	1.37	0.00639	36.19	----
CE- US13	0.032	3.16	----	----	----	0.00364	7.59	----

En conclusión, es importante que la relación Flavonoides/Fenoles nunca sea superior a uno, de lo contrario debemos considerarlo como un falso positivo y por lo tanto buscar análisis de mayor precisión.

### 3.1.5 Análisis electroquímico del contenido total fenólico (e-TPC) y el contenido total de flavonoides (e-TFC)

Como se menciona antes el análisis de contenido fenólico y flavonoides por electroquímica es una técnica más precisa que los métodos espectroscópicos, además de ser un método rápido. El aumento en la precisión responde a que la cuantificación se realiza a partir del potencial electroquímico de las especies y no de su absorción de luz, por lo que no hay otros compuestos que puedan traslapar la señal y por tanto generar interferencia y falsos positivos. En este caso el análisis se realizó únicamente sobre las muestras obtenidas de Soxhlet y UAE que son las de principal interés debido a lo ya observado respecto al rendimiento y señal UV-Vis.

Uno de las principales observaciones a destacar es que en ninguna de las muestras se logra identificar la presencia de flavonoides, lo que nos indica la existencia de un falso positivo en las pruebas espectroscópicas, además de confirmar lo ya observado en los espectros UV-Vis donde no se observaron las bandas características de los flavonoides. Si bien se ha reportado la existencia de flavonoides en especies de *Annonaceae* como el caso de la *Annona muricata* L., donde se han observado hasta 29 flavonoides distintos estos suelen encontrarse en la pulpa y no en las hojas, además de que la extracción suele realizarse con otros solventes como metanol y metanol ácido.

En el caso de los fenoles tenemos una coincidencia en la tendencia que nos mostraban las pruebas espectroscópicas, donde la mayor presencia está en la muestra CW-SX, seguida de CE-SX, después CW-US13 y por último CE-US13. Sin embargo, la presencia detectada en la prueba electroquímica es de casi 5 veces más, por lo que se confirma la mayor sensibilidad de la prueba electroquímica. La presencia de fenoles reportada coincide con lo reportado para la *Annona cherimola* Mill.

### **3.1.6 Determinación de la presencia de acetogeninas en las extracciones (HPLC)**

De acuerdo a los resultados obtenidos se generaron los cromatogramas que se muestran en la figura 17. En los cromatogramas pertenecientes a Soxhlet ((a) agua y (b) etanol)) se tienen tiempos de retención entre 5 y 13 minutos, con perfiles muy similares. Estos tiempos de retención se pueden atribuir a la presencia de 12,15-*cis*-squamostatin-A y Annoglaxina. Debido a que no existe suficiente información en la literatura respecto a los perfiles fitoquímicos de la *Annona cherimola* Mill se atribuyen a estas acetogeninas de acuerdo a lo reportado por Yang y sus colaboradores (Yang et al., 2010). Sin embargo, aún se considera la posibilidad de que existan otras acetogeninas presentes; de igual forma, para confirmar que se trata de dichas acetogeninas es preciso emplear otras técnicas de caracterización, como resonancia magnética nuclear. Es preciso destacar que no se hizo uso de esta técnica ya que el principal interés es utilizar el extracto completo, aprovechando todas las características benéficas de los metabolitos secundarios presentes en la chirimoya, y no únicamente las acetogeninas, por lo tanto, solo se requiere conocer la presencia de las mismas, más allá de la identificación exacta. No obstante, se tiene en cuenta que para futuros proyectos es importante definir de que acetogeninas se trata, ya que estas pueden influir de manera directa e importante en la toxicidad hacia las células sanas, de acuerdo a la aplicación que se le quiera dar a los extractos, así como a los materiales derivados de los mismos.

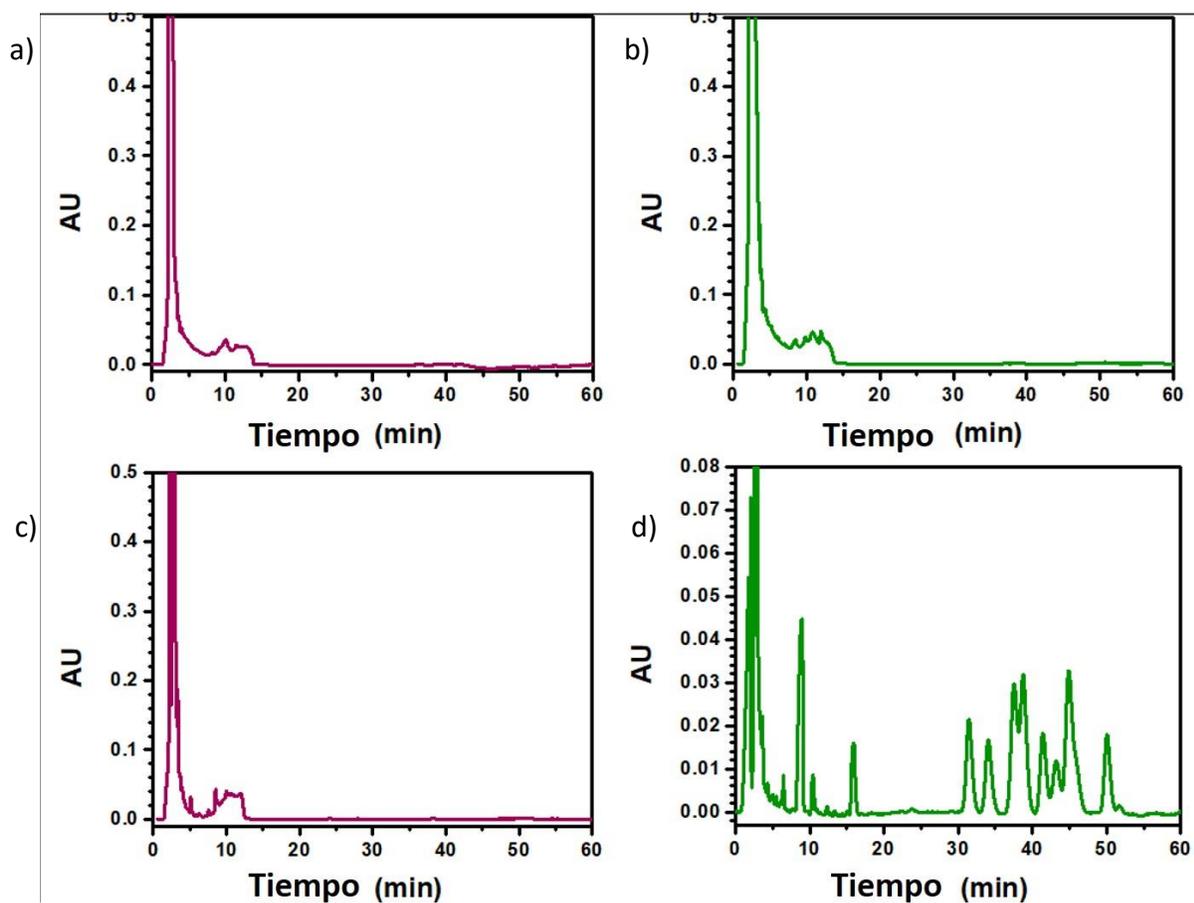


Figura 17.- Cromatogramas obtenidos de los extractos acuosos y etanólicos de las técnicas de Soxhlet (a) y b))

Por otra parte, en la misma figura 17 pero en el apartado (c) y (d), que corresponden a los extractos por UAE con agua y etanol respectivamente, se observa una variación en los tiempos de retención, principalmente en el correspondiente al etanol. En el caso del extracto realizado con agua tenemos que su perfil es muy similar al obtenido en Soxhlet, teniendo tiempos de retención de 5 y 13 minutos, lo que se atribuye a la presencia de squamostatin-A y annoglaxina; pero en el caso de la extracción con etanol se presentan otros tiempos de retención, que se encuentran en tiempos de 11-17 minutos y 30-54 minutos. Todos estos tiempos de retención se atribuyen a la presencia de acetogeninas como annoglaxina, squamostatin-A, isodesacetilivaricina, asiminecina, murisolina y desacetilivaricina de acuerdo a lo que Yang ha reportado (Yang et al., 2010). De esta manera, al observar el cuadro completo de los análisis HPLC se tiene que, el utilizar agua como solvente, no es lo más recomendable para tener una

extracción eficiente de acetogeninas, siendo caso contrario cuando empleamos etanol, particularmente con el método de extracción UAE; el cual muestra un excelente rendimiento; por lo que se puede considerar como una extracción selectiva orientada a acetogeninas, utilizando las condiciones de extracción particulares de esa muestra.

Como se hace mención antes, todo esto está restringido a las acetogeninas estudiadas por Yang y sus colaboradores, sin embargo, es posible que en realidad exista una mayor presencia de acetogeninas, así como que no corresponda a la presencia de las acetogeninas aquí mencionadas. A pesar de esto, se considera que es posible obtener acetogeninas usando el método de extracción UAE y etanol como solvente.

## **3.2 Nanopartículas metálicas**

A continuación, se resumen las observaciones y resultados obtenidos a partir de la aplicación de las metodologías tratadas en el capítulo 2 para la obtención de las nanopartículas metálicas.

### **3.2.1 Síntesis**

Como se menciona en la metodología se inició buscando la relación ideal de  $\text{HAuCl}_4$ :extracto. Para esto se realizaron pruebas con el extracto etanólico, durante la síntesis se observó un cambio progresivo de coloración de la solución, partiendo de un color amarillo claro hasta un rojo intenso oscuro. Sin embargo, una vez que se realizó el procedimiento de lavado se obtuvo un color rosa ligero. Para determinar la mejor relación de sal:extracto se utilizó la técnica de UV-Vis, con esta se monitoreo la señal del plasmón de resonancia de superficie de las nanopartículas de oro, que aparece en la región de 540 nm aproximadamente. Esta señal suele recorrerse de acuerdo al tamaño de partícula, además de mostrar una mayor definición entre menor distribución de tamaños y formas se tengan.

En la figura 18 se presentan las lecturas de absorbancia de las diferentes relaciones sal:extracto que se evaluaron. Como es posible observar, en la relación 1:2, donde se tiene menor presencia de sal, se presenta una señal saturada que se atribuye a la presencia de una alta cantidad de extracto que no ha reaccionado. Durante el proceso de esta síntesis se observó un rápido cambio de color, quedando de un color rojo oscuro, casi negro. La señal del plasmón no es definida y por lo tanto no se considera como una reacción ideal, ya que se ha notado que al tener una reacción violenta las propiedades de las nanopartículas formadas no son las ideales, debido principalmente a la variedad de formas o tamaños de las partículas.

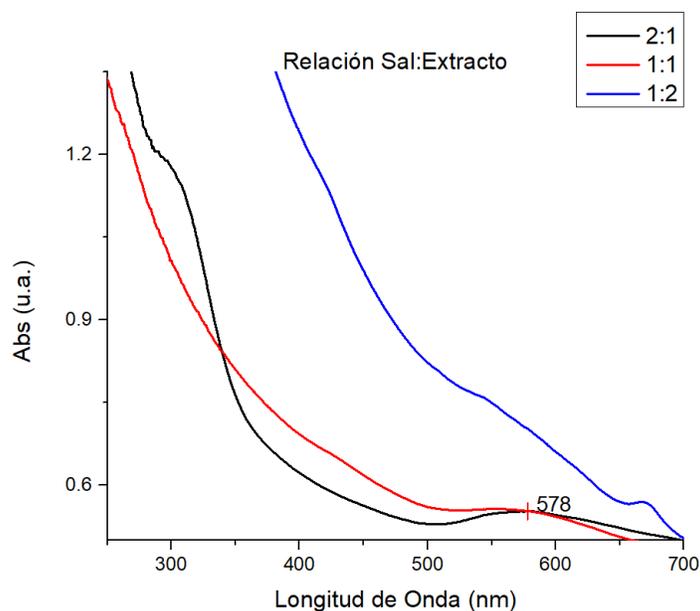


Figura 18.- Señales UV-Vis del plasmón de resonancia de las diferentes relaciones Sal:Extracto.

En el caso de la relación 1:1, de nueva cuenta se tiene una mayor intensidad de señal debido a la parte del extracto que no ha reaccionado con la sal; en este caso la definición del plasmón de superficie es mayor que en el caso de la relación 1:2. Sin embargo, se observa una mayor definición del plasmón en la relación 2:1, además de que el proceso de síntesis es más lento, lo que permite una mejor formación de las nanopartículas, así como de los tamaños. A partir de esta prueba inicial, realizada con el extracto etanólico, se decidió utilizar la relación 2:1 Sal:Extracto en todas las pruebas y caracterizaciones siguientes.

### Comparación entre extractos

Para realizar la comparación de las síntesis entre los extractos etanólicos y acuosos, como se mencionó antes, se empleó la relación 2:1 Sal:extracto. Se observó una coloración más rojiza en el caso de la síntesis con extracto acuoso en comparación al extracto etanólico donde los tonos tendían mayormente al morado. En la figura 19 se presentan los espectros de estas dos síntesis, tanto antes del proceso de lavado como posterior al mismo. Una de las principales diferencias es que previo al lavado se tiene una señal saturada, debido a la presencia de los restos de extracto que no reaccionaron en la síntesis. De igual forma, al realizar el lavado se generó un corrimiento de la señal máxima del plasmón de superficie, viendo la señal correcta del plasmón al lavar las partículas.

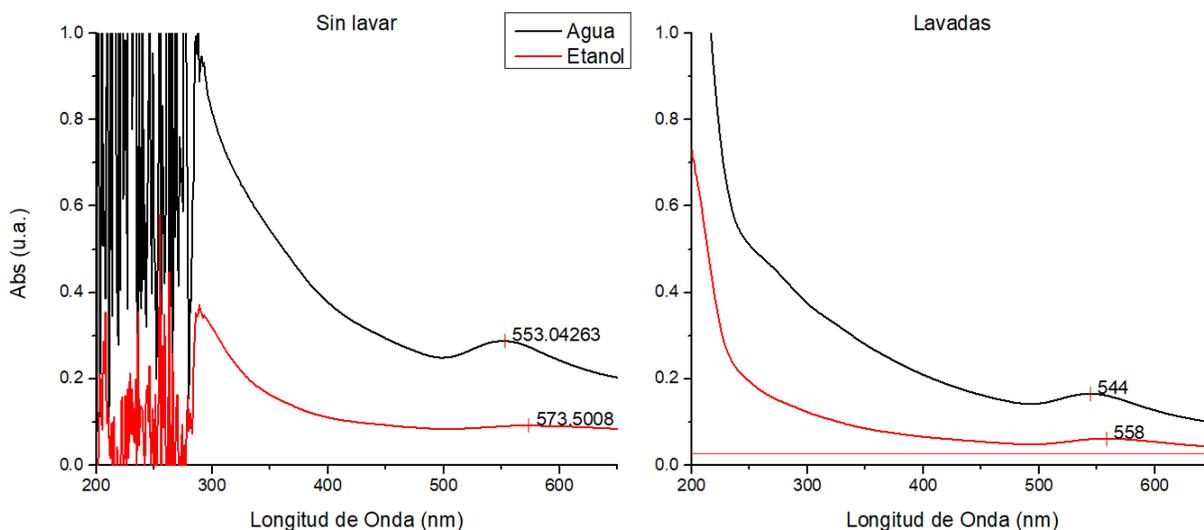


Figura 19.- Espectros de la síntesis con relación sal:extracto 2:1 previo al lavado (izquierda) y posterior al lavado (derecha)

Algo importante a destacar es que al realizar el lavado se genera una disminución de la señal del plasmón, pero la definición de dicha señal no varía demasiado. Ahora bien, analizando las diferencias entre la señal arrojada por la muestra Aq2:1 y Et2:1 se nota una mayor intensidad en la señal del plasmón de las partículas obtenidas con el extracto acuoso y una longitud de onda menor, lo que nos indica una mayor presencia de partículas y un tamaño menor de las mismas. De acuerdo a la longitud de onda y la forma de la señal es posible indicar que la mayoría de partículas tendrán forma cubica o de decaedros, según lo reportado en la literatura.

Ya teniendo las partículas lavadas se procedió a la caracterización más detallada, tanto de las partículas de la muestra Aq2:1 como de las partículas Et2:1.

Ahora bien, de acuerdo a los resultados de las caracterizaciones que se muestran más adelante, se decidió modificar la síntesis, de tal forma que el pH empleado fuera más básico, ya que se ha determinado en diferentes investigaciones que el uso de pH básico puede contribuir a una menor distribución de tamaños, e incluso a una reducción de los mismos.

Para determinar el pH adecuado de la solución modificadora se emplearon 3 soluciones con pH de 10, 12 y 14 realizando tres síntesis individuales con cada extracto. En la figura 20 se observan los espectros obtenidos con las diferentes modificaciones de pH, tanto con el extracto acuoso como con el extracto etanólico. Se puede notar que, en ambos casos, al modificar con la solución de NaOH de pH 14 no se obtiene ninguna señal que pueda atribuirse al plasmón de superficie de las nanopartículas de oro, y por lo tanto, a la existencia de las mismas, es decir, con esta modificación no obtenemos un buen resultado.

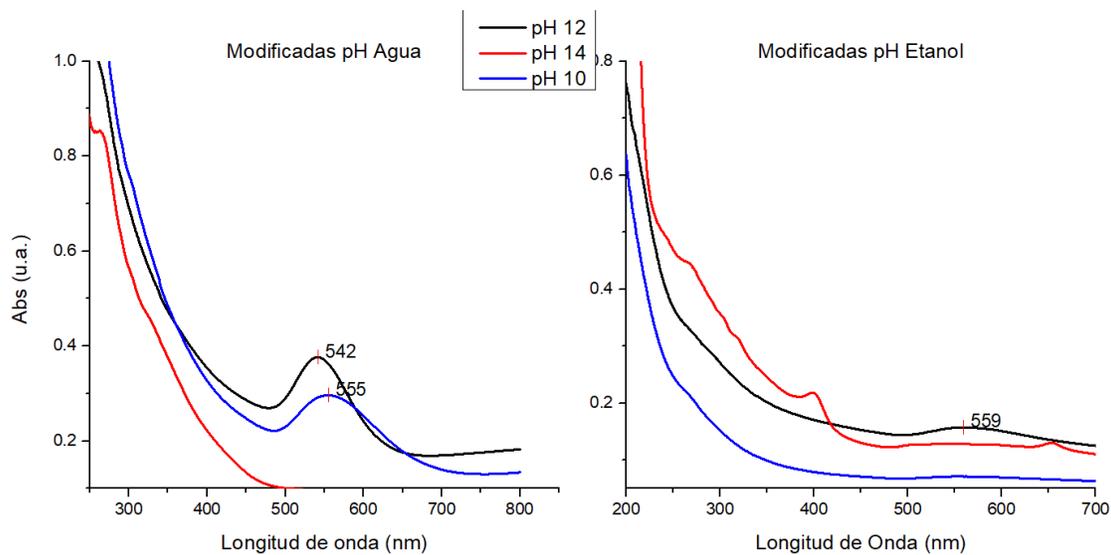


Figura 20.- Espectros de la modificación de pH. Extracto acuoso (izquierda), extracto etanólico (derecha).

Ahora bien, en el caso de la modificación con pH 10 se tiene que en la síntesis con extracto acuoso se intensifica la señal del plasmón, por lo que se puede considerar un incremento en la presencia de nanopartículas; sin embargo, el máximo de la señal presenta un corrimiento hacia la derecha, lo que significa que el tamaño de las partículas aumentó. Esto no sucede de la misma forma en el caso del extracto etanólico. En esta síntesis el espectro no presenta una

señal clara que pueda adjudicarse al plasmón de resonancia de superficie, por lo que se considera que no existió una producción de nanopartículas de oro,

Por último, está la modificación con una solución de pH 12, como es posible observar, la señal, tanto en el extracto acuoso como en el etanólico, tiene un incremento sobresaliente. En el caso del extracto acuoso el máximo de la señal presenta un corrimiento a la izquierda, que, si bien es pequeño, puede indicar la disminución del tamaño de partícula. El aumento de la señal se puede atribuir a una mayor presencia de nanopartículas. En el caso de la síntesis con extracto etanólico en este pH es en el único donde la banda del plasmón de resonancia se expresa, y, por tanto, se considera como el pH ideal para la mejora de las nanopartículas en tamaño y distribución, de acuerdo a la señal obtenida, sin embargo, para tener un resultado concluyente es preciso complementar con las técnicas que se describen más adelante.

En la figura 21 se tiene la comparación de las señales de las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso, en color negro se observa la absorbancia generada por las partículas sin modificación del pH y en rojo se tiene la absorbancia de las partículas con el pH modificado con una solución de NaOH en pH 12. Como se ha comentado antes se percibe un aumento de la señal del plasmón al modificar el pH. Además del corrimiento ligero de la señal máxima. En esta comparación, estos cambios se hacen más visibles.

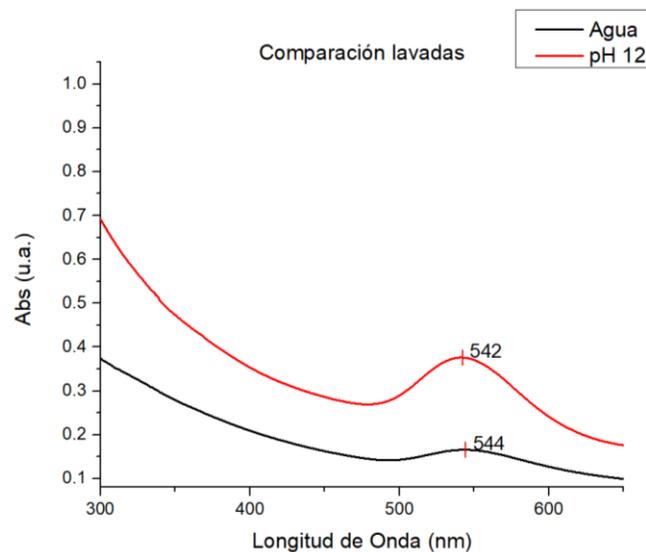


Figura 21.- Comparación de la señal del plasmón de resonancia de las partículas obtenidas sin modificar el pH (negro) y de las modificadas (rojo).

### 3.3 Caracterización

En la sección de caracterización se resumen los resultados obtenidos con las diferentes pruebas de caracterización realizadas, se dan a conocer las propiedades de las nanopartículas de oro con mayor detalle. Entre estas propiedades están la composición, el tamaño, la forma, la estructura cristalina y su estabilidad en suspensión.

#### 3.3.1 Caracterización composicional

En la caracterización composicional se mencionan los resultados de las pruebas que definen la composición de las partículas, es decir que compuestos están presentes. Aquí se mencionan los resultados de espectroscopia infrarroja; también los resultados antes mencionados de UV-Vis son resultados de una caracterización composicional.

##### *3.3.1.1 Espectroscopía infrarroja*

Los resultados de la espectroscopia infrarroja se dividen en dos; en la figura 22 se muestran las bandas detectadas en las nanopartículas obtenidas con el extracto etanólico. Como se observa, se detecta la presencia de los grupos ya analizados en el extracto por sí mismo. Esto nos indica que las nanopartículas tienen una especie de recubrimiento orgánico que puede potencializar las propiedades de las partículas en sí. Como se hace mención en el marco teórico, las nanopartículas de oro tienen potencial como tratamiento antitumoral, al igual que las moléculas conocidas como acetogeninas que están presentes en los extractos; cabe destacar que no solo las acetogeninas tienen este potencial, sino que los compuestos polifenólicos también contribuyen a los efectos antitumorales.

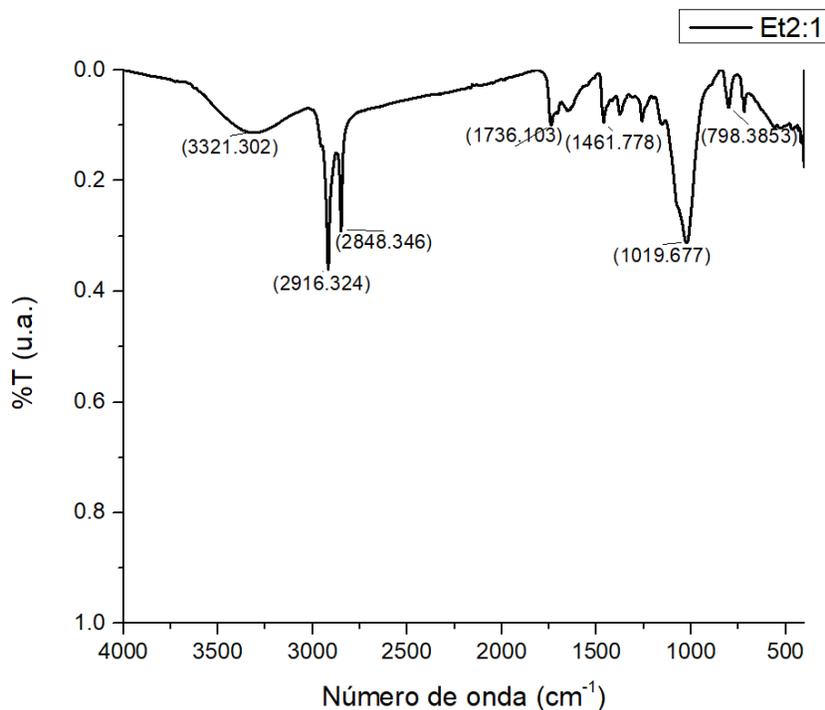


Figura 22.- Señal de infrarrojo de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico.

Dicho esto, esas propiedades antitumorales se pueden ver beneficiadas al estar en conjunto las nanopartículas de oro con los compuestos del extracto. Es importante destacar que en la zona de  $3300\text{ cm}^{-1}$  se tiene aún presencia de enlaces O-H, lo que significa que es posible que aún haya una alta presencia de compuestos polifenólicos, que, de acuerdo al análisis de los extractos, son los compuestos con mayor presencia en dichos extractos y que contienen este enlace. Si hacemos referencia a lo estudiado en el marco teórico, podemos inferir que esta presencia de compuestos polifenólicos se traduce en una reducción de producción de nanopartículas, ya que estos compuestos son los principales responsables del proceso de síntesis.

Ahora, en la figura 23 se presenta el espectro infrarrojo de las nanopartículas de oro obtenidas con el extracto acuoso. A diferencia del espectro de la muestra Et2:1, se notan más cambios respecto a la señal que se tenía en el extracto solo. Si bien están presentes algunas de las

bandas, la intensidad es menor, lo que indica una menor presencia de dichos compuestos. Nuevamente, es importante analizar la zona de 3000  $\text{cm}^{-1}$  donde existe aún una señal débil pero que indica una disminución significativa de los compuestos que tienen enlaces O-H, es decir, de compuestos polifenólicos

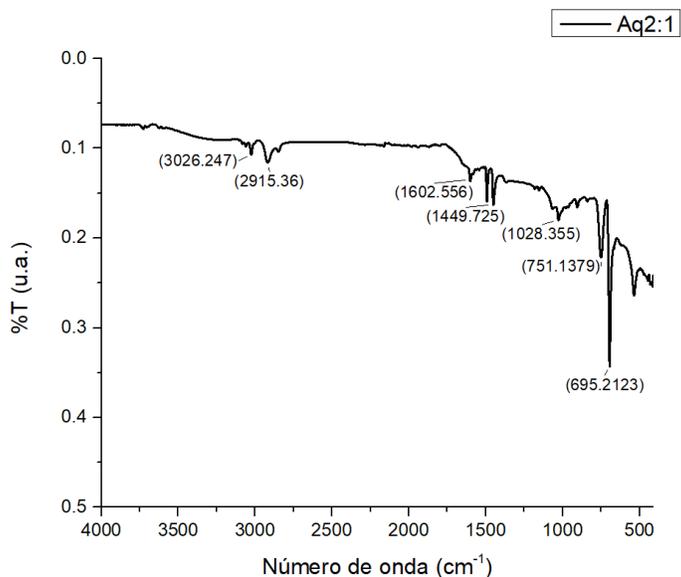


Figura 23.- Señal de infrarrojo de las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso

El hecho de que se reduzca dicha banda nos indica que una gran cantidad de polifenoles participaron en la síntesis y explica porque la señal obtenida en los espectros UV-Vis es más intensa en el caso de Aq2:1 que Et2:1, ya que de nueva cuenta se deduce que existe una mayor cantidad de nanopartículas.

### 3.3.2 Caracterización estructural

Dentro de la caracterización estructural se analizaron las propiedades de forma, tamaño, cristalinidad y estabilidad de las partículas. Todos los resultados de dichas pruebas se resumen en la presente sección.

#### 3.3.2.1 Morfología

Para analizar la morfología de las partículas se empleó un microscopio electrónico, aprovechando las señales de electrones transmitidos de alto ángulo (SE(L)), que también se conoce como contraste Z, electrones transmitidos de barrido (BFSTEM) junto con la señal SE(L), la señal de electrones secundarios SE(U) y el conjunto de señales de SE(U) y SE(L), de tal forma que es posible observar la zona donde se encuentran las nanopartículas de oro, rodeadas de una capa de material orgánico, que, de acuerdo a lo estudiado por IR, corresponde a la presencia de los extractos.

#### Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En las nanopartículas obtenidas con agua se obtuvieron micrografías que muestran una tendencia de las partículas a formar agregados. Como se puede apreciar en la figura 24 se presentan zonas grandes con presencia de partículas pequeñas que se aglomeran. En la sección a) de la figura se observa la señal SE(L) que permite apreciar la presencia de las partículas, sin embargo, para un mayor contraste y una mejor definición de la zona donde se localizan las partículas se emplea la señal BF+SE(L) que se muestra en la figura 24 b).

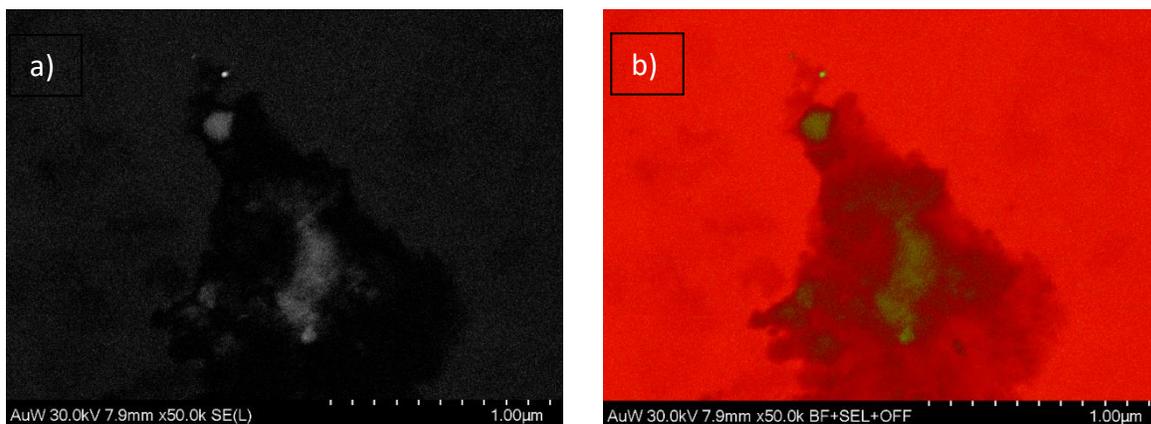
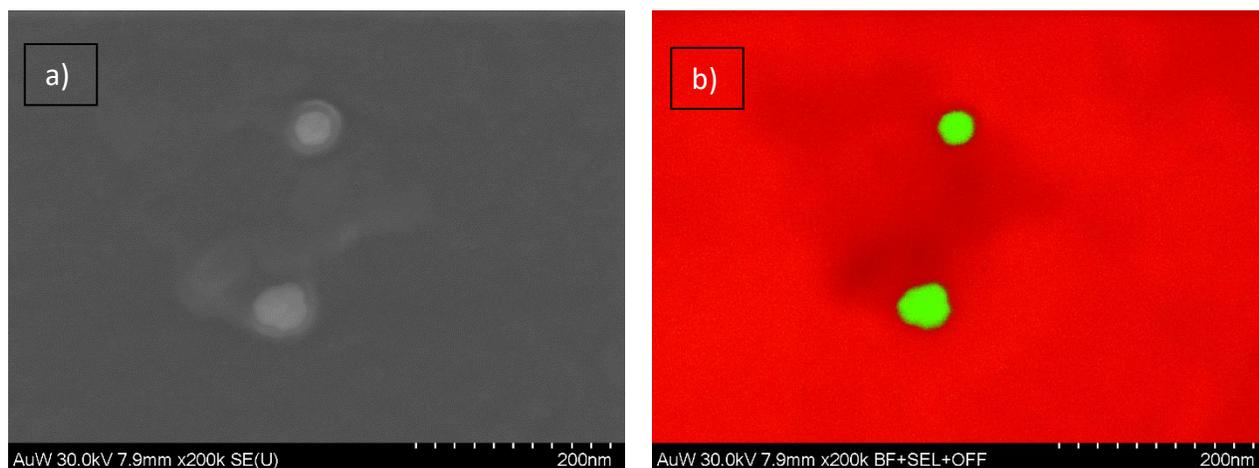


Figura 24.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso. a) Señal SE(L) b) Señal de BF+SE(L) . Magnificación de x50, escala de 1 μm

Ahora bien, se buscaron partículas que estuvieran separadas y permitieran tener una aproximación al tamaño de partícula y su morfología. Esto se puede observar en la figura 25; en la micrografía a) se presenta la señal SE(U), que permite observar el tamaño de la partícula con la cubierta orgánica, lo que le confiere un diámetro de aproximadamente 60 nm. Buscando observar a mayor detalle la presencia de oro y la forma de la partícula se usa la señal BF + SE(L) que se muestra en la micrografía b); se puede notar que la morfología corresponde a partículas decaédricas.



*Figura 25.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso. a) Señal SE(U) b) Señal de BF+SE(L) . Magnificación de x200, escala de 200 nm*

Si bien se obtuvieron partículas con tamaños aproximados de 60 nm, la tendencia a generar agregados puede contribuir a que no presenten un comportamiento adecuado en la aplicación deseada, además en una técnica como dispersión de luz es posible obtener tamaños de partícula mayores debido a la presencia de dichos agregados.

Por otra parte, las nanopartículas obtenidas con el extracto etanólico presentan diferentes morfologías. Se pueden encontrar decaedros, así como tetraedros; también, hay algunas partículas que no se percibe del todo la morfología. Ahora bien, respecto a la dispersión de tamaños se observa una gran dispersión, teniendo partículas de gran tamaño y otras muy pequeñas. Como se presenta en la micrografía de la figura 26 a) se observan tamaños de partícula superiores a 100 nm, mientras que hay otras partículas que su tamaño no supera los

20 nm, esto nos habla de una gran dispersión de tamaños; situación que se observa con mayor claridad en la figura 26 b) donde se ve la señal SE(U) + SE(L), esto muestra la presencia de oro de un color verde brillante.

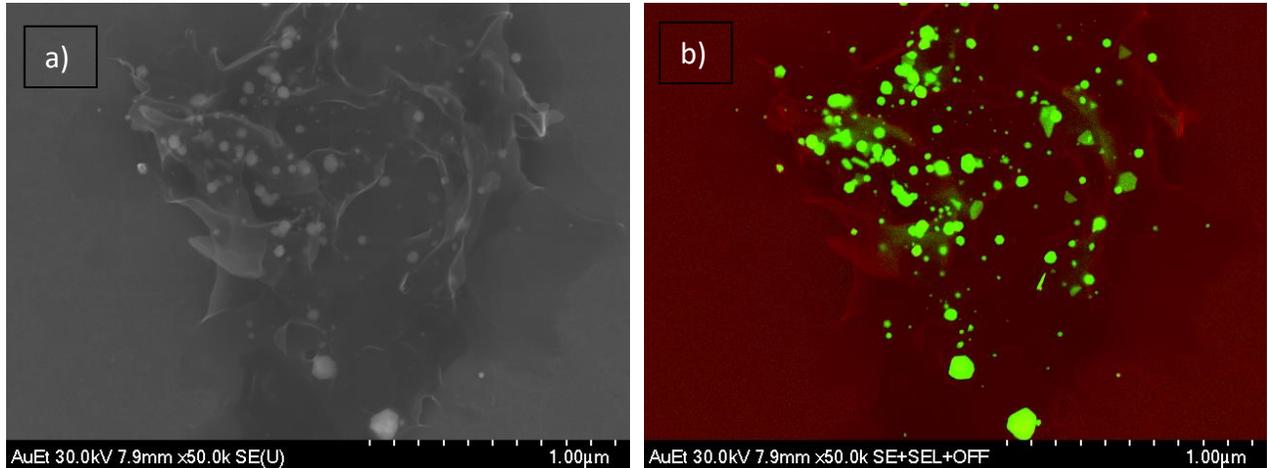


Figura 26.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico. a) Señal SE(U) b) Señal de SE(U)+SE(L).  
Magnificación de x50, escala de 1 μm

En la figura 26 ya se presentan ciertas morfologías que se mencionaban anteriormente, sin embargo, en la figura 27 se pueden observar estas morfologías de tetraedros y decaedros con mayor claridad. Lo tamaños de estas partículas son de aproximadamente 40 nm. En la micrografía a) observamos la señal SE(L) mientras que en la micrografía b) se presenta la señal SE(U)+SE(L) lo que nos otorga una mayor claridad de donde se encuentra el oro.

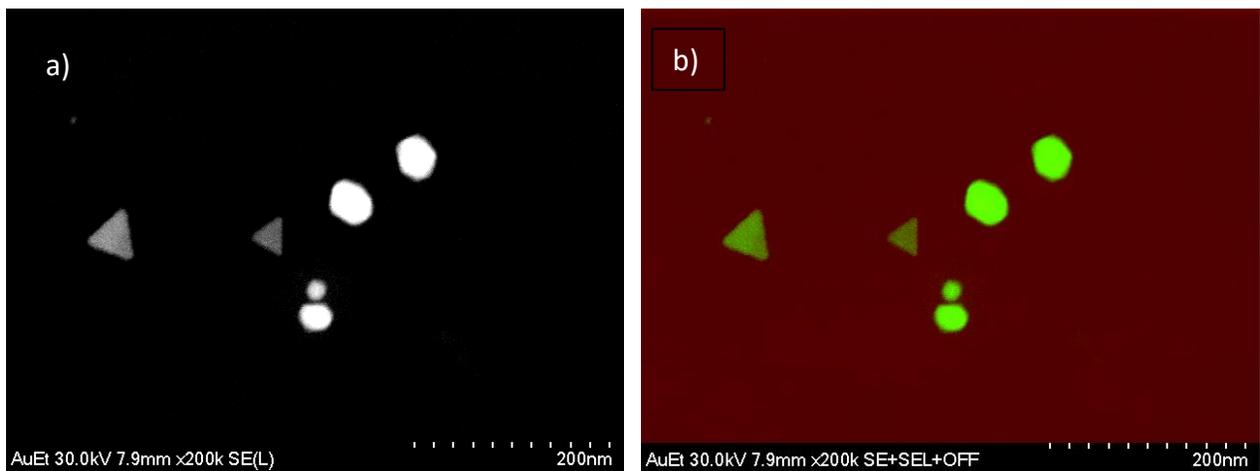


Figura 27.- Micrografías de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico. a) Señal SE(L). b) Señal de SE(U)+SE(L).  
Magnificación de x200, escala de 200 nm

### 3.3.2.2 Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas se obtuvo a través de la técnica de DLS; en la figura 28 se muestran las distribuciones de tamaño que generaron los dos extractos diferentes al actuar en la síntesis. En el caso de las AuNP obtenidas con el extracto acuoso se tiene una distribución de tamaños reducida, de 150 nm a 350 nm con un máximo en 240 nm. Estamos hablando de un tamaño grande, considerando que aproximadamente en 60 a 80 nm es donde se ha establecido una mayor facilidad de acción de las nanopartículas de oro en las células. Sin embargo, solo hay una variación de tamaños de 200 nm. Al comparar estos resultados con los tamaños de las partículas obtenidas de la síntesis con extracto etanólico, se nota que existe una mayor cantidad de partículas en tamaños pequeños (60 nm aprox.); no obstante, la distribución de tamaños es muy grande teniendo partículas de hasta 600 nm.

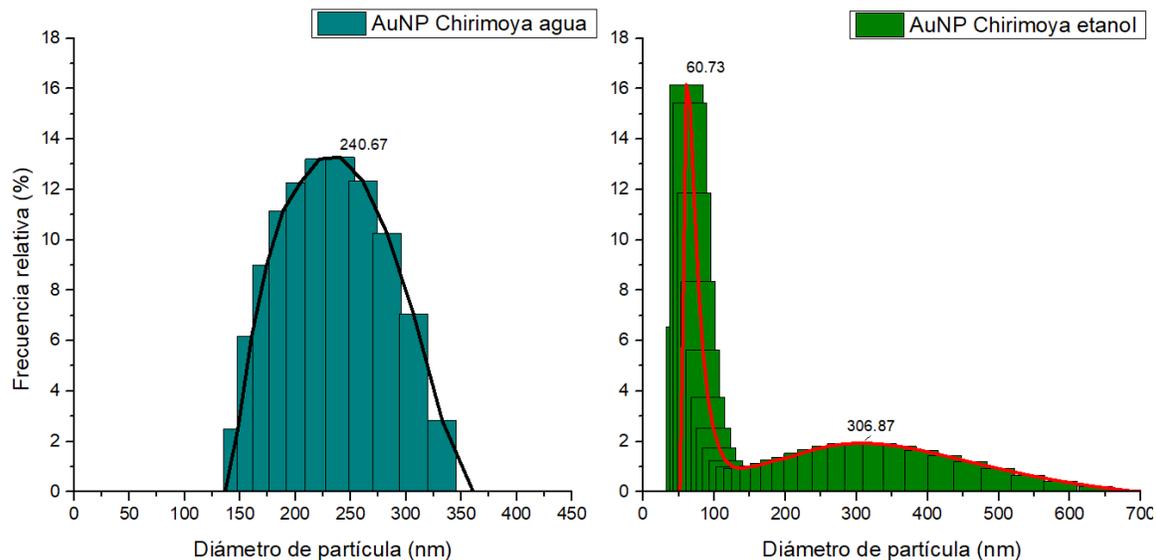


Figura 28.- Distribuciones de tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Extracto acuoso (izquierda), extracto etanólico (derecha).

La distribución de tamaños va de 50 nm hasta 650 nm, lo que representa una diferencia de 600 nm, esta distribución es muy grande y al querer emplear estas partículas en alguna aplicación terapéutica, dicha distribución tan grande de tamaños puede causar conflictos en el correcto funcionamiento de las partículas en la aplicación deseada.

Como se observó en la sección anterior, los tamaños mostrados en la síntesis con extracto acuoso pueden deberse a la tendencia a formar agregados, lo que genera tamaños mayores de lo que realmente se tiene. Ahora, para mejorar la estabilidad y reducir los tamaños se determinó la modificación del pH de la síntesis, hacia un pH más básico. En la figura 29 se muestra la distribución de tamaños obtenida con dicha modificación. Como se observa, al realizar dicho procedimiento, los tamaños de las partículas, obtenidas con el extracto acuoso, cambian de un máximo de 240 nm a un máximo de 10 nm, con una distribución de tamaños de 8 a 18 nm, lo que representa una variación de únicamente 10 nm. Esta reducción de tamaños puede considerarse como un resultado positivo, ya que se tiene una significativa reducción de tamaños. No obstante, es necesario, antes de emplear las partículas obtenidas en este procedimiento de modificación de pH en alguna aplicación, realizar pruebas que evalúen seriamente la toxicidad de dichas partículas, ya que algunas investigaciones mencionan un posible aumento en la toxicidad de las mismas, al reducir los tamaños de las nanopartículas hasta tamaños muy pequeños.

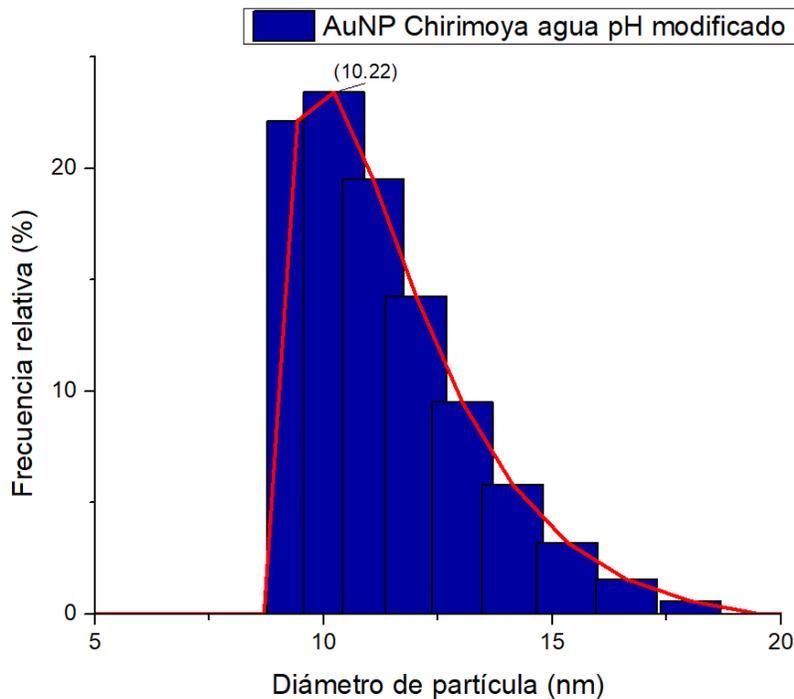


Figura 29.- Distribución de tamaños de la síntesis realizada con pH modificado

Una observación importante es que la reducción mostrada en el análisis puede no deberse únicamente a una reducción real, sino a un aumento en la estabilidad de las partículas, lo que evitaría la formación de agregados y, por lo tanto, generar una medición más precisa.

### *3.3.2.3 Análisis térmico*

La prueba realizada dentro de los análisis térmicos fue un análisis termogravimétrico, para determinar el contenido de nanopartículas presentes en cada mililitro de solución. El conocimiento de esta concentración de nanopartículas permite establecer las concentraciones necesarias en las pruebas antitumorales que se mencionan más adelante. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

#### *Análisis Termogravimétrico*

Como se menciona la prueba realizada se empleó para conocer el contenido en peso que existe de nanopartículas de oro. Si bien esta prueba se puede realizar con partículas secas, debido a la información requerida también puede hacerse en suspensión, obteniendo un resultado que no varía en demasía con el resultado que se obtendría si se secan primero las nanopartículas. Por esto se decidió hacer en suspensión. En el análisis TGA se realizó de manera simultánea un análisis de DSC; en la figura 30 se muestran las señales de las partículas obtenidas con el extracto acuoso. En el DSC se observa un cambio en la energía alrededor de los 100 °C, esta señal corresponde a la evaporación del agua y la calcinación de los compuestos orgánicos. En la señal de TGA se observa la pérdida de peso en la misma zona de 100 °C, quedando únicamente el contenido de nanopartículas de oro en la muestra tomada. La concentración de las partículas obtenidas con extracto acuoso es de 4.75 mg/mL.

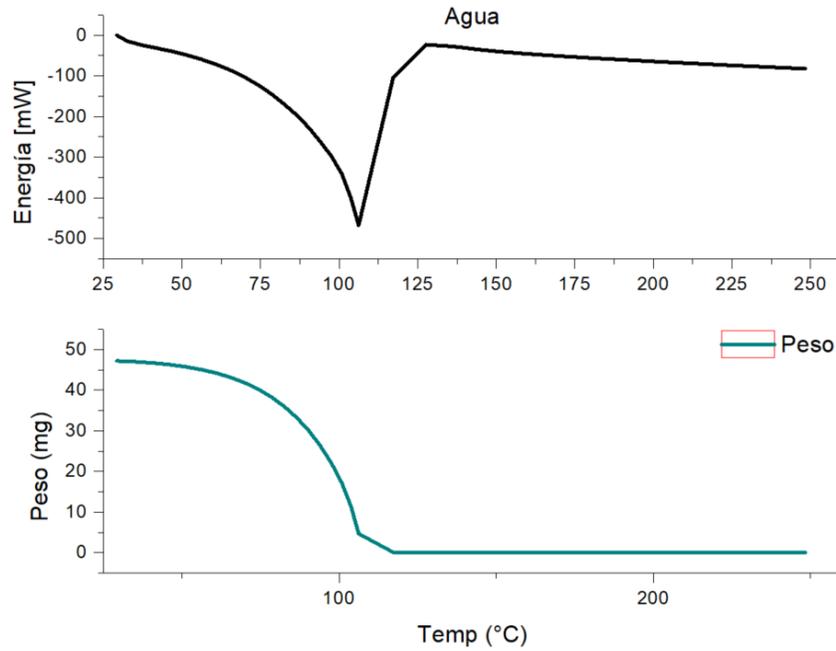


Figura 30.- Señal obtenida del análisis térmico de las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso. DSC (superior) y TGA (inferior)

En la figura 31 por su parte están los resultados de las partículas obtenidas con el extracto de etanol. De nueva cuenta en la señal DSC se presenta el cambio de energía alrededor de los 100 °C donde se presenta la evaporación del agua y la calcinación de los compuestos orgánicos. En el TGA la pérdida de peso se genera coincidiendo con el cambio de energía que se observó en el DSC. La concentración de partículas con extracto etanólico fue de 2.25 mg/mL.

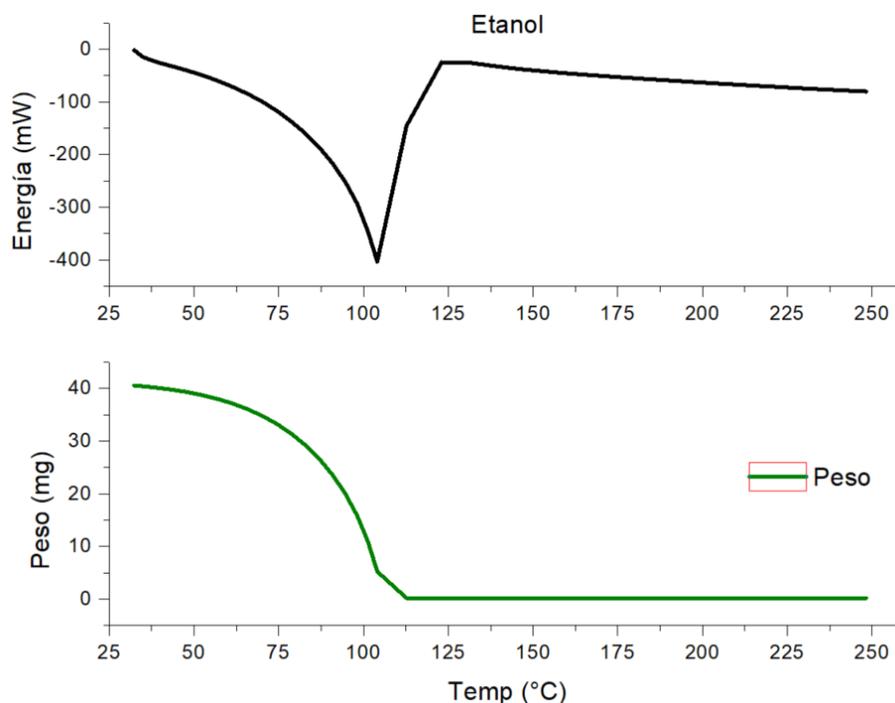


Figura 31.- Señal obtenida del análisis térmico de las nanopartículas obtenidas con extracto etanólico. DSC (superior) y TGA (inferior)

#### 3.3.2.4 Potencial Zeta

Como se menciona en la metodología, el potencial zeta permite conocer la estabilidad de una solución, es decir, si se formarán agregados o se mantendrán dispersas las partículas conforme pase el tiempo. En el caso de las AuNP los resultados obtenidos se muestran en la figura 32. Se puede observar que existe una tendencia similar entre las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso que las obtenidas con extracto etanólico. Es preciso aclarar que en los resultados de esta prueba se busca tener valores muy negativos o muy positivos. Se puede considerar como estable aquella solución que presente un potencial zeta de 30 mV o más, o bien, -30 mV o menos. Al tener pH ácido (3), la estabilidad es casi nula, observamos valores de -10 mV en el caso de las acuosas y -11 mV en el caso de las etanólicas.

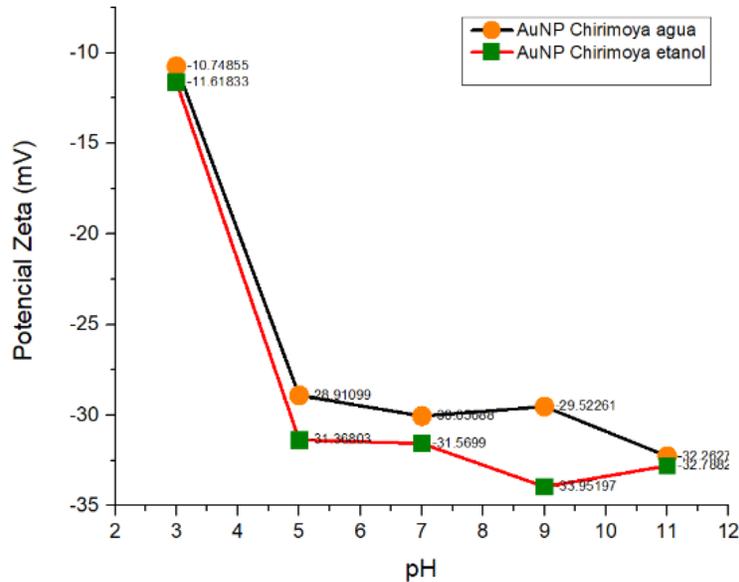


Figura 32.- Potencial Zeta de las AuNP en distintos pH.

Ahora bien, al modificar hacia pH más básico la estabilidad tiene una mejora significativa. Cuando se analizó en un pH de 5 los resultados para las partículas acuosas y etanólicas fueron de -28 mV y -31 mV respectivamente. Si bien en el caso de las partículas obtenidas con extracto acuoso aún no se supera el valor para considerarse realmente estable, las de extracto etanólico si lo hacen, manteniendo este valor de -31 mV al pasar a pH de 7. Esta estabilidad mostrada por las AuNP de extracto etanólico aumenta en pH 9 hasta -33 mV y disminuye ligeramente al subir el pH a 11, llegando a -32 mV. Por su parte, las AuNP de extracto acuoso aumentan la estabilidad al pasar a pH 7, logrando valores de -30 mV, lo que representa una suspensión estable. Ahora bien, cuando se aumenta el pH a 9, la estabilidad lograda se pierde y se regresa a valores por debajo de -30. Sin embargo, cuando se aumenta aún más este pH hasta 11 se alcanzan valores de -32 mV.

Existen dos resultados importantes de lo obtenido con esta prueba. El primero es que la estabilidad de estas partículas aumenta al aumentar el pH, particularmente las AuNP de extracto acuoso que logran ser estables solo si el pH aumenta a 7 u 11; esto se debe a que la suspensión se aleja del punto isoeléctrico, lo que le confiere una mayor estabilidad. El segundo,

y tal vez más importante, es que, al tener un pH de 7, que se considera neutro, tanto las AuNP de extracto acuoso como las de extracto etanólico son estables. Al ser este el pH del cuerpo humano es posible considerar que las nanopartículas conservarán parte de su estabilidad al ingresar al cuerpo.

Ahora bien, estos resultados permiten realizar con mayor certeza la modificación del pH durante la síntesis. En la figura 33 se muestra la comparación entre la estabilidad mostrada por las partículas sin modificación con las modificadas; estas nanopartículas, como ya se ha mencionado, se obtuvieron con extracto acuoso.

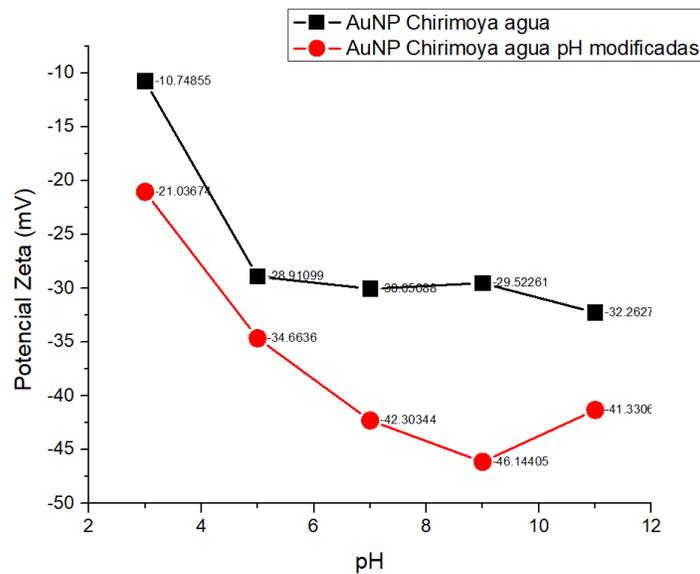


Figura 33.- Potencial Zeta de las nanopartículas con modificación de pH durante la síntesis

Es evidente que existe una mejora significativa en la estabilidad de las partículas al modificar la síntesis. De igual manera que en los resultados mostrados en el tamaño de las partículas, con la reducción de tamaño muy notoria, las AuNP con el pH modificado tienen una estabilidad mucho más alta en todas las condiciones de las pruebas. Desde el pH de 3 presentan un valor de -21 mV, que, si bien no son estables, tienen un valor al doble de lo que presentan las nanopartículas sin modificar. Por otro lado, al ir en aumento el pH la estabilidad lo hace de la misma forma, llegando a un máximo en el pH 9 con -46 mV y reduciéndose al elevar el pH a 11. Nuevamente se observó una buena estabilidad a pH 7, lo que les permitiría conservar dicha estabilidad en el cuerpo humano; es importante destacar que esto se menciona sin tomar en

cuenta otras variables que pueden modificar el comportamiento de las partículas y que requieren de otro tipo de pruebas.

### 3.3.2.5 Cristalinidad

Es importante conocer cuál es la estructura cristalina de los materiales a emplear. En el caso de las nanopartículas es necesario conocer cuál es su estructura y su plano de preferencia, ya que esto nos puede indicar algunas características de las mismas, así como su comportamiento. Para esto se empleó la técnica de difracción de rayos X; a continuación, se muestran los resultados de dicha prueba.

#### Difracción de Rayos X

En la figura 34 se presentan los picos correspondientes a cada uno de los planos cristalinos de las nanopartículas de oro obtenidas con extracto acuoso. Debido a las señales mostradas se clasifica la celda con una celda cúbica centrada en las caras. Siendo esta la estructura cristalina característica de las nanopartículas de oro. La mayor señal se ubica en la región de  $38.14^\circ$  lo que corresponde al plano (1 1 1), este plano es aquel en el que se presenta la preferencia de crecimiento (Krishnamurthy et al., 2014).

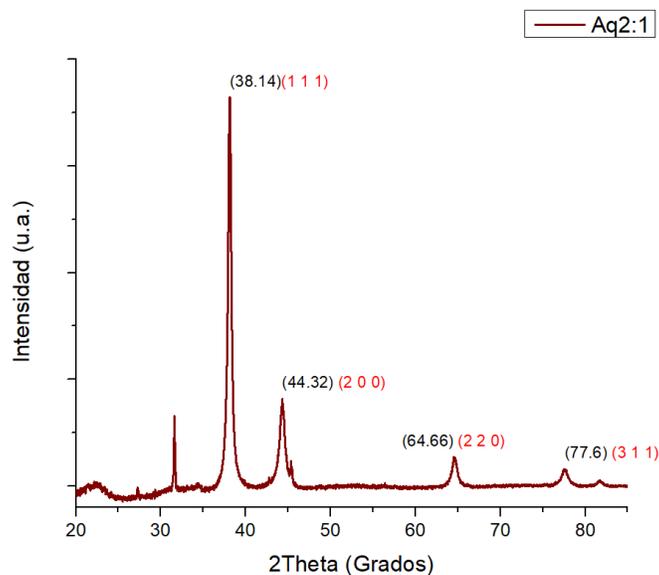


Figura 34.- Señal obtenida en la prueba de DRX para las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso

En resumen, debido a las señales mostradas, se considera que las nanopartículas de oro obtenidas con extracto acuoso son cristalinas, con una estructura cúbica centrada en las caras y preferencia en el plano (1 1 1).

Ahora bien, en la figura 35 se muestran las señales obtenidas por las AuNP de extracto etanólico. En este caso se observa una señal más limpia, lo que puede indicar un tamaño de cristalita más pequeño, así como una mayor pureza de las nanopartículas. De nueva cuenta tenemos las señales que corresponden a una celda cúbica centrada en las caras, con la mayor intensidad en la señal de 38.2°, que corresponde al plano (1 1 1), indicando que es el plano preferente de crecimiento, justo como se menciona en la literatura (Krishnamurthy et al., 2014).

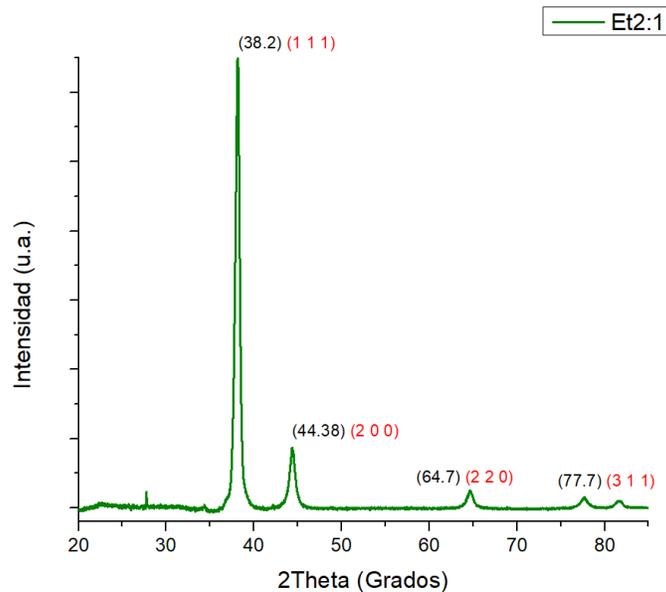


Figura 35.- Señal obtenida en la prueba de DRX para las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso

Al igual que con el extracto acuoso se concluye que las nanopartículas obtenidas con el extracto etanólico presentan una estructura cristalina cúbica centrada en las caras con la mayor intensidad en la señal de 38.2°, que corresponde al plano (1 1 1), de tal forma que este es el plano preferente de crecimiento, tal y como se menciona en la literatura (Krishnamurthy et al., 2014). Independientemente del extracto empleado se obtuvieron nanopartículas cristalinas con los planos correspondientes a la estructura cubica centrada en las caras.

## 3.4 Actividad antitumoral

Para evaluar la actividad antitumoral se empleó el ensayo MTT, en el ensayo, como se menciona en la metodología, se empleó el extracto puro y las nanopartículas. Se realizaron pruebas preliminares para determinar las concentraciones adecuadas; a continuación, se resumen los resultados de dicha prueba.

### 3.4.1 Viabilidad celular

#### 3.4.1.1 Ensayo MTT

A partir de las pruebas preliminares se determinó evaluar con las concentraciones de 100 µg/mL, 400 µg/mL y 800 µg/mL. Como se ha mencionado la técnica MTT consiste en una técnica colorimétrica que evalúa la reducción enzimática de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán, en presencia de succinato deshidrogenasa mitocondrial, de tal forma que se mide la absorbancia del tratamiento y del control negativo; de esta manera es posible hacer una relación entre estas absorbancias y obtener un porcentaje de células que aún son viables.

En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos para el extracto, luego de realizar los cálculos correspondientes con la ecuación 1. Se observa que a altas concentraciones el extracto presenta toxicidad para los fibroblastos IMR-90, lo que indica que no es posible emplear concentraciones tan altas del extracto en un tratamiento ya que generaríamos un daño a las células sanas. Por su parte las MCF7, que corresponden a cáncer de mama, no se ven afectadas de manera significativa por el extracto, incluso al aumentar las concentraciones al máximo; no siendo de la misma forma con las células HepG2, donde al aumentar a concentraciones de 400 µg/mL se tiene más del 50% de células muertas. Esto indica una posible selectividad del extracto acuoso de la chirimoya, que no necesariamente se comporta de una forma positiva.

Tabla 9.- Resultados de viabilidad celular obtenida de la prueba MTT para los extractos acuosos de Chirimoya.

<b>CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO</b>	<b>IMR-90</b>	<b>MCF7</b>	<b>HEPG2</b>
<b>100 (µG/ML)</b>	56.33	72.44	62.12
<b>400 (µG/ML)</b>	45.86	72.44	43.08
<b>800 (µG/ML)</b>	32.65	71.04	43.30

En la tabla 10 se resumen los resultados de viabilidad celular en porcentaje para el caso de las nanopartículas de oro. Es posible observar un comportamiento muy diferente al mostrado por el extracto solo. Iniciando con los fibroblastos, no importa cuánto se eleve la concentración de nanopartículas, no se genera muerte celular. En el caso de las células MCF7, se mantiene el hecho de que no se exista muerte celular en las primeras concentraciones; sin embargo, al aumentar la concentración en esta línea celular, se propicia el desarrollo de la misma, situación que debe tenerse muy presente en las posibles aplicaciones a desarrollar. Por último, en el caso de la línea celular HepG2, se genera muerte celular, alcanzando el IC50 (concentración necesaria para lograr el 50% de la muerte celular) en una concentración de 800 µg/mL. Logrando muerte celular, pero de una forma muy poco efectiva ya que se requieren altas dosis para conseguirlo.

Tabla 10.- Resultados de viabilidad celular obtenida de la prueba MTT para las nanopartículas de oro obtenidas con el extracto acuoso.

<b>CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO</b>	<b>IMR-90</b>	<b>MCF7</b>	<b>HEPG2</b>
<b>100 (µG/ML)</b>	98.88	80.46	69.22
<b>400 (µG/ML)</b>	87.51	86.61	61.08
<b>800 (µG/ML)</b>	100	91.17	47.05

En la figura 36 se muestran estos resultados de manera gráfica, esto permite comparar de manera visual los resultados ya mencionados. Se presenta una mayor muerte celular en el caso del extracto puro en comparación de las nanopartículas. Las nanopartículas incrementan la selectividad, sin embargo, es preciso buscar nuevas pruebas para determinar qué tipo de muerte se genera, así como si es posible incrementar la muerte inducida por las nanopartículas de oro, ya sea con una modificación superficial o bien mezclado con otro terapéutico ya establecido en el mercado que permita reducir las dosis requeridas para alcanzar el IC50.

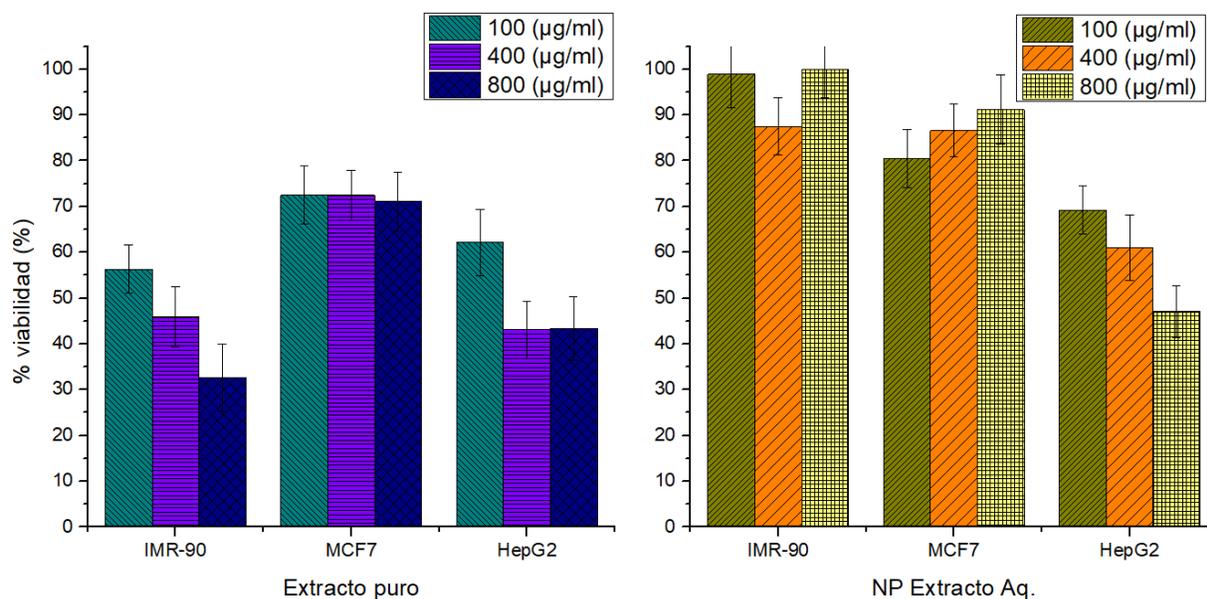


Figura 36.- Resultados de la prueba MTT del extracto puro (izquierda) y las nanopartículas de oro (derecha)

### 3.5 Actividad antibacterial de extractos etanólicos de *Annona cherimola* Mill.

La actividad antibacterial se evaluó tanto en bacterias gram positivo como en bacterias gram negativo. El primer resultado observado es que ninguno de los extractos evaluados presentó actividad en las bacterias gram negativa, en este caso la bacteria *P. aeruginosa*. Esto sugiere que la estructura que presenta la bacteria gram positiva *S. aureus* tiene un papel importante en la interacción con los compuestos de los extractos.

En la figura 37 se muestra la actividad presentada por cada uno de los extractos acuosos contra la bacteria *S. aureus*. Es evidente que todos los extractos son dependientes de la concentración para ejercer la actividad antibacteriana. Cuando se emplea una concentración de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , en el caso de maceración (Figura 37 a), se presenta una actividad antibacteriana de 80-90%, mientras que al disminuir a 1000  $\mu\text{g/mL}$  la actividad disminuye hasta 60-80% 1-2 horas respectivamente. Cuando llegamos a la menor concentración que es de 200  $\mu\text{g/mL}$  la actividad decae hasta menos de 30%; en el caso del extracto por Soxhlet (figura 37 b) se observa un comportamiento similar, sin embargo, la actividad antibacteriana es menor, lo que es un indicativo que la técnica de extracción posiblemente degrada los compuestos que tienen dicha actividad y perjudica en el rendimiento para esta aplicación.

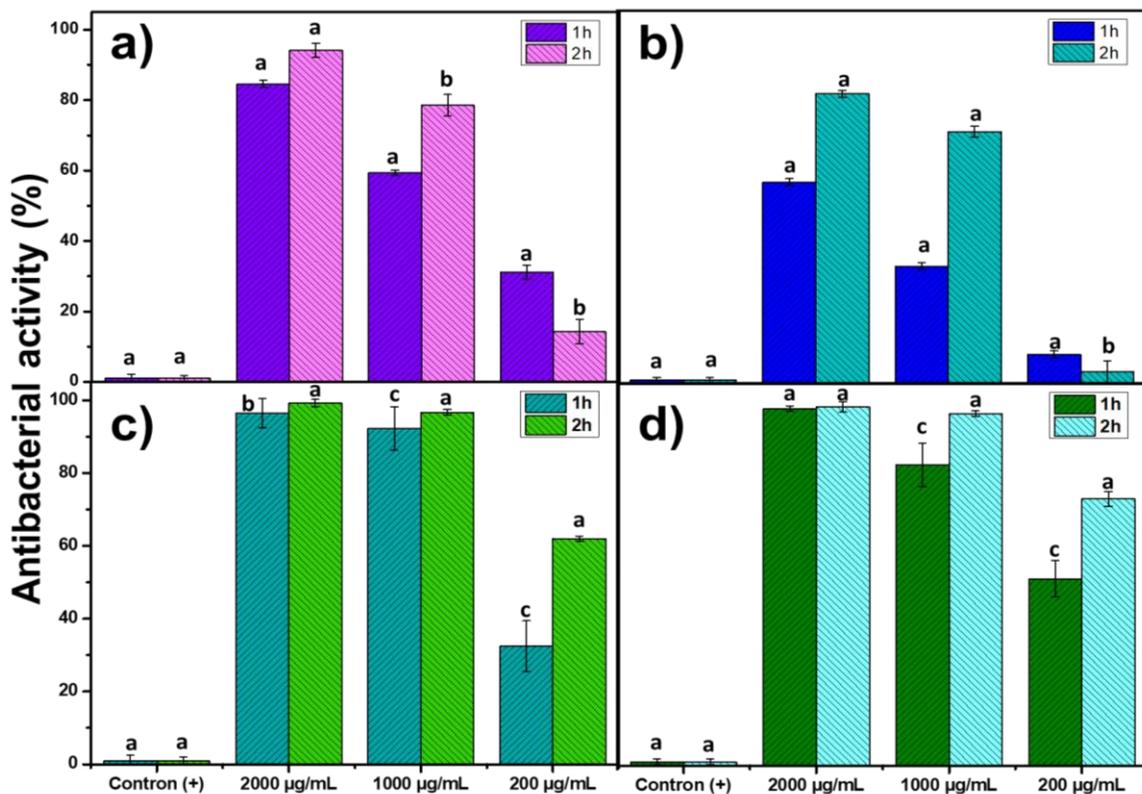


Figura 37.- Porcentajes de la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de la chirimoya empleando diferentes métodos de extracción. a) Maceración, b) Soxhlet, c) UAE 5 min 50%, d) UAE 5 min 100%

Ahora bien, en los extractos de UAE la actividad antibacteriana es sobresaliente, en la mayor concentración se tiene que la actividad evita totalmente el crecimiento, mientras que al disminuir a 1000 µg/mL la inhibición se mantiene por encima del 90%. Es importante notar que cuando la amplitud de extracción fue de 100% (figura 37 d) aún con la concentración más baja de 200 µg/mL la actividad se mantiene por encima del 50%.

Se puede considerar que los compuestos antibacteriales que se encuentran en la *Annona cherimola* Mill se ven afectados por la presencia de calor; ya que, a pesar de que la técnica de extracción por Soxhlet presenta un mayor rendimiento de extracción en peso su actividad antibacteriana es muy pobre al compararlo con las otras dos técnicas. Tanto maceración como UAE presentan una mayor actividad antibacteriana; ambas técnicas no requieren de tiempos prolongados en presencia de temperaturas altas al momento de realizar la extracción.

Por otro lado, los tiempos cortos de extracción necesarios en el método UAE en comparación con maceración, además del rendimiento sobresaliente de acción antibacteriana, vuelven a colocar dicho método de extracción como el mejor para esta aplicación.

## Capítulo 4.- Conclusiones

Los extractos de *Annona cherimola* Mill. presentan una mayor capacidad antioxidante respecto a aquellos que se obtuvieron de la *Annona muricata* L., esto convierte a la chirimoya en una especie candidata a aplicaciones antioxidantes. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* de la actividad antioxidante, previo a considerar estos resultados como definitivos.

Ahora bien, respecto a los métodos de extracción empleados se demostró que la extracción por Soxhlet y la UAE tienen mayores rendimientos de extracción respecto al método de maceración. Es importante destacar que, los rendimientos pueden cambiar respecto al solvente empleado, incluso dentro de la misma técnica. Al hacer la extracción usando agua como solvente, el rendimiento es mayor en todas las técnicas, esto comparado con los rendimientos cuando el solvente es etanol. De acuerdo a esto se establece que el agua funciona como un mejor solvente para obtener mayores cantidades de compuestos presentes en las hojas de la *Annona cherimola* Mill.

Se sugiere la presencia de acetogeninas en los extractos de chirimoya al observar los resultados de las técnicas espectroscópicas FT-IR y UV-Vis en comparación con los cálculos teóricos realizados para cada técnica, por DFT y TD-DFT respectivamente. Se confirmó dicha presencia con la técnica de HPLC, donde los resultados muestran tiempos de retención que se pudieron atribuir a determinadas acetogeninas de acuerdo a lo reportado en la literatura. La muestra CE-US13 presentó la mayor definición en los tiempos de retención, lo que indica una mayor presencia de acetogeninas; debido a esto, se plantea que la UAE puede funcionar como una extracción selectiva de acetogeninas como el compuesto mayoritario, esto bajo ciertos parámetros de operación y con etanol como solvente.

La UAE presenta tiempos de extracción que son 99.8% más rápidos que el método de Soxhlet, además, permite obtener una presencia significativa de acetogeninas. A pesar de que los rendimientos de extracción y la capacidad antioxidante es más baja en comparación al método soxhlet, la UAE es un método apto para la obtención de compuestos de chirimoya en tiempos cortos y con un contenido fenólico y de acetogeninas aceptable.

Empleando los extractos etanólicos y acuosos de la chirimoya se obtuvieron nanopartículas de oro que mantienen una capa de compuestos orgánicos provenientes de los mismos extractos. Es importante destacar que los mejores resultados se obtienen al tener una mayor cantidad de sal respecto al extracto, ya que esto permite una reacción más lenta y por lo tanto la morfología y los tamaños son más definidos.

La señal que se obtiene del plasmón de resonancia es más definida en las síntesis que se realizan con el extracto acuoso, esto se atribuye a una mayor cantidad de polifenoles en estos extractos, lo que provoca una mayor producción de nanopartículas de oro; ya que los polifenoles son los compuestos que, se ha comprobado, tienen una mayor interacción en la síntesis verde.

De acuerdo a los espectros que se obtuvieron de las AuNP se estableció que, en el caso de las nanopartículas obtenidas con extracto acuoso, hay un decremento de la señal de compuestos orgánicos. Esto indica una menor presencia de compuestos polifenólicos y/o acetogeninas; es posible que estos compuestos fueran partícipes en el proceso de síntesis, generando una mayor cantidad de AUNP, pero con menor cantidad de material orgánico presente posterior a los procesos de lavado.

Las morfologías observadas, principalmente son tetraédricas y decaédricas, estas son morfologías que ya se han reportado en investigaciones de síntesis verde con otras especies de la familia *Annonaceae*. De igual forma la estructura cristalina fue definida, cúbica centrada en las caras, que corresponde también a una estructura ya reportada.

La estabilidad de las AUNP en pH neutro es alta, esto permitiría el uso de las partículas en el cuerpo humano, ya que este presenta un pH neutro. La estabilidad se elevó al modificar el pH desde la síntesis hacia un pH más básico, esto muestra una reducción en el tamaño. Previo a la modificación de dicho pH se obtuvieron tamaños de aproximadamente 240 nm con el extracto acuoso, y de 60 nm con el extracto etanólico, mientras que al modificar el pH los tamaños son de 10 nm aproximadamente en el extracto acuoso. Esta reducción se considera como una reducción por la desaparición de agregados al aumentar la estabilidad en suspensión de las

partículas. La distribución de tamaños también disminuye cuando se realiza la síntesis en un pH más básico, de nueva cuenta contribuyendo el aumento de la estabilidad a esta situación.

En el estudio de la actividad antitumoral los extractos por sí mismos presentaron citotoxicidad hacia las células cancerígenas HepG2. Sin embargo, con las MCF-7 no existió una importante mortalidad; por otro lado, presentaron una peligrosa tendencia a dañar fibroblastos, incluso en las menores concentraciones; esta situación hace que no sea viable emplear los extractos de chirimoya en un tratamiento antitumoral. Ahora bien, cuando se emplearon las nanopartículas, esta situación cambió, ya que ahora se mostró una selectividad hacia las células HepG2, respetando a los fibroblastos IMR-90. No obstante se encontró que la concentración  $IC_{50}$  es muy alta, lo que obliga a replantear si las nanopartículas de oro obtenidas con los extractos de chirimoya requieren una modificación adicional que permita aumentar su efectividad en esta aplicación.

El estudio de la actividad antibacterial, muestra la oportunidad de tener agentes antimicrobianos de bajo costo, ya que los extractos tuvieron un comportamiento sobresaliente contra las bacterias Gram positiva, siguiendo la tendencia de eficiencia en los métodos de extracción UAE>SX>MC. Esto indica, también, que el método UAE permite extraer compuestos antibacteriales en lapsos de tiempo muy cortos.

## Perspectivas a futuro

La presente investigación abre la posibilidad a futuro para identificar con mayor precisión cuales son las acetogeninas presentes en las hojas de la *Annona cherimola* Mill. También, establece la posibilidad de completar el estudio de la actividad antioxidante con estudios In vivo, de tal forma que permita establecer la capacidad de estos extractos para ser empleados en distintas aplicaciones como antioxidantes.

Por otro lado, es posible realizar una investigación más profunda sobre la extracción empleando únicamente la técnica UAE, de tal forma que se puedan refinar los parámetros que generen la mayor producción de los compuestos deseados. Esto puede ir de la mano con

pruebas de actividad antibacterial, buscando establecer condiciones que permitan extraer compuestos que sean capaces de actuar contra bacterias Gram negativo.

Respecto a la actividad antitumoral se plantea la posibilidad de usar las AUNP obtenidas por síntesis verde, en conjunto con otros quimioterapéuticos ya establecidos en el mercado, de tal forma que se pueda evaluar un posible incremento de actividad antitumoral de ambos, específicamente sobre la línea celular HepG2, manteniendo la selectividad mostrada en el presente proyecto.

## Referencias

- Agbor, G. A., Vinson, J. A., & Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 3, 147–156.
- Agu, K. C., Okolie, N. P., Falodun, A., & Engel-Lutz, N. (2017). In vitro anticancer assessments of *Annona muricata* fractions and in vitro antioxidant profile of fractions and isolated acetogenin (15-acetyl guanacone). *Journal of Cancer Research and Practice*, 5(2), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.12.001>
- Albuquerque, T. G., Santos, F., Sanches-Silva, A., Beatriz Oliveira, M., Bento, A. C., & Costa, H. S. (2016). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*, 193, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.044>
- Angulo Rodríguez, A. A., Galindo Uriarte, A. R., Avendaño Palazuelos, R. C., & Pérez Angulo, C. (2012). UNIDAD 5. Captura y transformación de energía. En *Biología Celular* (pp. 119–143).
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20(4), 30–40.
- Baba, S. A., & Malik, S. A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*, 9(4), 449–454. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>
- Barreca, D., Laganà, G., Ficarra, S., Tellone, E., Leuzzi, U., Galtieri, A., & Bellocco, E. (2011). Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Research International*, 44(7), 2302–2310.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.031>

- Bayat, M., & Ghaidari, D. (2021). Nanoparticles and liver cancer. *Nano Drug Delivery Strategies for the Treatment of Cancers*, 119–143. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819793-6.00006-0>
- Bento, E. B., Matias, E. F. F., Brito, F. E., Oliveira, D. R., Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., ... Menezes, I. R. A. (2013). Association between food and drugs: Antimicrobial and synergistic activity of *Annona muricata* L. *International Journal of Food Properties*, 16(4), 738–744. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.565905>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Chen, C. (1999). Aromin-A, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*, 51(3), 429–433. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00002-3)
- Chen, K., Zhu, S., Xiang, G., Duan, X., He, J., & Chen, G. (2016). Ablation effects of noninvasive radiofrequency field-induced hyperthermia on liver cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.009>
- Cheng, Z., Li, X., & Ding, J. (2016). Characteristics of liver cancer stem cells and clinical correlations. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.041>
- Chuzeville Munguía, C., Díaz Sobac, R. R., & Álvarez Sánchez, E. (2015). *Identificación de la modulación de la proteína tau en el tratamiento in vitro con acetogeninas de guanábana (Annona muricata)*. Universidad Veracruzana. Recuperado de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/42611/ChuzevilleMunguiaCarolee.pdf;jsessionid=46EB7420CEBA6730AD94999751B8E10C?sequence=2>
- da Trindade, M. L. M., Radünz, M., Ramos, A. H., Silva Silveira, C., Avila Gandra, E., & Helbig, E.

- (2020). Chemical characterization, antimicrobial and antioxidant activity of sugar-apple (*Annona squamosa* L.) pulp extract. *Rev Chil Nutr*, 47(2), 281–285.
- Daher, S., Massarwa, M., Benson, A. A., & Khoury, T. (2018). Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review. *Journal of clinical and translational hepatology*, 6(1), 69–78. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00031>
- de Castro de Pardo, C. (2006). PRUEBAS DE TAMIZAJE PARA DETERMINAR EFECTOS CITOTÓXICOS EN EXTRACTOS, FRACCIONES Ó SUSTANCIAS, UTILIZANDO LA PRUEBA DEL MTT.
- Del Carmen Sánchez-Navarro, M., Ruiz-Torres, C. A., Niño-Martínez, N., Sánchez-Sánchez, R., Martínez-Castañón, G. A., DeAlba-Montero, I., & Ruiz, F. (2018). Cytotoxic and bactericidal effect of silver nanoparticles obtained by green synthesis method using annona muricata aqueous extract and functionalized with 5-fluorouracil. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6506381>
- Durán, A. G., Gutiérrez, M. T., Mejías, F. J. R., Molinillo, J. M. G., & Macías, F. A. (2021). An overview of the chemical characteristics, bioactivity and achievements regarding the therapeutic usage of acetogenins from annona cherimola mill. *Molecules*, 26(10). <https://doi.org/10.3390/molecules26102926>
- Fabiani, R. (2020). Antitumoral properties of natural products. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030650>
- Fahlman, B. D. (2007). Materials Chemistry. En *Materials Chemistry* (p. 485). Springer. Recuperado de <http://www.springer.com/978-1-4020-6119-6>
- Gangapuram, B. R., Bandi, R., Alle, M., Dadigala, R., Kotu, G. M., & Guttena, V. (2018). Microwave assisted rapid green synthesis of gold nanoparticles using *Annona squamosa* L peel extract for the efficient catalytic reduction of organic pollutants. *Journal of Molecular Structure*, 1167, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.004>
- Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., & AEI-Shemy, H. (2014). Phytochemical

- screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), S355–S363. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60258-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60258-3)
- Gavamukulya, Y., Maina, E. N., Wamunyokoli, F., Meroka, A. M., Madivoli, E. S., El-Shemy, H. A., & Magoma, G. (2019). Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from Ethanolic Extracts of Leaves of *Annona muricata*: A Green Nanobiotechnology Approach. *Biotechnology Journal International*, 1–18. <https://doi.org/10.9734/bji/2019/v23i430083>
- Gavamukulya, Y., Wamunyokoli, F., & El-Shemy, H. A. (2017). *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.009>
- Gómez-Gaete, C. (2014). Nanopartículas Poliméricas: Tecnología y Aplicaciones Farmacéuticas. *Revista farmacologica de Chile*.
- Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75–80. <https://doi.org/10.31260/repertmedcir.v27.n2.2018.191>
- González Vega, M. E. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34, 52–63. Recuperado de <http://www.ediciones.inca.edu.cu>
- Guerra Corado, E. A. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio. Universidad De San Carlos De Guatemala*. Recuperado de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0951\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf)
- Hidalgo, J. R., Neske, A., Iramain, M. A., Alvarez, P. E., Bongiorno, P. L., & Brandán, S. A. (2019). FT-IR, FT-Raman and UV-visible spectra of motrilin acetogenin isolated from *Annona cherimolia*. *Journal of Molecular Structure*, 1196, 508–517.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.06.107>

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Krishnamurthy, S., Esterle, A., Sharma, N. C., & Sahi, S. V. (2014). Yucca-derived synthesis of gold nanomaterial and their catalytic potential. *Nanoscale Research Letters*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-627>

Kuchur, O. A., Tsymbal, S. A., Shestovskaya, M. V., Serov, N. S., Dukhinova, M. S., & Shtil, A. A. (2020). Metal-derived nanoparticles in tumor theranostics: Potential and limitations. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *209*(February), 111117. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111117>

Latif M S, Abbas S, Kormin F, & Mustafa MK. (2019). Green Synthesis of Plant-Mediated Metal Nanoparticles: the Role of Polyphenols. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *12*(7), 75–84. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i7.33211>

Li, L., & Wang, H. (2016). Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.018>

Litter, M. I., Armienta, M. A., & Farías, S. S. (2009). *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. IBEROARSEN, CYTED, Buenos Aires, Argentina.

Liu, N., Yang, H. L., Wang, P., Lu, Y. C., Yang, Y. J., Wang, L., & Lee, S. C. (2016). Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, *189*, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>

Malvern Panalytical. (2018). Zeta potential. Recuperado de <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>

Manals-Cutiño, E., Penedo-Medina, M., & Giralt-Ortega, G. (2011). Análisis Termogravimétrico Y Térmico Diferencial De Diferentes Biomásas Vegetales. *Tecnología Química*, *31*(2), 36–43.

<https://doi.org/10.1590/2224-6185.2011.2.%x>

- Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Classification of Extraction Methods. En *Essentials of Botanical Extraction* (pp. 83–136). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802325-9.00006-9>
- Mazari, S. A., Ali, E., Abro, R., Khan, F. S. A., Ahmed, I., Ahmed, M., ... Shah, A. (2021). Nanomaterials: Applications, waste-handling, environmental toxicities, and future challenges - A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105028. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105028>
- Medici, S., Peana, M., Coradduzza, D., & Zoroddu, M. A. (2021). Gold nanoparticles and cancer: detection, diagnosis and therapy. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.017>
- Molina, G. A., Esparza, R., López-Miranda, J. L., Hernández-Martínez, A. R., España-Sánchez, B. L., Elizalde-Peña, E. A., & Estevez, M. (2019). Green synthesis of Ag nanoflowers using Kalanchoe Daigremontiana extract for enhanced photocatalytic and antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.044>
- Moraes, I. V. M. d., Rabelo, R. S., Pereira, J. A. d. L., Hubinger, M. D., & Schmidt, F. L. (2018). Concentration of hydroalcoholic extracts of graviola (*Annona muricata* L.) pruning waste by ultra and nanofiltration: Recovery of bioactive compounds and prediction of energy consumption. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.062>
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
- Nagwa. (2021). Lesson Explainer: Nanoparticles. Recuperado de <https://www.nagwa.com/en/explainers/640142370207/>

- National Cancer Institute. (2015). What Is Cancer? - National Cancer Institute. Recuperado el 15 de marzo de 2018, de <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- National Institutes of Health. (2018). Liver cancer - hepatocellular carcinoma: MedlinePlus Medical Encyclopedia. Recuperado el 15 de marzo de 2018, de <https://medlineplus.gov/ency/article/000280.htm>
- Nava, A. (2017). Las cicatrices del hígado. Agencia Informativa Conacyt. Recuperado de <http://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/salud/15107-higado-fascinante-laboratorio-del-cuerpo>
- Nicolet, T. (2001). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.073>
- Nuñez, C. (2008). Extracción con Equipo Soxhlet. *Bioquímica y Biología Molecular*, 2(3), 5. Recuperado de <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>
- Özyürek, M., Güclü, K., Tütem, E., Sözgen Baskan, K., Ercag, E., Esin Celik, S., ... Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1039/C1AY05320E>
- Parveen, K., Banse, V., & Ledwani, L. (2016). Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. *AIP Conference Proceedings*, 1724. <https://doi.org/10.1063/1.4945168>
- Periódico Correo. (2018). Reprueba México en atención al cáncer. Recuperado el 15 de marzo de 2018, de <https://periodicocorreo.com.mx/reprueba-mexico-atencion-al-cancer/>
- Priya M R, K., & Iyer, P. R. (2020). Antiproliferative effects on tumor cells of the synthesized gold nanoparticles against Hep2 liver cancer cell line. *Egyptian Liver Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s43066-020-0017-4>
- Puente, B. (2009). Maceración – Un proceso de extracción de activos. España: lineaysalud.com. Recuperado de <https://www.lineaysalud.com/que-es/macerar-maceracion>
- Qayed, W. S., Aboaraia, A. S., Abdel-Rahman, H. M., & Youssef, A. F. (2015). Annonaceous

Acetogenins as a new anticancer agent. *Der Pharma Chemica*.

Química, D. (2021). Extracción sólido-líquido (Soxhlet). Recuperado de <https://www.dequimica.info/extraccion-solido-liquido>

Quispe, A., Zavala, D., Rojas, J., Posso, M., & Vaisberg, A. (2006). Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342012000300002>

Rabinel, P., Dousse, D., Muscari, F., & Suc, B. (2017). Management of liver cancer. The Surgeon's point of view, 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2017.02.001>

Ramírez Aristizábal, L. S., & Marín Castaño, D. (2009). Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin.

Restrepo, O. D. P., & Ardila, M. C. M. (2010). Reacciones adversas ocasionadas por los biomateriales usados en prostodoncia. *Avances en Odontoestomatología*, 26(1), 19–30.

Ruddon, R. W. (2007). *Cancer Biology* (Fourth Edi). Oxford University Press.

Sankar, S., Li, H., Zhang, Z., Sharma, M., Usmani, Z., & Hou, T. (2021). Recent advances in essential oils-based metal nanoparticles: A review on recent developments and biopharmaceutical applications. *Journal of Molecular Liquids*, 333, 115951. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115951>

Santos-Espinoza, A., Gutiérrez-Miceli, F., Ruíz-Valdiviezo, V., & Montes-Molina, J. (2020). El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas, 24(2), 46–57.

Santos, J. A. M., Santos, C. S., Almeida, C. L. A., Silva, T. D. S., Freitas Filho, J. R., Militão, G. C. G., ... Menezes, P. H. (2017). Structure-based design, synthesis and antitumoral evaluation of enulosides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 128, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.036>

Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., & Luna-Cazáres, L. M. (2009). Las acetogeninas

de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 245–257. Recuperado de [https://www.mendeley.com/research-papers/las-acetogeninas-annonaceae-efecto-antiproliferativo-en-lineas-celulares-neoplásicas/?utm\\_source=desktop&utm\\_medium=1.17.13&utm\\_campaign=open\\_catalog&userDocumentId=%7B85f41639-4716-4b30-a803-63579933dd47%7D](https://www.mendeley.com/research-papers/las-acetogeninas-annonaceae-efecto-antiproliferativo-en-lineas-celulares-neoplasicas/?utm_source=desktop&utm_medium=1.17.13&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B85f41639-4716-4b30-a803-63579933dd47%7D)

Sharmin, S., Rahaman, M. M., Sarkar, C., Atolani, O., Islam, M. T., & Adeyemi, O. S. (2021). Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon*, 7(3), e06456. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06456>

Sheng, D., Xu, F., Yu, Q., Fang, T., Xia, J., Li, S., & Wang, X. (2015). A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.05.054>

Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S. L., & Llovet, J. M. (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.048>

Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4.

Sun, S., Liu, J., Sun, X., Zhu, W., Yang, F., Felczak, L., ... Zhou, K. (2017). Novel Annonaceous acetogenins from Graviola (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity. *Tetrahedron Letters*, 58(19), 1895–1899. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.016>

Taghizadeh, S., Alimardani, V., Roudbali, P. L., Ghasemi, Y., & Kaviani, E. (2019). Gold nanoparticles application in liver cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 25(December 2018), 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.027>

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106. Recuperado de <http://www.ipharmsciencia.com>

- Tormo, J. R., Estornell, E., Gallardo, T., González, M. C., Cavé, A., Granell, S., ... Zafra-Polo, M. C. (2001).  $\gamma$ -lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00036-1)
- Ukawa, S., Okada, E., Nakamura, K., Hirata, M., Nagai, A., Matsuda, K., ... Morimoto, K. (2017). Characteristics of patients with liver cancer in the BioBank Japan project. *Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1016/j.je.2016.12.007>
- Varadharaj, V., Christina, C., Ganesan, K. K., & Murthy, G. K. (2014). Silver Nanoparticle Synthesis from Aqueous Leaf Extract of *Annona Squamosa* ( L .) and assesment of its Antimicrobial Activity. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FRONTIERS IN SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2(3), 89–105.
- Vera, G. P., Farías, C. L., & Castañeda, F. A. |. (2017). Síntesis de nanopartículas metálicas por rutas verdes. *Journal of BioProcess and Chemical Technology*, 9(18), 15–20. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2421>
- Widmann, G. (2001). Información TA: Interpretación de curvas TGA. *UserCom*, 1–4.
- Yang, H., Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S., & Li, X. (2010). HPLC Method for the Simultaneous Determination of Ten Annonaceous Acetogenins after Supercritical Fluid CO<sub>2</sub> Extraction. *Int J Biomed Sci International journal of Blomedical science* (Vol. 6). Recuperado de [www.ijbs.org](http://www.ijbs.org)
- Zhou, Y., Wan, Y., Ye, Z.-W., He, Z., Liu, Q., & Shi, Y. (2017). How Hepatitis B virus causes cirrhosis and liver cancer. *Medical Hypotheses*. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.08.005>
- Zhu, J., Li, W., Zhu, M., Zhang, W., Niu, W., & Liu, G. (2014). Influence of the pH value of a colloidal gold solution on the absorption spectra of an LSPR-assisted sensor. *AIP Advances*, 4(3). <https://doi.org/10.1063/1.4869615>