



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE NANOCIENCIAS Y  
NANOTECNOLOGIA.

**“Estudio del efecto biológico de nanopartículas  
de plata sobre el parásito *Trypanosoma cruzi*”**

T E S I S

Que presenta

**ISAAC MISAEL LUCAS GOMEZ**

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN NANOCIENCIAS Y  
NANOTECNOLOGÍA

Directores de la Tesis:

**Dr. Daniel Bahena Uribe**

**Dr. José Alfredo Pescador Rojas.**

Ciudad de México

Noviembre, 2021

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de CVU 483363.

Se conto con el apoyo de Becas-Cinvestav 2020 con apoyo Extraordinario. Gestionado por Departamento de Becas y Estímulos del Cinvestav-IPN Zacatenco.

Agradecimientos especiales:

Físico Josué Esaú Romero Ibarra por mediciones de microscopia STEM del “LUME”

Dr. Jorge Roque de la Puente de LANE por sus valiosos consejos.

Dr. Jaime Santoyo Salazar Departamento de física Cinvestav-IPN

Ing. Lorena Ramírez Reyes Lanse Cinvestav-IPN

Se público un artículo derivado de este trabajo de tesis y un pre-print:

Lucas-Gómez, I., Carrasco-Torres, G., Bahena-Uribe, D., Santoyo-Salazar, J., Fernández-Martínez, E., Sánchez-Crisóstomo, I., ... & Aparicio-Burgos, J. E. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles with phytosterols and betalain pigments as reducing agents present in cactus *Myrtillocactus geometrizans*. *MRS Advances*, 5(63), 3361-3369.

Lucas-Gómez, I., López-Fernández, A., González-Pérez, B. K., Andrea, M., Calderón, A. V., & Gayosso-Morales, M. A. (2020). Docking study for Protein Nsp-12 of SARS-CoV with Betalains and Alfa-Bisabolol. arXiv preprint arXiv:2012.14504.

## ***Dedicatorias***

***A mi mamá Delia Gómez Gómez y Hermano Juan I. I. Lucas Gómez. Mi familia lo mejor de mi vida.***

## ***Agradecimientos***

***A mis profesores y asesores: Un agradecimiento muy especial a mis asesores y profesores: Dr. Daniel Bahena por sus consejos y apoyo incondicional, Dr. Jaime Santoyo por su apoyo y amistad, Dr. José Alfredo Pescador por su apoyo y consejos y al Dr. José Aparicio Burgos por su enseñanza en el área de parasitología y gran apoyo.***

***A todos mis amigos y compañeros del posgrado un fuerte abrazo y un gran agradecimiento: Briseida G. Pérez, Mauricio Medina, Gabriela Carrasco, Araceli Flores, Flor Garrido, Sandra Elguía, Elmer Joel y a todos mis compañeros.***

## ÍNDICE GENERAL

Índice General	3
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	8
<a href="#"><u>Abreviaturas</u></a>	8
<a href="#"><u>Resumen</u></a>	10
<a href="#"><u>Abstract</u></a>	11
<a href="#"><u>Hipótesis</u></a>	12
I <a href="#"><u>Introducción</u></a>	12
II <a href="#"><u>Antecedentes</u></a>	15
II.1 <a href="#"><u>Nanopartículas de Plata (AgNPs)</u></a>	15
II.1.1 <a href="#"><u>Efecto antimicrobiano de AgNPs.</u></a>	16
II.1.2 <a href="#"><u>Mecanismo de acción del efecto antimicrobiano de AgNPs.</u></a>	17
II.1.3 <a href="#"><u>Síntesis de Nanopartículas de plata.</u></a>	18
II.1.3.1 <a href="#"><u>Reducción química</u></a>	19
II.1.3.2 <a href="#"><u>Hot injection (inyección caliente)</u></a>	20
II.2. <a href="#"><u>Extracto de vegetales</u></a>	21
II.2.1 <a href="#"><u>Productos naturales y medicina tradicional.</u></a>	21
II.2.2 <a href="#"><u>El cactus <i>Myrtillocactus geometrizans</i> o “garambullo”.</u></a>	24

II.2.3	<a href="#"><u>Síntesis verde de nanopartículas</u></a>	26
II.2.4.	<a href="#"><u>Trypanosoma cruzi y enfermedad de Chagas</u></a>	28
II.2.4.1.	<a href="#"><u>Enfermedad de Chagas.</u></a>	32
II.2.5.	<a href="#"><u>Técnicas utilizadas para el presente estudio.</u></a>	38
II.2.5.1	<a href="#"><u>Cromatografía.</u></a>	39
II.2.5.2	<a href="#"><u>Espectroscopía.</u></a>	39
II.2.6.	<a href="#"><u>Química teórica</u></a>	40
II.2.6.1.	<a href="#"><u>Química Cuántica</u></a>	41
II.2.6.2.	<a href="#"><u>Acoplamiento teórico Ligando-Proteína</u></a>	42
<b>III</b>	<b><a href="#"><u>Objetivos</u></a></b>	47
III.1	<a href="#"><u>Objetivo general</u></a>	47
III.2	<a href="#"><u>Objetivos específicos.</u></a>	47
<b>IV.</b>	<b><a href="#"><u>Material y Métodos</u></a></b>	47
IV. 1	<a href="#"><u>Preparación del extracto</u></a>	47
IV.2	<a href="#"><u>Obtención de síntesis de NPs de Ag.</u></a>	48
IV.3.	<a href="#"><u>Espectrometría UV-Vis</u></a>	48
IV.4.	<a href="#"><u>Análisis de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC / MS) de extracto de Myrtillocactus geometrizans.</u></a>	49
IV.5.	<a href="#"><u>Caracterización por Microscopía electrónica de transmisión (TEM).</u></a>	49
IV.6.	<a href="#"><u>Obtención de modelo molecular para el análisis de química computacional.</u></a>	50
IV.7.	<a href="#"><u>Cultivo y tratamiento celular LL47 Ensayo de citotoxicidad celular.</u></a>	50

IV.8.	<u><i>Ensayo de citotoxicidad celular en LL47.</i></u>	51
IV.9	<u><i>Cultivo de parásitos Trypanosoma cruzi.</i></u>	51
IV.10	<u><i>Ensayo de toxicidad in vitro de AgNPs para T. cruzi.</i></u>	52
IV.11	<u><i>Ensayo para evaluar efecto toxico de los vehículos, “agua inyectable” vs “solución buffer de fosfatos (PBS siglas en inglés)” sobre T. cruzi.</i></u>	53
IV.11	<u><i>Análisis estadístico.</i></u>	53
<b>V</b>	<b><u>Resultados y Discusión</u></b>	54
V.1.	<u><i>HPLC / MS análisis del extracto de fruta de M. geometrizans.</i></u>	54
V.2.	<u><i>Monitoreo del decaimiento del extracto de M. geometrizans por medio de UV-Vis.</i></u>	57
V.3.	<u><i>Análisis de Microscopia electrónica de transmisión barrido (STEM).</i></u>	58
V.4.	<u><i>Propuesta de mecanismo para la formación de AgNPs.</i></u>	60
V.5.	<u><i>Cálculos teóricos de los compuestos de Myrtillocactus geometrizans.</i></u>	62
V.6.	<u><i>Ensayo de cito-toxicidad con células LL47.</i></u>	64
V.7.	<u><i>Pruebas de viabilidad biológica de Trypanosoma cruzi.</i></u>	67
<b>VI</b>	<b><u>Conclusiones</u></b>	76
<b>VII</b>	<b><u>Recomendaciones y Perspectivas</u></b>	76
<b>VIII</b>	<b><u>Referencias</u></b>	78
<b>IX</b>	<b><u>Anexos</u></b>	85

## Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de las AgNPs.	18
Figura 2. Reducción y crecimiento de AgNPs de acuerdo con la teoría más aceptada	20
Figura 3. Fotografía de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> y su fruto.	25
Figura 4. Estructuras químicas de chichipegenin (1), peniocerol (2), macdougallin (3), estigmasterol (4), ácido oleico (5) y betalaínas (6). Todos los compuestos encontrados en <i>Myrtillocactus geometrizans</i> .	26
Figura 5. Ilustración que muestra estructuras y orgánulos encontrados en la forma epimastigote de <i>T. cruzi</i> , basada en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.	30
Figura 6. Estructura general de la bolsa flagelar (flagellar pocket FP).	31
Figura 7. Etapas de infección del <i>T. cruzi</i> , tanto en el vector como en el humano.	34
Figura 8. Perfil epidemiológico de Enfermedad de Chagas en México, 2000-2017.	36
Figura 9. Estudio y seroprevalencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> 2007-2017.	37
Figura 10 Cuadro de procedimiento de algoritmo de software EADock.	46
Figura 11. a) Análisis UV-Vis de la reacción de síntesis de Ag NPs con decaimiento del extracto de <i>M. geometrizans</i> . b) Imágenes de síntesis de nanopartículas a diferentes horas de reacción.	57
Figura 12. Micrografía de STEM e histogramas de tamaño de los AgNP sintetizados. (a) Usando OAm 40% / OA 60%, (b) Usando extracto de fruta de <i>M. geometrizans</i> .	59
Figura 13. AgNPs de 50-60 nm después de perder estabilidad en el día 20 y alcanzando estas formas al día 30.	60
Figura 14. Esquema de propuesta de mecanismo de reducción Ag por grupos funcionales como aminas.	61
Figura 15. Esquema general de Síntesis verde con <i>Myrtillocactus geometrizans</i> .	62

La Figura 16. Se muestra el resultado final de las estructuras químicas del cálculo in silico, que indica el enlace químico (O-H) con mayor probabilidad de generar un ácido H +.	64
Figura 17. Viabilidad celular de LL47 con AgNPs a diferentes concentraciones (a) Sección superior fibroblastos LL47 fijos en superficie de cultivo sin AgNPs, sección inferior número menor de fibroblastos fijos con AgNPs y algunos fragmentados a medida que se incrementan dosis de AgNPs (b) Efecto de los AgNPs sobre la viabilidad de las células en el ensayo MTT.	66
Figura 18. Reacción de reducción del formazán o formazano.	67
Figura 19. Reactivos que se reducen en cada técnica de evaluación de viabilidad biológica.	68
Figura 20. Reactivos que se reducen en cada técnica de evaluación de viabilidad biológica.	69
Figura 21. Grafica viabilidad biológica de <i>Trypanosoma cruzi</i> con AgNPs en forma epimastigotes.	70
Figura 22. Grafica viabilidad biológica de <i>Trypanosoma cruzi</i> con AgNPs en forma epimastigote.	71
Figura 23. Grafica viabilidad biológica de <i>Trypanosoma cruzi</i> con AgNPs (H <sub>2</sub> O), contra efecto osmótico de volumen de agua inyectable.	72
Figura 24. Grafica viabilidad biológica de <i>Trypanosoma cruzi</i> con AgNPs (PBS), contra efecto osmótico de volumen de solución buffer de fosfatos.	73
Figura 25. Grafica viabilidad biológica de <i>Trypanosoma cruzi</i> con AgNPs (PBS), contra efecto osmótico de volumen de solución buffer de fosfatos, aumentando el tiempo de reacción del reactivo del MTS a 3 horas extras sobre el tiempo protocolo.	74
Figura 27. Propuesta de mecanismo de acción de inhibición de AgNPs en <i>Trypanosoma cruzi</i> , unión de nanopartículas de plata a citostoma y bolsa flagelar y posterior internalización para generación de iones plata e iniciar estrés oxidativo (representado por Ag <sup>+</sup> ).	75

Figura 26. *T. cruzi* endocitosis: sitios de entrada la membrana entre el citostoma y el bolsillo flagelar es un dominio especial de membrana. Réplicas de fractura por congelación (a), el dominio de la membrana. 77

### Índice de Tablas

Tabla 1. Algunos de los tés más usados y sus propiedades medicinales	23
Tabla 2. Especies de plantas y algas usadas en la síntesis de AgNPs, tamaño y referencia.	27
Tabla 3 Masa molecular, tiempo de retención de datos (RT) y masa experimental ([M + H] + [M-H] -).	55
Tabla 4. El valor del enlace químico mayor y más positivo para el OH, calculado in silico, se indica para los siguientes compuestos químicos: chichipegénina (1), peniocerol (2), macdugalina (3), estigmasterol (4), oleico ácido (5) y betalaínas (6).	63

### ABREVIATURAS

Ag Plata.

AgNPs. Nanopartículas de plata.

NPs Nanoparticulas.

Nm. Nanómetros.

µm. Micrómetros.

µl microlitros.

ml mililitros.

µg microgramos.

*M. geometrizans. Myrtillocactus geometrizans.*

*T. cruzi. Trypanosoma cruzi.*

*E. coli Escherichia coli.*

*S. aureus Staphylococcus aureus.*

*$\Delta G$  Energía libre de Gibbs.*

FP La bolsa flagelar (flagellar pocket).

OPS Organización Panamericana de salud.

OMS Organización Mundial de la Salud.

CNTS Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

EUA Estados Unidos de América.

VHTS selección de alto rendimiento virtual.

TEM Microscopía Electrónica de transmisión.

UV Ultra violeta.

HPLC cromatografía de líquidos de alta resolución.

MS Espectroscopía de masas.

MM2. Mecánica molecular nivel 2.

FBS (PBS) Solución Buffer de fosfatos.

CN. Grupo control.

DMSO Dimetil sulfoxido.

MTT ensayo de viabilidad biológica para medir actividad celular metabólica por sal tetrazolio.

MTS ensayo de viabilidad biológica para medir actividad celular metabólica por sal tetrazolio soluble en medios de cultivo celulares.

ELISA ensayo de tipo enzimo-inmunoanálisis de adsorción para detectar anticuerpos.

DMEM solución de suero bovino fetal.

RPM revoluciones por minuto.

IC intervalo de confianza.

RT tiempos de retención.

## Resumen:

***Trypanosoma cruzi*** agente etiológico de la enfermedad de Chagas, el cual ha mostrado resistencia significativa frente a tratamientos farmacológicos (Nifurtimox) disponibles actualmente. El presente trabajo centra las pruebas en dos etapas de la vida del *Trypanosoma cruzi* que se presentan en seres humanos y cambia de torrente sanguíneo al interior de las células musculares, tripomastigote y amastigote respectivamente. Cuando está presente en órganos puntuales del ser humano, dificulta el tratamiento de infecciones crónicas de *Trypanosoma cruzi*. En el proyecto proponemos que las nanopartículas de plata siguen un mecanismo de inhibición de naturaleza diferente al farmacológico, sobre el parásito *Trypanosoma cruzi in vitro*. Para este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas mediante síntesis verde con extracto de ***Myrtillocactus geometrizans***, para aumentar la compatibilidad biológica, disminuir el efecto tóxico de los reactivos formadores y los disolventes orgánicos de purificación. Las nanopartículas de plata obtenidas son de diámetro promedio de 20 nm y poseen un ligero recubrimiento orgánico proveniente de los componentes del extracto vegetal de *M. geometrizans*. Las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde con *M. geometrizans* logran una inhibición del 80 % al 95 % (concentraciones de 1 µg/ml a 2.5 µg/ml) de las formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi in vitro*, existe la posibilidad de una internalización y una modificación morfológica en organelos por la acción de nanopartículas de plata, además se deben realizar estudios bioquímicos que identifiquen estrés oxidativo por parte del *Trypanosoma cruzi* para describir ruta de inhibición completa y pensar en algunas opciones terapéuticas.

## **Abstract:**

*Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, which has shown significant resistance to currently available pharmacological treatments (Nifurtimox). The present work focuses the evidence on two life stages of *Trypanosoma cruzi* that occur in humans and change from bloodstream to muscle cells, trypomastigote and amastigote respectively. When present in specific human organs, it hinders the treatment of chronic *Trypanosoma cruzi* infections. In the present project we propose that silver nanoparticles follow an inhibition mechanism of a different nature than the pharmacological one, on the *Trypanosoma cruzi* parasite in vitro. For this work, silver nanoparticles (AgNPs) obtained by green synthesis with *Myrtillocactus geometrizans* extract were synthesized to increase the biological compatibility, decrease the toxic effect of the forming reagents and purification organic solvents. The silver nanoparticles obtained have an average diameter of 20 nm and have a light organic coating from the components of the plant extract of *M. geometrizans*. The silver nanoparticles obtained by green synthesis with *M. geometrizans* achieve an inhibition of 80 % to 95 % (concentrations from 1 µg/ml to 2.5 µg/ml) of the amastigote and tripomastigote forms of the parasite *Trypanosoma cruzi* in vitro, there is the possibility of internalization and morphological modification in organelles by the action of silver nanoparticles, in addition, biochemical studies should be carried out to identify oxidative stress by *Trypanosoma cruzi* to describe the route of complete inhibition and to think of some therapeutic options.

## Hipótesis

Las Nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde en la cual se utilizará un extracto de *Myrtillocactus geometrizans*, tendrán efectos biológicos sobre el parásito *Trypanosoma cruzi*, en especial inhibición biológica en estudios *in vitro* con la forma epimastigote.

### I. Introducción

La nanotecnología es una de las innovaciones científicas de nuestro tiempo, es un campo interdisciplinario que une diversas disciplinas de la física, química, biología, ingeniería y medicina, estableciendo nuevas aplicaciones tecnológicas a escala nanométrica. Dado su carácter de nueva ciencia, esta área de conocimiento se encuentra en desarrollo, con el potencial de generar aplicaciones en los campos: de la energía, ciencia de los materiales, semiconductores (microprocesadores), ciencias biológicas y medicina (vacunas) (1, 2). Estas aplicaciones se llevan a cabo con: materiales nanoestructurados, nanocompuestos y nanopartículas.

Un material nanoestructurado (así como cualquier otro producto que posea calidades nanotecnológicas) es un producto de la tecnología formado por dos o más fases donde al menos una de las fases tiene una de sus tres dimensiones en el rango de nanoescala (<100 nm). Una de las clasificaciones de los materiales nanocompuestos tiene su base en la dimensionalidad: cero-dimensionales (ejemplo, nanopartículas (NPs) que incluyen óxidos, metales, semiconductores y polímeros), unidimensional (ejemplo, nanofibras, nanohilos, nanorodillos y nanotubos) de dos dimensiones (ejemplo, nanocapas que incluyen multicapas y monocapa) y en tres dimensiones (incluye nanomateriales compuestos (bulto-bulk), como nanogranos, micro y meso poros) (1-3).

Las propiedades fisicoquímicas únicas de cada nanomaterial han permitido encontrar diversas aplicaciones en campos que van desde la electrónica hasta la ciencia biomédica. Además, la amplia gama de elementos, compuestos y de técnicas empleadas en su creación permite generar diversas formas en las nanopartículas, tales como esférica, triangular, cúbica, pentagonal, rodillos y/o tubos, toroidal, etc. (1, 2).

Existen muchos procedimientos químicos para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNP), sin embargo, estos procedimientos utilizan productos químicos tóxicos, corrosivos y / o contaminantes. (4). Estudios toxicológicos sugieren que los elementos y reactivos de síntesis que se han utilizado en los AgNP envuelven un potencial peligro tóxico. Esta omisión sobre la toxicidad de los reactivos durante el diseño de síntesis en la etapa de generación de AgNPs podría causar, efectos secundarios adversos en aplicaciones biológicas, médicas o comerciales de las AgNPs, este inconveniente puede disminuirse con la aplicación de métodos de síntesis denominados “verdes” que evitan el uso de agentes tóxicos como solventes, sales de metales pesados y compuestos orgánicos generadores de estrés oxidativo (5-11).

La síntesis de nanopartículas coloidales típicas de metales nobles se derivan de la síntesis original del trabajo de Michael Faraday (12), que redujo las sales metálicas usando fósforo. Las mejoras ambientalmente amigables de este método utilizan precursores de mínima toxicidad, como el citrato de sodio, eliminando así el problema inherente de toxicidad, además de que con ese cambio de precursores se puede usar agua como solvente lo cual es un factor importante en la síntesis verde(12-16).

El uso de disolventes orgánicos en la síntesis de nanopartículas por métodos reportados en la literatura, generan desechos de compuestos orgánicos persistentes que pueden afectar el medio ambiente. (13, 17-19). Además, al aislar las nanopartículas muchos estudios sintéticos no informan los métodos por lo que las AgNP se dispersan un medio específico (8, 20). A diferencia de los métodos convencionales, la ruta de síntesis de

AgNPs reportada en este trabajo requirió de un producto natural como precursor y no recurrió al uso de solventes orgánicos tóxicos.

Aunque los nanocompuestos pueden producirse de una gran variedad de elementos o compuestos, en el presente trabajo se describe la síntesis verde de nanopartículas de plata (**AgNPs**) usando como agente reductor el extracto del fruto del cactus *Myrtillocactus geometrizans* (***M. geometrizans***), en una reacción química de reducción con el objetivo de que sea una síntesis verde. Además, se presenta evidencia de su efecto biológico sobre el parásito *Trypanosoma cruzi* (***T. cruzi***) agente causante de la enfermedad de Chagas (**ECh**).

Se seleccionaron AgNPs para este trabajo, debido a sus propiedades antimicrobianas, actualmente forman parte de nuestra vida cotidiana. Las AgNPs poseen propiedades físicas y electrónicas únicas, que las convierten en excelentes candidatos para aplicaciones médicas y biológicas. Estas propiedades fisicoquímicas están definidas por características como: tamaño, forma, carga superficial y recubrimiento. Controlando estas características se cuenta con varias posibilidades para la utilización de AgNPs (21, 22). Nuestra propuesta se centra en probar que las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de Ag tienen efectos antiparasitarios en el microorganismo generador de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quien nombró al parásito en honor de su mentor, Oswaldo Cruz. La cardiomiopatía dilatada es la manifestación más importante y severa de la ECh crónica humana y se caracteriza por insuficiencia cardíaca, arritmias ventriculares, bloqueos cardíacos, fenómenos tromboembólicos y muerte súbita. La enfermedad de Chagas es una zoonosis transmitida principalmente a través de secreciones cargadas de parásitos, provenientes de insectos triatóminos hematófagos. Estos insectos, que son vectores de

infección, están presentes en América del Sur y Central, México y el sur de los Estados Unidos (23-25).

A continuación se hará una breve descripción de los principios básicos de las nanopartículas de plata, el método de síntesis química para la obtención de estas (reducción química), características de las nanopartículas de plata, características del extracto de *M. geometrizans* y particularidades e importancia del protozooario *Trypanosoma cruzi*.

## **II. Antecedentes**

### ***II.1 Nanopartículas de Plata (AgNPs)***

Las nanopartículas son de gran interés científico ya que aportan propiedades catalíticas, energéticas, de superficie, reactividad química, entre otras y cuyos efectos se pueden manifestar a nivel de los denominados materiales bulto, así como en el orden de las estructuras moleculares. Entre las nanopartículas actuales, las más prometedoras (efectos antiparasitarios) son las nanopartículas en particular las de cobre (Cu) y plata (Ag) esto se debe a sus propiedades antibacterianas, que se producen debido a la alta relación superficie/volumen, propiedad clave de las nanopartículas. El cambio en el tamaño y la composición de la superficie modifica las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas (basado en la relación volumen /superficie). En las últimas décadas, la aplicación de nanopartículas metálicas es muy común debido a sus amplias aplicaciones en diversas industrias (26-28).

Las nanopartículas de un cierto rango (1–100 nm diámetro promedio), sufren un cambio en sus propiedades físicas, químicas y eléctricas. Estas propiedades dependen del tamaño, forma, comportamiento magnético, el potencial redox y composición de su superficie. En los últimos años, las nanopartículas de plata han atraído mucha atención debido a su buena conductividad, estabilidad química, uso como catalizadores y sus aplicaciones en diversas industrias, incluidas las ciencias médicas, para tratar infecciones

bacterianas, en la industria alimentaria como agentes antibacterianos en envasado de alimentos y también por sus cualidades eléctricas y ópticas (26, 29-31).

### ***II.1.1 Efecto antimicrobiano de AgNPs.***

Durante siglos la plata se ha usado para el tratamiento de quemaduras y heridas crónicas. Hacia al año 1.000 a. C. se utilizó plata para potabilizar agua. En 1700, el nitrato de plata se empleó para el tratamiento de enfermedades venéreas, abscesos óseos y perianales. En la década de 1940, después de la penicilina se introdujo el uso de plata para el tratamiento de infecciones bacterianas mínimas (32, 33). Los efectos antibacterianos de las sales de Ag se han observado desde la antigüedad, actualmente la Ag se utiliza para controlar el crecimiento bacteriano en una gran variedad de aplicaciones, trabajo dental, catéteres, lesiones y quemaduras (31). De hecho, se sabe que los iones de Ag y los compuestos basados en Ag son altamente tóxicos para los microorganismos, mostrando fuertes efectos biocidas en hasta 12 especies bacterianas incluyendo *E. coli*. Recientemente, se ha demostrado que compuestos híbridos de nanopartículas de Ag con macromoléculas anfipáticas e hiperramificadas exhibían efectos antimicrobianos efectivos como revestimiento superficial (32-34). La reducción de las dimensiones de los materiales biocompatibles y/o antibacterianos es una herramienta eficiente para aumentar la implementación en procedimientos y tratamientos médicos. Facilitando al paciente el seguimiento de su tratamiento. En este caso la nanotecnología ayuda a superar las limitaciones de transporte, almacenamiento, portabilidad y administración de tratamientos presentes y futuros. Además, los nanomateriales pueden ser modificados para mejorar efectividad y adecuarse a las necesidades de cada aplicación.

Como ejemplo, en 2007 *Kim, Kuk, et al.* mostraron resultados donde las nanopartículas de Ag presentan actividad antimicrobiana importante contra levaduras y *E. coli*. En contraste, reportan un efecto inhibitor leve de las nanopartículas de Ag en *S. aureus* en comparación con otros microorganismos. Los autores *Kim, Kuk, et al.* sugieren que las diferencias en los efectos antimicrobianos de las nanopartículas de Ag pueden estar asociados con características específicas en la estructura de membrana de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo el grosor del peptidoglucano la diferencia más

importante (34). Recientemente *Brito T. K. et al.* en 2020 mostraron que las nanopartículas de plata se presentan como un agente anti-*Trypanosoma cruzi* y los datos apuntan a la posible aplicación para nuevos estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* (35).

### ***II.1.2 Mecanismo de acción del efecto antimicrobiano de AgNPs.***

Todavía no se conoce el mecanismo de acción exacto de las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata, pero las teorías más aceptadas explican lo siguiente: las nanopartículas de plata se anclan a la pared celular bacteriana y penetran causando cambios estructurales en la membrana celular como la permeabilidad de la membrana y la muerte de la célula. Otro mecanismo de acción de las nanopartículas de plata es cuando estas ingresan al interior de la bacteria y forman radicales libres (iones plata) en el interior de la bacteria, los cuales causan la muerte de la célula por estrés oxidativo (generación de especies reactivas de oxígeno). La formación de radicales libres se confirma mediante estudios de resonancia de espín electrónico. Cuando están en contacto con las bacterias, los radicales libres tienen la capacidad de dañar la membrana celular, haciéndola porosa, lo que también conduce a la muerte celular (32, 34, 36, 37).

En comparación con otras sales de plata, las nanopartículas de plata muestran propiedades antimicrobianas eficaces debido a su gran área superficial que proporciona un mejor contacto con los microorganismos. La liberación de iones de plata por nanopartículas en las células bacterianas mejora su actividad bactericida. El mecanismo para la acción antimicrobiana de los iones de plata no se entiende apropiadamente, sin embargo, se sugiere que cuando los iones de plata penetran dentro de la célula bacteriana, la molécula de ADN se convierte en su forma condensada y pierde su capacidad de replicación, lo que conduce a la muerte celular. Además, se ha informado que los metales pesados reaccionan con las proteínas al unirse con el grupo tiol y las proteínas se inactivan (33, 34, 36, 37).

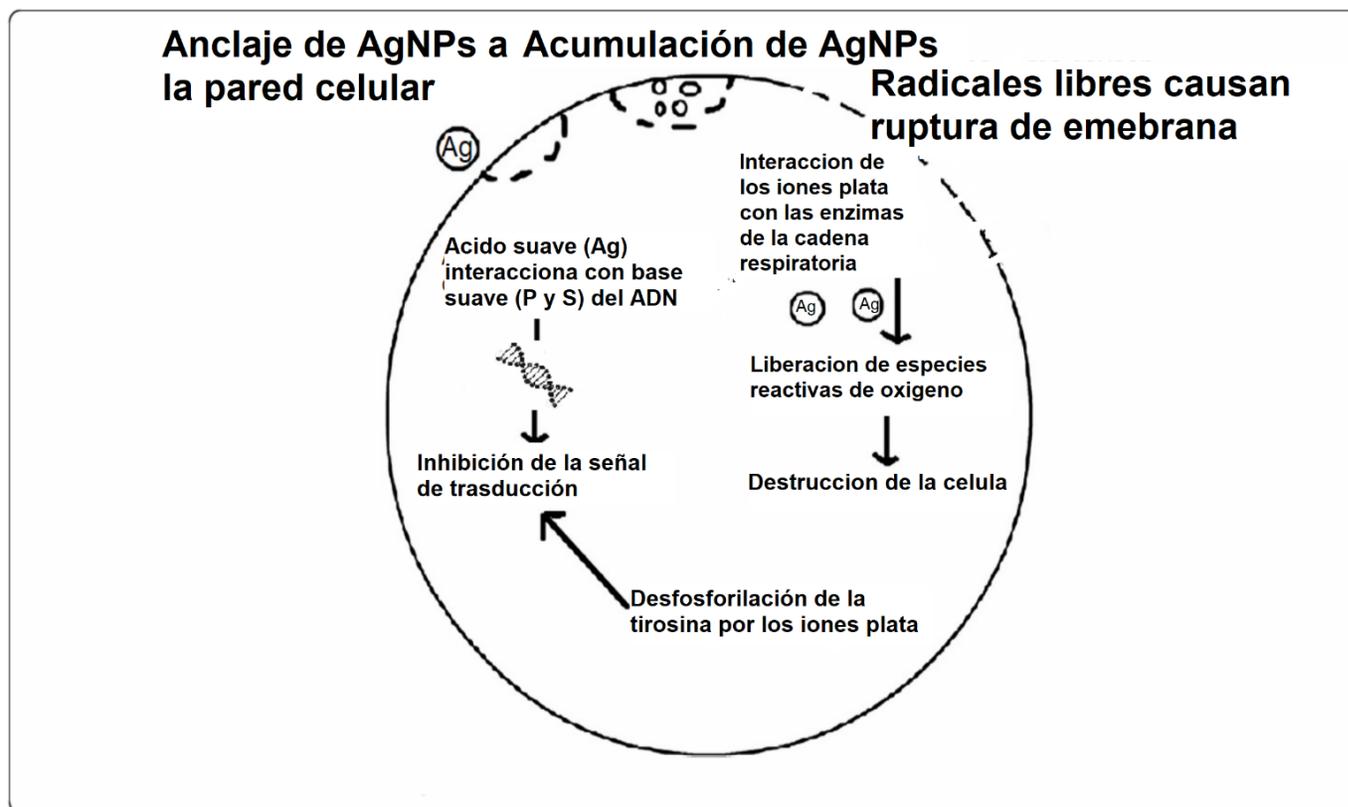


Figura 1. Mecanismo de acción de las AgNPs (37).

### ***II.1.3 Síntesis de Nanopartículas de plata.***

Generalmente, los métodos utilizados para la preparación de nanopartículas metálicas pueden agruparse en dos categorías diferentes: Top-down (arriba-abajo) o Bottom-up (abajo-arriba). A manera de ejemplo al romper una pared en sus componentes “los ladrillos”, representa el enfoque de arriba hacia abajo. Mientras que la construcción de “un ladrillo” del suelo arcilloso, la arena, cal y agua representarían el enfoque abajo-arriba. Por lo tanto, en nanociencias top-down implica el uso de materiales en bulto y reducirlos en nanopartículas mediante procesos físicos, químicos o mecánicos mientras que Bottom-up requiere partir de moléculas o átomos para obtener nanopartículas. En el presente trabajo se hará uso de métodos bottom-up para obtener las AgNPs Ag (21, 22).

La producción bottom-up de nanomateriales se divide en las siguientes categorías: fase gaseosa, fase líquida, fase sólida y métodos biológicos. La deposición química en fase vapor y la deposición de la capa atómica pertenecen a los métodos en fase gaseosa, mientras que la reducción de sales metálicas, los procesos sol-gel, la síntesis templada y la electrodeposición, corresponden a los métodos en fase líquida. Para los fines del presente trabajo se usarán métodos en fase líquida y dentro de estos, se utilizará reducción de sales metálicas. De los métodos de síntesis fase líquida disponibles nos concentraremos en dos: Reducción química y Hot injection (inyección en caliente) (21, 22).

**II.1.3.1 Reducción química:** La reducción química se centra en reacciones de óxido-reducción, donde el correspondiente catión metálico representa una reacción directa para obtener nanopartículas metálicas. La clave se basa en seleccionar los parámetros adecuados que permitan controlar el resultado de la síntesis, por lo que se requiere un buen entendimiento del mecanismo (21).

Generalmente, estas reacciones se llevan a cabo en disolución y el producto tiene características coloidales. Por esta razón, un término común utilizado para el fenómeno es la coprecipitación, que implica varias etapas denominadas: Reducción, nucleación, crecimiento, engrosamiento y/o aglomeración. El modo en que se desarrollan estos procesos es el mecanismo de la síntesis (21).

Como en cualquier reacción redox, los valores de los potenciales de reducción estándar ( $E_0$ ) determinan los pares de reactantes requeridos para la conversión a productos. Esto significa que el cambio de energía libre en la reacción,  $\Delta G_0$ , debe ser negativo, o lo que es equivalente  $\Delta E_0 > 0$ . Así, en el caso de la plata, el potencial de reducción electropositivo relativamente grande de  $Ag^+ \rightarrow Ag^0$  en el agua ( $E_0 = +0.799$  V, ) permite el uso de varios agentes reductores, por ejemplo, citrato de sodio ( $E_0 = -0.180$  V, ), borohidruro de sodio ( $E_0 = -0.481$  V ), hidrazina ( $E_0 = -0.230$  V, ) e hidroquinona ( $E_0 = -0,699$  V, ) (3, 21, 38).

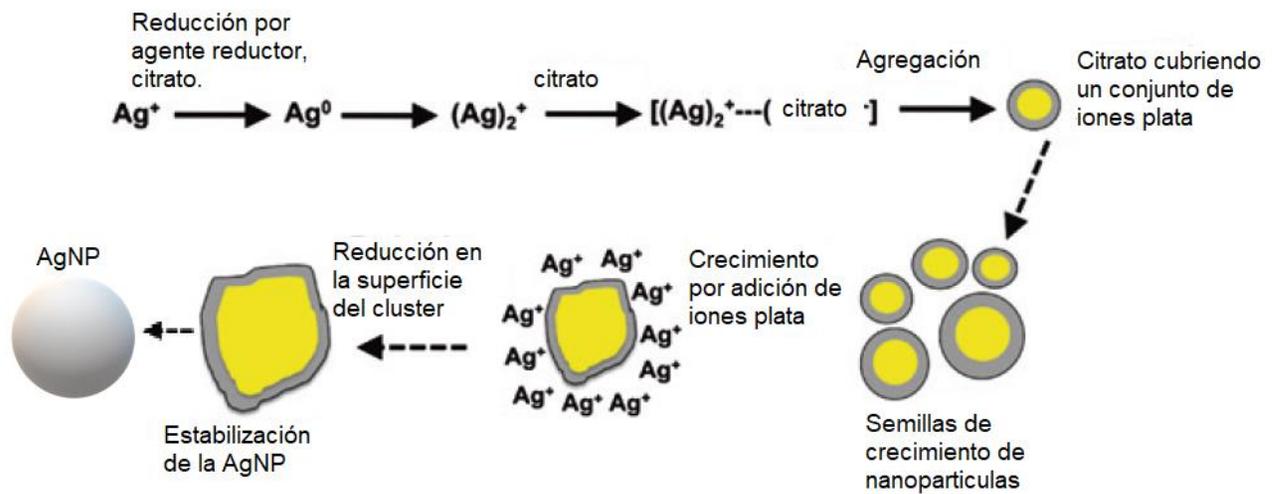


Figura 2. Reducción y crecimiento de AgNPs de acuerdo con la teoría más aceptada (21, 39).

**II.1.3.2 Hot injection (inyección caliente):** En 1993, Bawendi y sus colegas informaron un método general para la síntesis de nanocristales de calcogenuro de cadmio, más tarde se denominaría el método de "inyección en caliente", que permitió la preparación de nanocristales de CdSe con uniformidad de tamaño moderado (desviación estándar relativa de la distribución de tamaños  $r_{\sigma} \sim 10\%$ ), donde el tamaño medio fue controlable de 2 a 12 nm. Más tarde, este método de inyección en caliente se extendió a la síntesis de nanocristales de varios materiales. Hoy en día, muchos protocolos similares de síntesis están disponibles para la preparación de nanocristales uniformes de diversos materiales inorgánicos, incluyendo semiconductores, metales y óxidos metálicos (40, 41).

El método para preparar nanocristales vía "hot injection", implicó la inyección de una solución "fría" (temperatura ambiente) de moléculas precursoras en un líquido caliente óxido de trioctilfosfina (TOPO a 300 °C) siendo el TOPO un disolvente polar de menor fuerza que el agua. La inyección conduce a la formación instantánea de núcleos metálicos del elemento precursor. Debido a una caída de la temperatura a aproximadamente 170°C, se evita la formación de nuevos núcleos. El resultado es una suspensión de núcleos razonablemente monodispersos junto con cantidades considerables de precursores disueltos. Aumentar la temperatura a valores más altos, pero por debajo de 300 ° C, conduce a un crecimiento lento de los núcleos existentes, pero no a una nueva

nucleación. El tamaño de los nanocristales aumenta conforme se incrementa la temperatura de crecimiento (41).

Las moléculas de TOPO omnipresentes (el disolvente) ralentizan considerablemente el crecimiento coordinando en la superficie de los núcleos formados, creando una barrera estérica para los reactivos. El crecimiento lento a temperaturas relativamente altas permite formar nanocristales con menos defectos y que son idénticos a la red formada en el sistema de reacción. Después de la síntesis, los nanocristales se pueden separar a partir de la solución de crecimiento añadiendo disolvente con poca afinidad a los nanocristales, y posteriormente redisolverse en un disolvente orgánico adecuado para formar suspensiones coloidales estables. Las moléculas TOPO permanecen unidos a los átomos superficiales de los nanocristales y las suspensiones son estables estéricamente (41).

Para la síntesis que se realizó en el presente trabajo, se sustituyó al TOPO por extracto de *M. geometrizans* disuelto en agua desionizada (disolvente caliente) a una temperatura 80-90 °C, el cual sirvió como reductor de la plata, la solución fría que se inyectó fue un 1 ml de AgNO<sub>3</sub> 0.1 M. Esta modificación del método de inyección caliente permite generar AgNPs con una relativa homogeneidad en tamaño y con un diámetro que va de los 5 nm – 25 nm.

## ***II.2. Extracto de vegetales***

### ***II.2.1. Productos naturales y medicina tradicional.***

A los compuestos provenientes de fuentes vegetales también se les llama productos naturales. Su importancia se debe a que existe una gran variedad de compuestos químicos con muchas aplicaciones dentro de los campos de la biología, medicina e industria. Una ventaja de todos los productos naturales es que todos estos compuestos

químicos son biodegradables, aunque a simple vista sean muy diferentes estructuralmente.

**Productos naturales:** Un producto natural es todo compuesto de origen orgánico o inorgánico, que se encuentre en la naturaleza y que pueda ser procesado y utilizado por el hombre. Generalmente, en el área de química orgánica, se la consideran como productos naturales a los compuestos provenientes principalmente de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos, los cuales llevan a cabo dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. El metabolismo primario es aquél en el cual los organismos sintetizan y convierten sustancias para sobrevivir a partir de compuestos simples como el CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> y algunos metales, estos son transformados en polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales son considerados los bloques fundamentales de la materia viva. Este tipo de metabolismo lo llevan a cabo todos los organismos vivos. Otro proceso que generalmente se presenta en las plantas, dando diferentes productos de acuerdo con el tipo de especie, es el llamado metabolismo secundario. Los productos formados por este metabolismo son los que principalmente se conocen como productos naturales y como ejemplos se pueden mencionar a los terpenos, los alcaloides y los pigmentos. Aunque estos metabolitos en principio no son esenciales para la existencia del organismo, juegan un rol importante en la adaptación, supervivencia o prevalencia de unas especies sobre otras, ya que se piensa que tienen funciones de defensa, como atractivos sexuales, marcadores territoriales, insecticida o crio-protectores etc. (42, 43).

Una de las primeras formas culturales a través de la cual el hombre ha hecho uso de los productos naturales es la medicina. La medicina de distintas culturas ha hecho uso de plantas desde los inicios de los registros históricos hasta nuestros días. Con el avance del conocimiento médico el uso de las plantas en occidente ha disminuido, pero aún se siguen estudiando los productos naturales como forma de descubrir nuevos principios activos para la farmacología. Sin embargo, el uso directo de plantas para tratar padecimientos aun continua dentro de la llamada medicina tradicional. El uso de la *Medicina Tradicional* es ancestral y data desde que el hombre descubrió que podía emplear los recursos que le rodeaban para curar sus enfermedades y dolencias. Dicha información ha sido transmitida en forma oral o en códices y otros escritos. Por esta

razón, se conoce que las plantas contienen principios activos de acción terapéutica, que pueden emplearse para tratar los trastornos patológicos y contribuir a la conservación de la salud (44-46).

Las plantas se presentan como una fuente importante de productos naturales con actividad biológica y se consideran una vía prometedora para el descubrimiento de nuevos fármacos debido al fácil acceso y coste relativamente bajo (44, 46, 47). El desarrollo de las hierbas medicinales con eficacia probada y seguridad, brinda nuevas opciones terapéuticas (46).

Desde sus inicios las comunidades primitivas como los egipcios, griegos y romanos en su necesidad de curar sus dolores, padecimientos y enfermedades, tuvieron en las plantas medicinales la herramienta adecuada para cuidar su salud y tener una mejor calidad de vida, conocimiento que después se vio incrementado de manera clave por la contribución del Lejano Oriente y por la tradición herbolaria del Nuevo Mundo, y como parte importante la medicina tradicional de México y sus múltiples especies vegetales (48-50).

Dependiendo de la planta y del tratamiento, toda la especie vegetal o parte de ella es utilizada para el remedio. En medicina tradicional, pueden utilizarse hierbas frescas, en forma de infusión, o se pueden secar, cortar y pulverizar para su uso (51).

Tabla 1. Algunos de los tés más usados y sus propiedades medicinales (44, 51-53).

<b>Te (especie vegetal)</b>	<b>Propiedades atribuidas</b>
Anís ( <i>Pimpinella anisum</i> )	Evita trastornos digestivos, cólicos y gases estomacales.
Canela ( <i>Cinnamomun zeylanicum</i> )	Actúa como un suave astringente, ayuda a las molestias de la diarrea.
Hierbabuena ( <i>Menta viridis</i> )	Refuerza el estómago, es útil en la preparación de comidas, calma cólicos estomacales, trastornos de la

---

	digestión, cáncer de estómago; elimina parásitos intestinales y el reumatismo.
Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> )	Favorece de buena manera el proceso digestivo, ligeramente laxante, diurético, antiparasitario y puede llegar a ser muy bueno para tratar el colesterol.
Limón ( <i>Citrus aurantifolium</i> )	Combate la hinchazón intestinal, favorece la digestión estomacal, descongestiona el hígado y es un desintoxicante natural.
Manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	Estimula el apetito, la secreción de jugo gástrico, favorece la digestión, combate los gases intestinales, facilita y favorece la menstruación, alivia la conjuntivitis. Actúa contra enfermedades nerviosas, fiebres, calambres, inflamaciones, reumatismo e insomnio.
Naranja ( <i>Citrus aurantium</i> )	Sirve como calmante de los nervios.
Verde ( <i>Camellia sinensis</i> )	Tiene gran cantidad de antioxidantes.

---

### **II.2.2. El cactus *Myrtillocactus geometrizans* o “garambullo”.**

*Myrtillocactus geometrizans* es un cactus con importantes fitoquímicos, es endémico de la zona centro de México, de clima árido y semiárido, Cuyo nombre común o regional es garambullo, nombre que se le da por sus frutos comestibles, los cuales son bayas de color rojo-purpura y en este trabajo se utilizó un extracto polar de su fruta para la síntesis verde de AgNPs. La estación de cosecha de los frutos es de junio a agosto, estos frutos son de forma globular con un diámetro medio de 2 cm y una capa delgada cubre la pulpa que contiene pequeñas semillas negras de 1 mm de diámetro. (54-56).



Figura 3. Fotografía de *Myrtillocactus geometrizans* y su fruto.

La chichipegénina, el peniocerol, la macdougalina, el estigmasterol y el ácido oleico son compuestos químicos (figura 4) que se han identificado en los extractos polares de las partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans* incluyendo los frutos (57-61). Las investigaciones sobre chichipegénina, peniocerol, macdougalina y estigmasterol describen propiedades antipiréticas, antidiabéticas, antioxidantes, apoptóticas (que inducen apoptosis en células de adenocarcinoma de colon y mama), propiedades antiinflamatorias, quimiopreventivas, antimutagénicas, hepatoprotectoras, gastroprotectoras, expectorantes, anticancerígenas e inmunomoduladoras (62-64). Otros compuestos importantes presentes en *M. geometrizans* son betalainas (figura 4), betacianinas y betaxantinas, las cuales poseen actividades antioxidantes, citotóxicas, antitumorales, inmunomoduladoras y antiinflamatorias (65). Los efectos biológicos beneficiosos de estos compuestos promueven el interés de ser utilizados en la síntesis

de nanopartículas de plata con aplicaciones biológicas, para que las AgNPs puedan tener sinergias en las cualidades de los compuestos químicos aquí descritos.

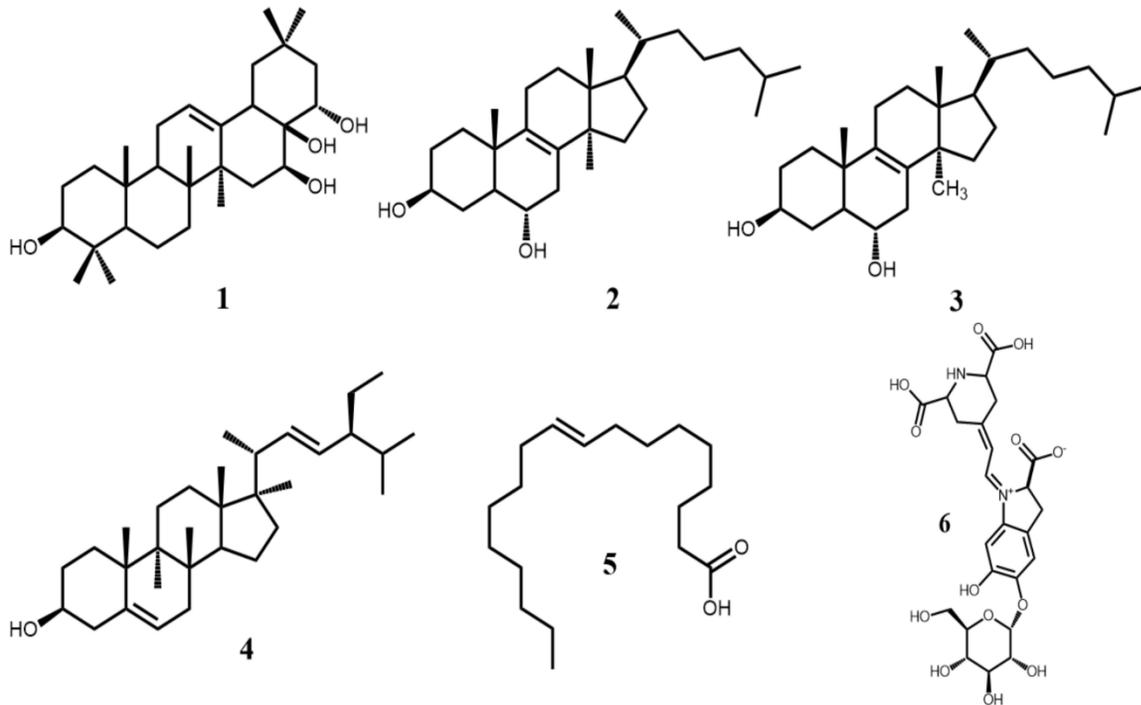


Figura 4. Estructuras químicas de chichipegenin (1), peniocerol (2), macdougallin (3), stigmasterol (4), ácido oleico (5) y betalainas (6). Todos los compuestos encontrados en *Myrtillocactus geometrizans* (62).

### II.2.3 Síntesis verde de nanopartículas

Las nanopartículas están preparadas desde diferentes perspectivas, a menudo algunos autores han utilizado el método químico para la síntesis de AgNPs; estas AgNPs tienen aplicación en los campos de electrónica, catálisis, fármacos y en aplicaciones biológicas, esto ha hecho que los métodos de síntesis sean más ecológicos (66, 67). La síntesis biológica (biogénica) de AgNPs involucra bacterias, hongos, levaduras, actinomicetos y extractos de plantas. Recientemente, una serie de partes de plantas como flores, hojas y frutos, además de enzimas, se han utilizado para la síntesis de nanopartículas de oro y plata. El tamaño, la morfología y la estabilidad de las nanopartículas dependen del método de preparación, la naturaleza del disolvente, la concentración de los precursores, la fuerza del agente reductor y la temperatura (66, 68, 69).

Las métricas ecológicas que son más relevantes para la síntesis de nanopartículas son el rendimiento, la huella ecológica y la toxicidad. Está claro que la toxicidad de los reactivos utilizados en cada síntesis debe considerarse cuidadosamente. Aunque se han definido métricas cuantitativas para la toxicidad, como el cociente ambiental, también se puede simplemente adoptar la estrategia de reducir o eliminar tantos materiales tóxicos como sea posible (13, 67, 70). Aunque también es importante integrar las consideraciones toxicológicas del producto final, en el contexto del uso del producto y en el presente trabajo se utilizó un método de síntesis donde un extracto vegetal de *Myrtillocactus geometrizans* funcionó como reductor y se requirió agua como disolvente.

En este trabajo se utilizó una modificación de la síntesis coloidal de nanopartículas de metales nobles, siendo el método más antiguo, que se remonta a la época de Faraday (13, 21). En esta síntesis acuosa se reducen las sales metálicas para formar nanopartículas metálicas, basándose en condiciones de dilución y estabilización de carga por especies iónicas adsorbidas para suprimir la agregación y producir así un coloide estable. Es posible controlar tanto el tamaño como la forma de esta clase de nanopartículas, modificando la concentración, naturaleza de los reductores y cantidad de las sales metálicas precursoras, aunque la escalabilidad es limitante (40, 71, 72).

Las mejoras modernas de los métodos coloidales recaen en sustituir al citrato de sodio con extractos vegetales (el tema de este trabajo) (20, 70, 73) y así modificar el agente reductor, eliminando el problema obvio de la toxicidad y utilizar un disolvente acuoso sin solventes orgánicos. En la tabla 2 se muestran ejemplos de organismos biológicos (plantas y algas) a partir de los cuales se han desarrollado ejemplos experimentales de síntesis verde, demostrando que es un campo que ya tiene desarrollo previo, pero aún sigue teniendo oportunidad para la innovación.

Tabla 2. Especies de plantas y algas usadas en la síntesis de AgNPs, tamaño y referencia.

<b>Organismo productor</b>	<b>Tamaño (nm)</b>	<b>Referencia</b>
----------------------------	--------------------	-------------------

<i>Ocimum tenuiflorum</i>	28	(74)
<i>Solanum trilobatum</i>	26.5	(74)
<i>Syzygium cumini</i>	65	(74)
<i>Centella asiatica</i>	22.3	(74)
<i>Citrus sinensis</i>	28.4	(74)
<i>Justicia glauca</i>	10–20	(75)
<i>Hemidesmus indicus</i>	25.24	(76)
<i>Banana peel extract (BPE)</i>	23.7	(77)
<i>Potentilla fulgens</i>	10–15	(78)
<i>Abutilon indicum</i>	5–25	(79)
<i>Pistacia atlantica</i>	27	(80)
<i>Ziziphus jujuba</i>	20–30	(81)
<i>Embllica officinalis</i>	15	(82)
<i>Prosopis farcta</i>	10.8	(83)
<i>Indoneesiella echioides</i>	29	(84)
<i>Rauvolfia serpentina</i>	7–10	(85)
<i>Achillea biebersteinii</i>	12	(86)
<i>Descurainia sophia</i>	1–35	(87)
<i>Artemia salina</i>	2–50	(88)
<i>Pithophora oedogonia</i>	34.05	(89)
<i>Botryococcus braunii</i>	15.67	(90)
<i>Coelastrum sp.</i>	19.28	(90)
<i>Spirulina sp.</i>	13.85	(90)
<i>Limnothix sp.</i>	25.65	(90)
<i>Caulerpa racemosa</i>	25	(91)
<i>Spirulina platensis</i>	11.5	(92)
<i>Nostoc sp.</i>	20.3	(92)

#### **II.2.4 Trypanosoma cruzi y enfermedad de Chagas.**

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastea (figura 5), que atraviesa por un ciclo de vida complejo, los epimastigotes son las formas proliferativas que viven dentro del insecto vector de infección y posteriormente se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, que pueden infectar a los huéspedes

mamíferos, el ciclo de vida en el huésped mamífero incluye tripomastigotes sanguíneos y amastigotes intracelulares. Las parasitemias (presencia de parásitos en el torrente sanguíneo) elevadas en individuos con infección aguda duran de 3 a 5 meses. Los casos de infección por la picadura de un vector (insectos triatominos) pueden generar una condición denominada enfermedad de Chagas, esta es un complejo de manifestaciones clínicas que pueden resultar de infecciones por *T. cruzi*. La fase aguda de la infección en bebés y niños suele ser asintomático y cede espontáneamente. En estos pacientes falta inmunidad celular al antígeno del parásito. Por el contrario, las infecciones agudas sintomáticas por *T. cruzi* (fiebre, agrandamiento del bazo y de los ganglios linfáticos, miocarditis e insuficiencia cardíaca) se observan en una minoría de individuos, en los que pueden desencadenarse reacciones cutáneas de tipo retardado intensas contra el antígeno del parásito. Por tanto, la morbilidad y la mortalidad de la enfermedad de Chagas no parecen estar relacionadas con la presencia de formas de *T. cruzi* en la sangre y los tejidos de los mamíferos hospederos. En cambio, el daño tisular severo que acompaña a la miocarditis crónica de la enfermedad parece estar asociado con hipersensibilidad de tipo retardado y crónica a la presencia de *T. cruzi* (93-95)

*Trypanosoma cruzi* al igual que los otros miembros de la familia Trypanosomatidae, tienen estructuras altamente conservadas que son responsables de la estructura esquelética y de nutrición, siendo clave para este trabajo, las estructuras de nutrición del *T. cruzi* (93, 94).

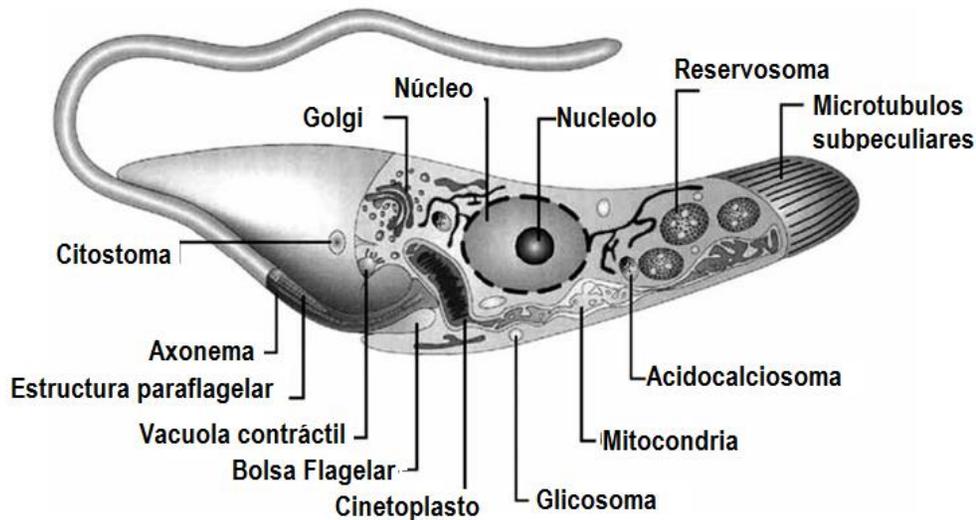


Figura 5. Ilustración que muestra estructuras y orgánulos encontrados en la forma epimastigote de *T. cruzi*, basada en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (96).

*Trypanosoma cruzi* posee una sola estructura citoesquelética: una matriz microtubular que involucra el cuerpo de la célula protozoaria y constituye un esqueleto de membrana. Este citoesqueleto está presente a lo largo de todo el ciclo celular y debe ser responsable de las diferentes formas que asumen estos protozoos durante su ciclo celular (94).

Los mecanismos de nutrición de los amastigotes y tripomastigotes son poco conocidos. Los epimastigotes absorben sus nutrientes endocitosando ávidamente macromoléculas del medio extracelular, estas células polarizadas con un flagelo anterior. Al siguiente paso una serie muy organizada de microtúbulos estables poco espaciados debajo de la membrana del cuerpo celular altera la endocitosis y la exocitosis excepto a través del bolsillo flagelar y el citostoma (figura 6). La membrana del bolsillo flagelar es un dominio altamente diferenciado que se ha señalado como el sitio principal de secreción, localización de receptores y endocitosis en varios tripanosomátidos. El citostoma se abre cerca de la bolsa flagelar e invagina profundamente formando la citofaringe, que se acompaña de cuatro microtúbulos. Se observaron vesículas endocíticas, esas vesículas se originan a partir de fosas no recubiertas, aunque se puede sugerir la mediación del receptor, fungen como transportadores al siguiente paso son los reservosomas se

describieron como orgánulos de almacenamiento típicamente localizados en el extremo posterior de los parásitos. Posteriormente se caracterizaron como endosomas tardías, ricos en cruzipaina y con un pH nominal de alrededor de 6. Estudios posteriores también demostraron que los reservosomas contienen hidrolasas. La ruta intracelular de macromoléculas endocitadas entre el sitio de entrada, en la porción anterior de la célula, y el almacenamiento en reservosomas, en la región posterior del parásito, es poco conocida y aún sigue siendo estudiada (93, 97-99).

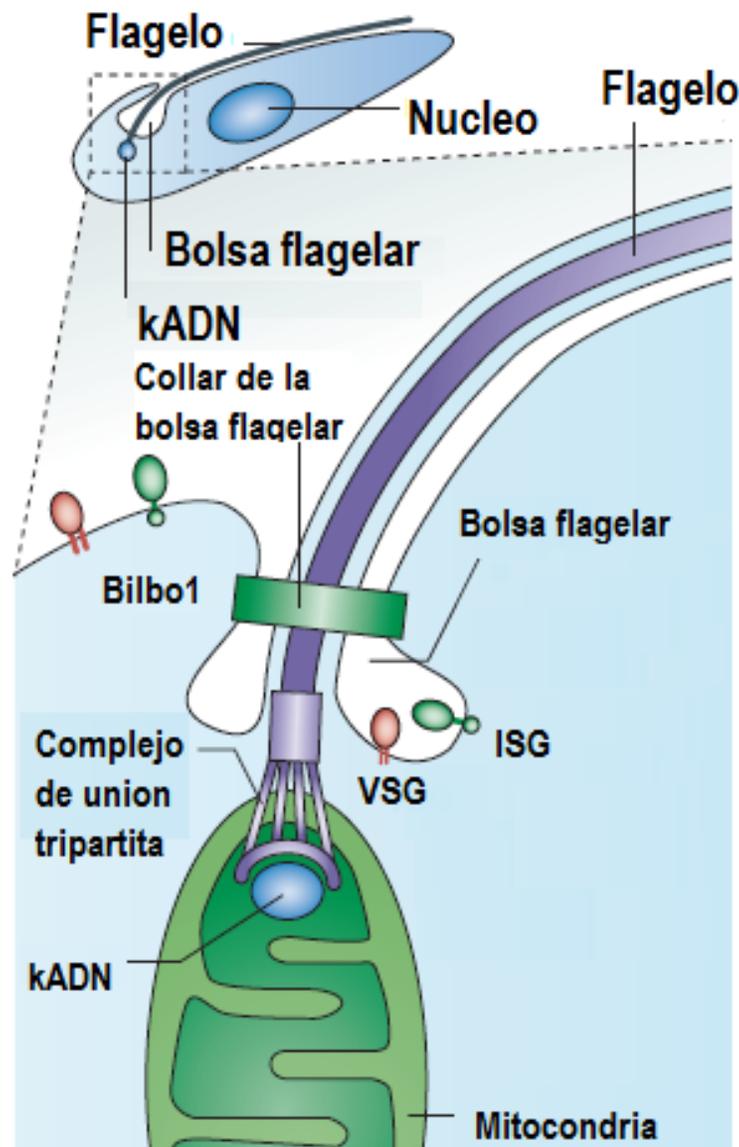


Figura 6. Estructura general de la bolsa flagelar ( flagellar pocket FP) (100).

### **II.2.4.1 Enfermedad de Chagas.**

La Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis, cuyo agente causal es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, fue descubierta en Brasil por el Dr. Carlos Chagas en 1908. Se transmite a los seres humanos y diversos mamíferos domésticos y silvestres por un vector biológico, insectos naturalmente infectados pertenecientes a la Familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, conocidos en México como chinche besucona, de compostela, asesina, picuda, turicata, talaje, pic (en lengua maya), chinche de Chagas, voladora, trompuda y papalota, entre otros (24, 101).

La transmisión por la vía vectorial ocurre en el 90% de los casos, esta sucede cuando el parásito ingresa al organismo por la zona de la lesión provocada por la mordedura del insecto posterior a su alimentación, o alguna otra lesión de la piel o mucosas, momento en el cual pueden defecar por la compresión de sus intestinos producida por la ingesta de la sangre succionada. Las heces necesariamente deben estar contaminadas con el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y al ocurrir ambas acciones casi simultáneas, las heces pueden ser depositadas en la zona cercana a la lesión y las personas al rascarse, pueden arrastrar las heces y favorecer el ingreso del parásito al cuerpo de la persona picada, sin embargo los mecanismos de la respuesta inmune innata y adquirida del organismo puede destruir los parásitos, por lo que el proceso de infección/enfermedad es resultado de una diversidad de factores asociados con el parásito (cantidad inoculada, genotipo del parásito, etc.) y de la respuesta y características genéticas e inmunitarias del individuo (24, 101).

El ciclo biológico de *T. cruzi* involucra al humano, el insecto vector y un gran número de reservorios mamíferos naturalmente infectados. Se reconoce el ciclo silvestre, como el escenario en el cual el parásito circula entre especies silvestres de mamíferos grandes, medianos y pequeños e insectos vectores infectados. El ciclo doméstico en el que participan el hombre, mamíferos domésticos e insectos vectores infectados dentro de la vivienda y el ciclo peridoméstico, que es considerado el eslabón entre los dos ciclos

anteriores en la transmisión de *T. cruzi*, se encuentran involucrados diferentes especies de mamíferos silvestres, domésticos y especies vectores endémicos del hábitat (24, 101).

Otras vías de transmisión no vectoriales, pero de importancia epidemiológica, son la transfusión de sangre o sus componentes, trasplantes de órganos y otros tejidos; verticalmente ocurre la transmisión del parásito de la madre al recién nacido (connatal). Algunos países de Sudamérica han notificado brotes importantes de la Enfermedad de Chagas por ingestión de alimentos contaminados por deyecciones del vector o el consumo accidental de triatominos, la ingesta de la carne mal cocida de animales silvestres infectados, consumo de sangre con fines terapéuticos de animales infectados “usos ancestrales”(101).

Cuando ocurre la infección por el parásito (figura 7), el curso de la enfermedad en el ser humano evoluciona en dos fases. La fase aguda se caracteriza por la aparición de un conjunto de manifestaciones de intensidad variable y un periodo de incubación generalmente de 4 a 15 días, en función de la vía de inoculación y la carga del parasitaria. Tradicionalmente, el cuadro agudo se asocia con un nódulo subcutáneo en el sitio de la picadura (chagoma de inoculación), que típicamente se ha reconocido como una señal de entrada del parásito, acompañado de adenitis regional, edema ocular con adenopatías satélites (Signo de Romana); -eventualmente hepatomegalia y esplenomegalia, miocarditis y meningoencefalitis-; hasta cuadros oligosintomáticos o inaparentes, El personal médico y paramédico deberá sospechar de casos de enfermedad Chagas por asociación epidemiológica, debido a la presencia del vector en la zona de residencia o procedencia (101).

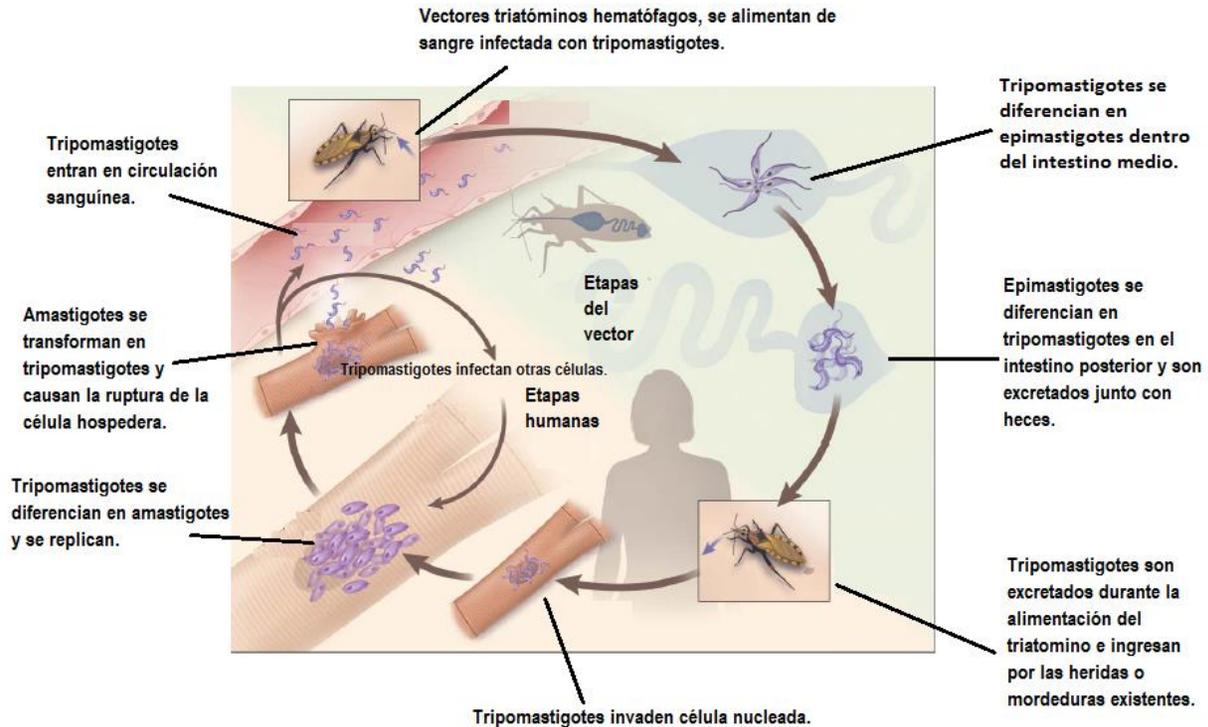


Figura 7. Etapas de infección del *T. cruzi*, tanto en el vector como en el humano (25).

Por otra parte, la fase crónica corresponde a la forma clínica de mayor prevalencia de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica, de las que se consideran forma crónica asintomática (sin patología demostrada) y crónica sintomática. Típicamente reconocido como cardiopatía chagásica crónica, cuya fase se ha reconocido que depende de la persistencia parasitaria y la respuesta del sistema inmunológico y en algunos casos afectación digestiva (megacolon y megaesófago) (101).

*Enfermedad de Chagas en México:* El Programa de Acción Específico para la Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas en México entró en vigor en el año 2012 México, ha alineado las estrategias del programa basado en las resoluciones de la OPS/OMS CD49.R19 y CD55.R9 (OMS 2009 y 2016) para la eliminación de las enfermedades desatendidas, que brindan también el marco de referencia para eliminar la Enfermedad de Chagas como problema de salud pública basados en dos pilares: la interrupción de la

transmisión vectorial y transfusional, y la atención a los pacientes para reducir la transmisibilidad (24, 95).

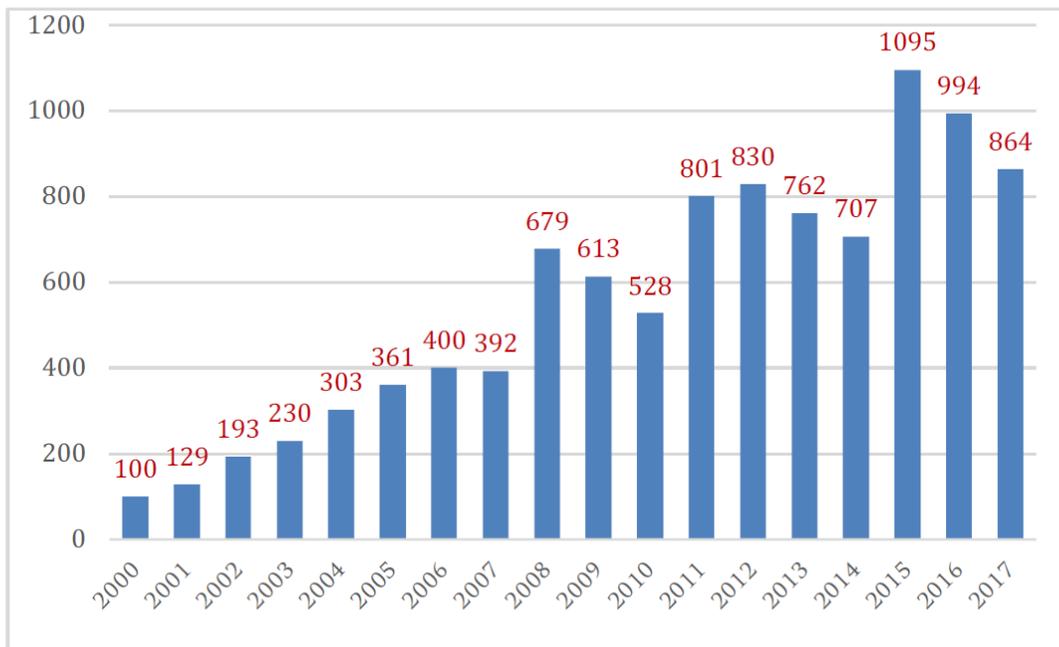
En lo que respecta a la estrategia de interrupción de la transmisión vectorial, se contempla el control de la domiciliación del vector, principalmente a través del rociado de viviendas con insecticidas residuales, el mejoramiento de la estructura e higiene en las mismas, así como el uso de malla en puertas y ventanas para evitar el ingreso y la colonización de insectos; así como el uso de pabellones en camas para evitar el contacto vector-hombre (24, 95).

En vías de la consolidación del Programa (eliminación de las enfermedades desatendidas), han sido impulsados los lineamientos para el diagnóstico confirmatorio de la infección con el parásito *T. cruzi* y de manera paralela la regulación de la obligatoriedad de la cobertura universal para el tamizaje a donadores de sangre, en coordinación con el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS). Por otro lado, a partir de la semana epidemiológica 1-2017, se cuenta con epi-claves para la notificación de cada una de las formas clínicas de la Enfermedad de Chagas (casos agudos y crónicos) (95).

La Enfermedad de Chagas está considerada endémica en 21 países del Continente Americano, con importancia epidemiológica relevante desde el Sur de EUA, México, Centroamérica y el Caribe, hasta países del Cono Sur; donde se estima que afecta de 7 a 8 millones de personas. Actualmente la Enfermedad de Chagas es considerada como una patología emergente en países no endémicos de otros continentes asociada principalmente con movimientos de personas provenientes de zonas o países endémicos, casos importados y asociados con la transfusión de sangre y/o sus derivados (OMS, 2017) (95).

En México, a partir del año 2000, se observa un incremento en la notificación de casos (Figura 8). En el período que va del año 2000 al 2017 se registraron 9,981 casos de Enfermedad de Chagas (agudos y crónicos); mientras que en 2017 el reporte del cierre

informa de 126 casos agudos y 738 casos crónicos que fueron notificados a través del Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología. De manera general, el grupo y género más afectado comprende de 25 a 44 años, mayoritariamente a varones. Los estados con mayor número de casos reportados fueron Veracruz (17.8 %), Yucatán (10.3 %), Oaxaca (10.5 %), Morelos (9.2 %), Chiapas (8.1 %), Jalisco (5.9 %), Estado de México (5.2 %).

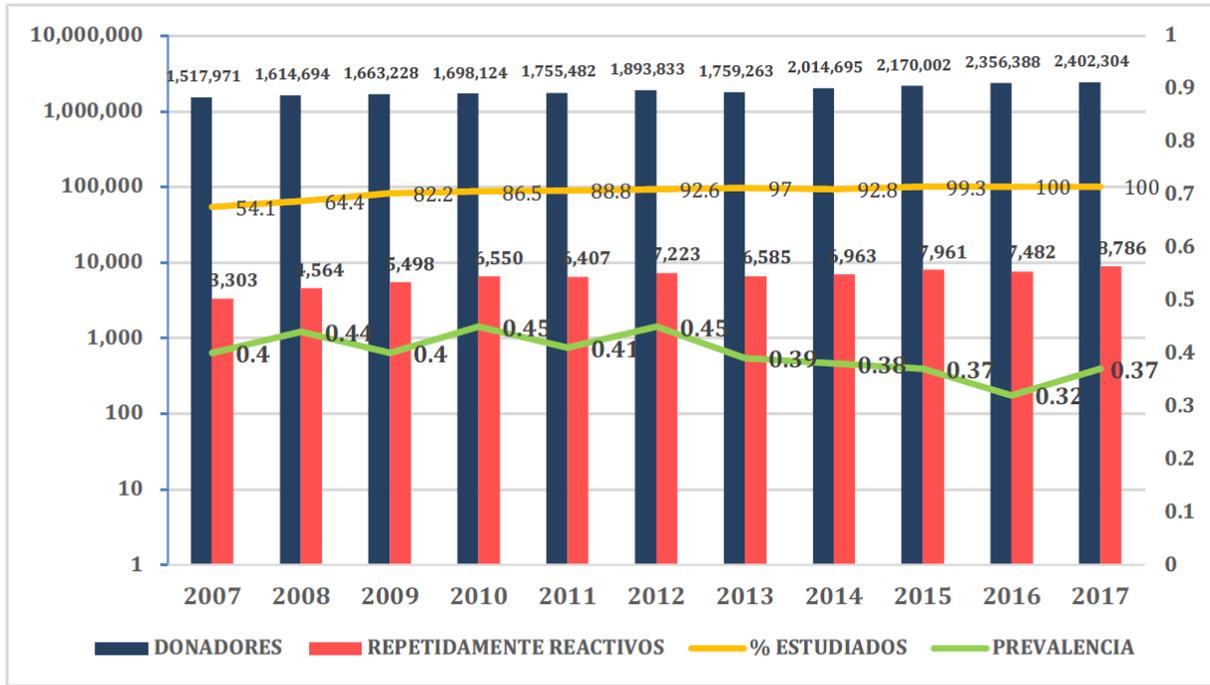


Fuente: Dirección General de Epidemiología, SSA. Anuarios estadísticos 2000 - 2017.

Figura 8. Perfil epidemiológica de Enfermedad de Chagas en México, 2000-2017 (95).

En México se realiza el tamizaje de la prueba de Chagas (figura 9) a todos los donadores de sangre como lo dispone la NOM-253-SSA1-2012“. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos”; si la prueba es reactiva, se da destino final a la sangre y sus componentes. Se procede a repetir la prueba por duplicado, si el resultado es reactivo, se toma al donante una segunda muestra y se realizan pruebas suplementarias de acuerdo con las indicaciones de la norma. En caso de dos pruebas reactivas con diferente principio antigénico, el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea (CETS) o banco de sangre notificará al área de epidemiología del hospital, jurisdicción sanitaria y nivel estatal (áreas de epidemiología y vectores) para el estudio y seguimiento

del caso correspondiente. Todo resultado diagnóstico (positivo o negativo a *T. cruzi*) se reporta al donante.



Fuente: Informes mensuales de ingresos y egresos de los bancos de sangre/CNTS.

Figura 9. Estudio y seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* 2007-2017 (95).

La enfermedad de Chagas en México presenta un reto para la salud pública, debido a la naturaleza crónica de sus peores efectos (miocarditis o meningoencefalitis), la dificultad de identificación de casos crónicos (tamizaje en donación de sangre) y sobre todo el aumento de presencia de los insectos vectores en estados donde antes no eran endémicos, lo anterior obliga a México a no dejar de lado el estudio del *Trypanosoma cruzi* y el desarrollo de nuevos tratamiento en prevención de una futura crisis de salud, principalmente en una población de varones adultos (25-44 años ) por parte de le enfermedad de Chagas, esto debe ser considerado ya que la salud de México es un área crítica para el gobierno de México.

### ***II.2.5 Técnicas utilizadas para el presente estudio.***

La farmacognosia se encarga del estudio de la composición de los efectos de los principios activos de las sustancias de origen vegetal y animal. Este se concentra en realizar ensayos para la caracterización y valoración de estas sustancias, así como determinar la farmacología y las principales aplicaciones que podría tener. Las plantas elaboran en su metabolismo una serie de sustancias llamadas metabolitos secundarios, a los cuales también se les podría denominar principios activos. Cada una de estas sustancias es la responsable de los efectos farmacológicos y por ello se les puede otorgar esta característica (51, 102, 103).

La investigación fitoquímica utiliza métodos de separación, fundamentalmente cromatográficos, y métodos de elucidación estructural, principalmente espectroscópicos como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o espectroscopia de infrarrojo (IR) (102-104)

Para identificar los componentes que podrían estar presentes en las especies vegetales, es necesario implementar técnicas cromatográficas y espectroscópicas para su determinación y realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para realizar los estudios necesarios y demostrar el efecto buscado. El tamizaje consiste en realizar una extracción de los metabolitos que se encuentran en el material vegetal, utilizando diferentes disolventes con polaridad creciente, generalmente comenzando con hexano, e ir aumentando la polaridad con cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol (51, 103-105). Este procedimiento ayuda a que la extracción con diferentes polaridades arrastre diferentes metabolitos secundarios y de esta forma poder purificarlos más fácilmente.

Existen varios métodos de separación e identificación de compuestos químicos. Entre los más usados para separar de compuestos se encuentran la sublimación, destilación, cromatografía y la cristalización fraccionada, el más utilizado es la cromatografía. Una vez separados los compuestos por alguna de estas técnicas, se recurre a métodos como espectroscopia y resonancia magnética nuclear para identificación de compuestos químicos (43, 51, 103).

### ***II.2.5.1 Cromatografía.***

Esta técnica se usa para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y determinar su proporción. Por este método las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas, y la separación tiene relación directa con la diferencia de solubilidad y polaridad que muestren las moléculas en cada fase. Las separaciones se obtienen al introducir una mezcla de compuestos orgánicos en una fase estacionaria, dejando luego que una fase móvil fluya a través de la muestra. Los diversos métodos cromatográficos varían respecto a la fase móvil (líquido o gas), la fase estacionaria (papel, gel o empaque sólido) y la fuerza que impulsa a la fase móvil (presión, gravedad o un campo eléctrico) (51, 103, 106, 107).

Existen diferentes métodos cromatográficos, uno de ellos es la cromatografía en papel que se aplica a productos polares como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y fenoles. En este método la separación se realiza sobre tiras de papel poroso, participando tanto fenómenos de partición como de adsorción. La cromatografía en capa fina se emplea para la separación de mezclas de toda clase de productos naturales y las condiciones de separación se eligen en función de las características de la mezcla a separar. Otro método es la cromatografía en columna que involucra la adsorción de un compuesto a una fase estacionaria y la elución con disolventes de diferente polaridad. También se emplea la cromatografía flash que tiene el mismo principio que la cromatografía en columna aplicando una presión en la parte superior, en función de aumentar el flujo de la fase móvil. La cromatografía de gases es un método que permite separar e identificar extractos que, por su complejidad o cantidad de extracto, no es posible separar con las técnicas cromatográficas previamente descritas. Estos métodos y otros similares sirven para identificar principios activos, drogas, metabolitos secundarios, tinturas, entre otros compuestos químicos (51, 103, 106, 107).

### ***II.2.5.2 Espectroscopía.***

La espectroscopía comprende un conjunto de técnicas que miden la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que

muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de onda de la energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectroscopia ultravioleta, visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectroscopia de resonancia magnética nuclear). La técnica de resonancia magnética nuclear se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética y cada núcleo de cada elemento en los compuestos químicos generan una vibración electromagnética única que permite identificar cada elemento y proporcionan información de su conectividad en cada compuesto químico. (103, 106, 107).

### ***II.2.6. Química teórica***

La química teórica es una rama relativamente nueva de la química, pero que ha presentado un avance y crecimiento rápido en los últimos 20 años debido al avance de los sistemas de cómputo ya sean de uso personal, académico o industrial (108).

La química teórica se basa en la química cuántica, la cual a su vez utiliza de principios de física clásica, física cuántica, estadística, teórica atómica y el modelo de átomo de hidrógeno de Bohr, uniendo todo lo anterior con ayuda de complejos modelos matemáticos los cuales permiten modelar y simular las condiciones, características y estados de los compuestos en su forma libre, en una reacción o en la interacción con seres vivos, esto supone una ventaja ya que los modelos permiten un mayor control de las observaciones y de los factores que estén interactuando (108).

Que se utilicen modelos matemáticos, no es sinónimo de que los resultados no sean observables experimentalmente, un modelo matemático puede ser muy exacto en sus resultados como consecuencia de su complejidad y del número de variables a tener en cuenta. Un mayor uso de variables en los modelos matemáticos acerca más a lo observable experimentalmente, sin embargo, también complica el modelo matemático y su resolución en tiempo y esfuerzo. Anteriormente los cálculos y resoluciones matemáticas necesarias para completar y resolver un modelo matemático se hacían a mano con apoyo de un gran número de colaboradores. Sin embargo ahora con el uso de

modernos computadores y software de cálculo matemático el tiempo y la necesidad de colaboradores se ha reducido; Ahora un número menor de investigadores pueden resolver modelos matemáticos más complejos en un menor tiempo, con lo cual se aumentan los resultados y las conclusiones obtenidos de estos experimentos (108).

Por las razones antes mencionadas el crecimiento de la química teórica y la química cuántica se ha intensificado a la par del desarrollo de ordenadores de mayor capacidad de procesamiento, más velocidad y con un costo menor en su adquisición. Esto representa una ventaja ya que se puede hacer un análisis teórico del experimento deseado (reacción química, interacción biológica, interacción con proteínas o receptores) y en base a los resultados arrojados por el modelo matemático tomar la decisión costo beneficio para llevar el trabajo a un nivel experimental de laboratorio (108).

#### ***II.2.6.1. Química Cuántica.***

A principios del siglo veinte, los físicos encontraron que la mecánica clásica no describe correctamente el comportamiento de partículas tan pequeñas como electrones y núcleos de átomos y moléculas. El comportamiento de estas partículas está regido por un conjunto de leyes denominado mecánica cuántica. La aplicación de la mecánica cuántica a los problemas de la química constituye la Química Cuántica. La influencia de la química cuántica se manifiesta en todas las ramas de la química (108).

Los Físicoquímicos utilizan la mecánica cuántica para calcular (con la ayuda de la mecánica cuántica y la estadística) propiedades termodinámicas (por ejemplo, la entropía, la capacidad calorífica) en los gases; para interpretar los espectros moleculares y calcular propiedades moleculares teóricamente, lo que permite la determinación experimental de estas propiedades moleculares (por ejemplo, longitudes de enlace y ángulos de enlace, momentos dipolares, diferencias de energía entre isómeros de conformación; para calcular propiedades de los estados de transición de las reacciones químicas, lo que permite estimar las constantes de velocidad; comprender las fuerzas intermoleculares; y para estudiar el enlace en los sólidos (108).

Los químicos orgánicos usan la mecánica cuántica para estimar la estabilidad relativa de las moléculas, calcular las propiedades de las especies intermedias de reacción, investigar los mecanismos de las reacciones químicas y analizar los espectros RMN (108).

Los químicos analíticos utilizan de forma habitual los métodos espectroscópicos. Las frecuencias y las intensidades de las líneas de un espectro sólo pueden entenderse e interpretarse adecuadamente, mediante el uso de la mecánica cuántica (108).

Los químicos inorgánicos usan la teoría del campo ligando, un método mecanocuántico, para predecir y explicar las propiedades de los iones complejos de los metales de transición (108).

En el campo de la bioquímica, el gran tamaño de las moléculas biológicamente importantes hace que los cálculos cuánticos de las mismas sean extremadamente difíciles. Sin embargo, los bioquímicos están empezando a sacar provecho de los estudios mecanocuánticos de conformaciones de moléculas biológicas de enlaces enzima-substrato y de solvatación de moléculas biológicas (108).

En la actualidad, varias compañías venden software de computador para realizar cálculos químico-cuánticos moleculares. Estos programas están diseñados para que puedan ser utilizados no sólo por los químicos cuánticos, sino por cualquier químico.

#### ***II.2.6.2. Acoplamiento teórico Ligando-Proteína.***

El acoplamiento ligando-proteína se ha convertido en una herramienta poderosa para el desarrollo de drogas. Es considerado uno de los métodos capaces de identificar modos de unión ligando-proteína o ligando-receptor con alta precisión. Esta precisión es esencial para calcular de manera fiable la energía libre de unión del ligando. Se necesitan dichos métodos cuando el modo de unión de los compuestos a estudiar no se puede determinar

experimentalmente, por cuestiones de costos, viabilidad o de tiempo, para esto es necesario la optimización del ligando basado en la estructura química que presente (109, 110).

Varias estructuras de proteínas son objetivos potenciales para la industria farmacéutica, y la importancia del diseño de fármacos basado en estructura ha aumentado tanto, durante los últimos años. Varios métodos computacionales basados en estas estructuras tienen como objetivo la racionalización de los experimentos, centrándose en compuestos más propensos a tener la actividad, biodisponibilidad y toxicidad deseada (109, 110).

En la actualidad, la técnica más común para hacer frente a este problema, se denomina selección de alto rendimiento virtual (por sus siglas en inglés VHTS), tiene la intención de clasificar varios miles de moléculas pequeñas (por lo general tomadas de una base de datos) de acuerdo con una serie de propiedades relacionadas con la fijación a una diana farmacéuticamente relevante. Complementario a VHTS se utiliza de manera virtual un diseño racional de fármacos (por sus siglas en inglés RDD) el cual sugiere modificaciones basadas en la estructura de un compuesto según su fijación a una diana biológica (109).

Una exploración exhaustiva del espacio de unión para el ligando y las posibles formas de unión no es factible debido a que el tamaño del espacio y el número de posibles uniones crecen exponencialmente conforme aumenta el número de grados de libertad del sistema. Dentro de los métodos que nos permiten simplificar el cálculo de formas de unión se encuentran técnicas denominadas: muestreo heurístico para generar modos de unión. Estas técnicas se clasifican en tres familias principales: a) Enfoque derivado de búsqueda sistemática, b) Técnicas de simulación de dinámica molecular y c) Métodos estocásticos (109).

a) Los métodos de búsqueda sistemática serían demasiado costosos para ser aplicados directamente, pero varios enfoques sistemáticos se combinan para mejorar la técnica, un ejemplo es el denominado reconstrucción incrementada del ligando. El principio general de este último es dividir al ligando en fragmentos rígidos y flexibles los cuales se acoplan

en la superficie de la proteína en la posición y sitio más conveniente, posteriormente el ligando se reconstruye sobre la posición seleccionada previamente (109).

b) Técnicas de simulación de mecánica molecular estándar (dinámica molecular y la reducción al mínimo) son atractivos debido a sus fundamentos físicos en que se basan, pero consumen tiempo y no son efectivas en cruzar las altas barreras de energía libre de moléculas biológicas, dentro de un tiempo de simulación relativamente corto. Sin embargo, la reducción de las fuerzas de Van Der Waals y las repulsiones electrostáticas son una manera excelente de seleccionar conformaciones o posiciones de ligando para el grupo de propuestas de unión debido a la reducción de barreras de energía en las conformaciones de transición (109).

c) Métodos estocásticos, son técnicas de optimización en general con una base física limitada, y son capaces de explorar el espacio de búsqueda para el ligando, ignorando las barreras de energía (109).

Una opción que retoma lo mejor de cada uno de las técnicas anteriores son los algoritmos evolutivos, que son procedimientos de optimización estocástica iterativos donde se genera una población inicial de soluciones y evaluados con respecto a un conjunto de restricciones, descritas por la función de aptitud (características buscadas como: nivel de energía, conformación, etc.) (109).

En el problema de acoplamiento, la función de aptitud describe las interacciones entre el ligando y el receptor. Esta optimización se realiza mediante la variación de los grados de libertad relacionados con el ligando y las posiciones del receptor, así como las orientaciones y conformaciones. Durante el ciclo evolutivo, peores soluciones son susceptibles de ser sustituidos por la nueva generación de respuestas (denominadas descendientes o hijos), creadas a partir de las primeras soluciones (denominadas padres) seleccionadas como las soluciones más aptas. Este proceso se repite hasta que se ha alcanzado una tendencia en la población, o después de un número fijo de generaciones.

Los algoritmos evolutivos requieren un equilibrio entre la diversificación y selección, controlando la distribución de soluciones en el espacio de búsqueda (109).

Una diversidad alta combinada con una tasa de renovación lenta de la población conduce a un algoritmo robusto y lento, más o menos similar a una búsqueda de tipo estocástica. Por el contrario, una baja diversidad con una solución rápida es probable que cause una tendencia prematura. Este sesgo de muestreo, puede ser controlado por los parámetros evolutivos (diversidad de factores o valores, tiempo de generación de poblaciones) es un aspecto muy potente de los algoritmos evolutivos, ya que se pueden sintonizar de acuerdo con la complejidad del problema a resolver (109).

Dos límites se pueden señalar; En primer lugar, este procedimiento no sigue estrictamente una estadística de Boltzmann, y por tanto no proporciona una visión directa sobre las propiedades termodinámicas de un sistema, tales como la energía libre de unión. En segundo lugar, los algoritmos evolutivos utilizan elementos estocásticos, y por lo tanto, la búsqueda de la solución óptima no está garantizada dentro de un período finito de tiempo. Por esa razón se requieren de enfoques híbridos más eficientes, en los que el conocimiento de un problema específico se utiliza para conducir la evolución (estocástico), son ampliamente utilizados para el inicio del acoplamiento (docking) (109).

La mayor parte de los métodos docking utilizan la búsqueda estocástica eficiente de los algoritmos evolutivos para cruzar las barreras de energía y obtener los mínimos, que posteriormente refinan mediante una búsqueda local de minimización de la energía. Con lo anterior se utiliza un enfoque híbrido en el acoplamiento, obteniéndose una respuesta con una mayor probabilidad de veracidad, la cual nos acerca más a la verdad (109, 110).

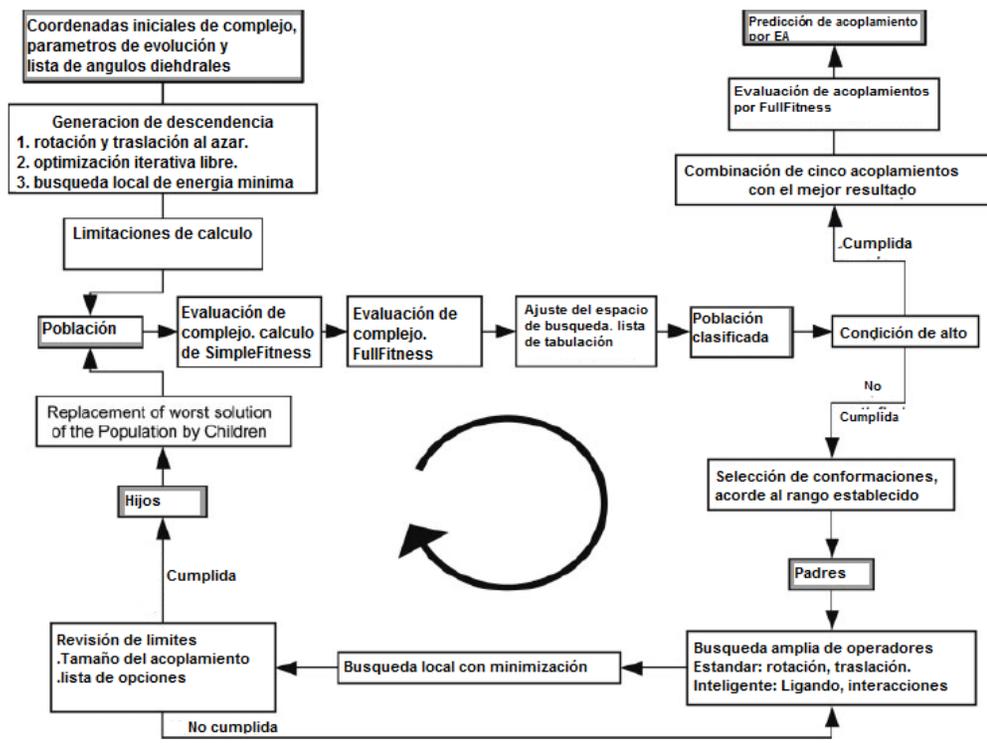


Figura 10 Cuadro de procedimiento de algoritmo de software EADock(109).

La Figura 10 representa el esquema del algoritmo usado por el software ocupado para realizar los cálculos en el presente trabajo, llamado EADock, que. En donde se utiliza un algoritmo evolutivo híbrido con dos funciones de aptitud, en combinación con una sofisticada gestión de la diversidad. EADock se interconecta con el paquete de software CHARMM para cálculos de energía y coordinar el manejo de las iteraciones. Los ejemplos que han sido usados para validación de la exactitud el software, están alrededor del 68% de los complejos. La tasa de éxito aumenta a 78 % cuando se consideran los cinco acoplamientos mejor clasificados, y el 92 % si se tienen en cuenta todos los grupos presentes en la última generación. La mayoría de las fallas podrían explicarse por la presencia de los contactos de cristal en la estructura experimental (109).

### **III. Objetivos.**

#### ***III.1. Objetivo general.***

Obtener nanopartículas de plata (AgNPs) por síntesis verde y probar su efecto biológico sobre el parásito *Trypanosoma cruzi* en pruebas “*in vitro*”.

#### ***III.2. Objetivos específicos.***

- Sintetizar nanopartículas semiesféricas de plata (AgNPs) con un tamaño promedio < 20 nm y forma definida (esférica) usando un método de síntesis verde.
- Caracterizar el extracto de *Myrtillocactus geometrizans* usado en la síntesis verde.
- Caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas, con técnicas como: microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectrofotometría UV-VIS.
- Determinar el efecto biológico de las nanopartículas de plata sobre el *Trypanosoma cruzi* (en las formas: epimastigotes), en concentraciones crecientes desde 0.1 µM.
- Proponer una explicación de efectos biológicos presentes en el *Trypanosoma cruzi* frente a las nanopartículas de plata.

### **IV. Material y Métodos**

#### ***IV. 1 Preparación del extracto***

La baya de cactus (*Myrtillocactus geometrizans*) fue recolectada en Alfajayucan (20 ° 24'35 " latitud norte, 99 ° 20'58 " longitud oeste) en el estado de Hidalgo, México. La fruta se seleccionó (Bayas de buena calidad: maduras, brillantes, coloridas, no contaminadas ni podridas), se limpió con agua y se molió para obtener una pasta de bayas. La pasta

resultante se remojó con etanol (V / V) para producir la extracción por maceración que duró un día. La mezcla se filtró y se añadió de nuevo etanol a la pasta restante. El proceso se llevó a cabo al menos tres veces para asegurar una extracción exhaustiva. Los extractos de etanol se recogieron y secaron usando un evaporador rotatorio a 70 °C bajo condiciones de presión reducida. Los extractos concentrados se secaron a masa constante mediante un baño de agua hirviendo donde se eliminó el etanol residual (57-59). El extracto seco final se solubilizó en agua.

#### ***IV.2 Obtención de síntesis de AgNPs.***

La metodología de síntesis de nanopartículas de plata con el extracto de *M. geometrizans* sigue la ruta de síntesis convencional por inyección en caliente (35-37). Se vertieron 5 ml de un extracto acuoso (2.2% masa / masa) en un matraz y se calentó a una temperatura de 80 °C. Posteriormente, se añadió 1 ml de una solución acuosa de AgNO<sub>3</sub> 0.1 M. El tiempo total de reacción fue de 30 min. La mezcla se denominó solución de reacción. Los residuos sólidos de la mezcla de reacción se separaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos y se conservó la solución coloidal transparente.

#### ***IV.3 Espectrometría UV-Vis.***

Los espectros UV-visible (UV-vis) se analizaron en una cubeta de cuarzo de calidad óptica con una longitud de trayectoria de 1 cm, requiriendo aproximadamente 1 ml de solución para llenar la cubeta. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente (25 °C) y el espectrógrafo UV-vis se registró utilizando una cubeta de cuarzo con agua desionizada como referencia. El extracto acuoso (*M. geometrizans*) y la referencia se analizaron mediante UV-Vis. Los espectros se recogieron de 200 a 800 nm. El equipo utilizado fue el espectrómetro Shimadzu UV-1800.

#### ***IV.4 Análisis de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC / MS) de extracto de *Myrtillocactus geometrizans*.***

Previo al análisis de HPLC, a cada una de las fracciones de cada extracto se les realizó este análisis fitoquímico de manera preliminar mediante cromatofolios comerciales de vidrio y aluminio recubiertos con gel de sílice 60 F254, como fase estacionaria, y como eluyentes se utilizaron hexano, acetato de etilo y etanol.

1. Se cortaron las placas según las medidas requeridas (4 cm x 5 cm ó 3 cm x 4 cm)
2. Sobre la placa se depositó una gota de los extractos fraccionados, con ayuda de un capilar, a una distancia de 0.5 cm del extremo inferior de la placa.
3. Cada placa se introdujo en un recipiente hermético, previamente acondicionado con la mezcla de disolvente seleccionado y se mantuvieron en la cámara hasta que se diluyera la muestra. Se retiró de la cámara y dejó secar el disolvente.
4. Se sometió a revelado con luz ultravioleta y yodo para determinar su posición relativa en el cromatofolio.

El análisis de HPLC se realizó en un dispositivo Thermo Scientific UltiMate 3000 con colector de fracciones, equipado con una columna Zorbax SB C18 (150 x 4.6 mm, 3 µm). Los parámetros de medición establecidos fueron: Caudal: 0.7 mL / min, Temperatura de la columna: 40 °C Muestra: 200 µg / µL (Metanol: Agua 3:7), Temperatura del auto muestreador: 30 °C, Volumen de inyección: 50 µL, detección: 280 nm, MeOH / H<sub>2</sub>O 9:1 Volumen / Volumen, fase móvil. El espectrómetro de masas fue un analizador cuadrupolo y trampa de iones lineal QTRAP 3200, ABSciex con fuente Turbo Spray. Inyección: Por infusión directa, flujo: 10 µL/min, tipo de escaneo: Q1 polaridad: positiva y negativa. Rango m / z: 100-1500.

#### ***IV.5. Caracterización por Microscopía electrónica de transmisión (TEM).***

Se obtuvieron micrografías electrónicas de transmisión de alta resolución en un microscopio JEM-ARM200F que operaba a un voltaje de trabajo de 200 kV. Las muestras

para observación por microscopía electrónica se prepararon a partir de una solución acuosa. Posteriormente, se depositaron 40  $\mu\text{L}$  de la solución sobre una película de Carbono soportada sobre una rejilla de cobre (Cu) y se dejó evaporar en condiciones ambientales. Todos los análisis de tamaño se realizaron con el software Gatan Microscopy Suite versión 2.01 (Gatan Inc. CA Estados Unidos).

#### ***IV.6 Obtención de modelo molecular para el análisis de química computacional.***

Se construyó el ligando mediante el uso de dos softwares de química:

- a) El primer software que se uso fue ChemBiooffice2010. Los pasos por seguir fueron:
1. Se construyó la molécula en dos dimensiones, usando las herramientas del software ChemBioDraw ultra 12.
  2. La molécula se pasó a tres dimensiones con el software Chem3D Pro 12.
  3. Se minimizo energía de molécula y optimizo parcialmente la geometría de la estructura mediante un cálculo de mecánica molecular (MM2) con ayuda del software Chem3D Pro 12.
  4. La nueva estructura y sus resultados fueron guardados en un archivo con extensión **.pdb**, esto con el fin de que se pueda manipular la información posteriormente.

b) Los segundos softwares usados fueron Gaussian 03W y GaussView 3.0

1. Haciendo uso del archivo **.pdb** anteriormente generado, la información se cambió al formato nativo del software Gaussian 03W.
2. Para la optimización de geometría de la molécula, se realizó un cálculo de tipo Hartree-Fock con la molécula en estado basal, y siendo la molécula neutra (sin carga eléctrica).
3. Terminado el cálculo, la estructura final de la molécula y la información, fueron salvados en un archivo con terminación. **mol2**, para facilitar su posterior manipulación.

#### ***IV.7. Cultivo de línea celular LL47 Ensayo de citotoxicidad celular.***

La línea celular de fibroblastos humanos LL47 se mantuvo en un medio F-12K (Modificación de Kaighn del medio F-12 de Ham) (ATCC® 30-2004) que contenía suero

bovino fetal (FBS) al 10%, 100 U / ml de penicilina, 100 µg / ml estreptomina en CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C. En este proceso, inicialmente se incubaron 20 000 células en placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 70 % en medio F-12K suplementado con FBS al 10 %; luego, las células se privaron de alimento durante 12 horas con FBS al 2 %. Posteriormente, las células se sometieron a una única exposición de nanopartículas de plata a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 10, 15 µg/µL) durante 72 horas. El grupo de control (CN) no recibió exposición a nanopartículas de plata.

#### ***IV.8. Ensayo de citotoxicidad celular en LL47.***

Se evaluó la citotoxicidad de las células LL47 y su viabilidad mediante estimación colorimétrica utilizando el ensayo de bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (formazán) (MTT, Thermo Fisher Scientific, M6494). La cantidad de formazán fue directamente proporcional al número de células viables. Después de la incubación con nanopartículas de plata durante 72 horas, las placas con células se lavaron con 1X PBS y luego se incubaron en medio fresco que contenía MTT (0.5 mg / ml) durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, se descartó el medio que contenía MTT y se añadió DMSO para disolver los agregados de formazán. La intensidad del producto se leyó a 570 nm usando un lector de microplacas ELISA. Las fotografías en campo claro con un aumento de 20X se adquirieron con una cámara de alta resolución conectada a un microscopio óptico. Todos los experimentos se realizaron con grupos de 6 repeticiones (n = 6).

#### ***IV.9. Cultivo de parásitos *Trypanosoma cruzi*.***

Las cepa CI-Brenner de *T. cruzi* Epimastigotes se mantuvieron en cultivo axénico y se propagaron en medio de infusión hepática con triptosa LIT, complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS [Gibco Laboratories, EE. UU.]), 1% de penicilina-estreptomina (Gibco Laboratories, EE. UU.) y 1% de hemina (5 mg/mL), en condiciones controladas (28 °C y 5 % de humedad).

Se utilizaron Epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas CI-Brenner y Esmeraldo (TcII) para infectar un cultivo monocapa de células Vero y se mantuvieron en medio suplementado con DMEM (suero bovino fetal al 2 % [FBS] y penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco). Laboratories, USA) en condiciones controladas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y humedad saturada). Después de una a semanas de infección, los parásitos comenzaron a romper las células, luego, se recolectaron tripomastigotes que nadaban libremente en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 2700 rpm durante siete minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un mL de medio DMEM nuevo, se contaron los tripomastigotes con hemocitómetro y se ajustó la dosis del parásito para las necesidades específicas del ensayo.

#### **IV.10 Ensayo de toxicidad in vitro de AgNPs para *T. cruzi*.**

Se cultivaron epimastigotes ( $1 \times 10^6$  / pocillo) en una placa de 96 pocillos (Sarstedt, EE. UU.) En medio LIT suplementado (FBS al 10 %, penicilina 10,000 unidades/mL y estreptomicina 10,000 µg/mL) y AgNP a 5, 10 y 12 µg/100 µl. El ensayo se realizó por triplicado con los siguientes controles: a) ST (epimastigotes no tratados) y b) nifurtimox (NFMX) (400 µg / 100 µL) (Lampit®, Bayer). Se preparó NFMX molido y diluido. Una tableta de la presentación comercial de NFMX (120 mg) se molió en un mortero estéril y se resuspendió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca superó el 0.3% en una solución V/V. Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones controladas (28 °C y 5 % de humedad). Después del tratamiento, se estimó la viabilidad de los parásitos y las células utilizando MTS (3-[4,5, dimetiltiazol-2-il] -5- [3- carboximetoxifenil] -2- [4-sulfofenil] -2H-tetrazolio sal) de CellTiter 96 kit® Aqueous One Solution (Promega, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad metabólica de parásitos y células sobre MTS se estimó mediante colorimetría a una longitud de onda de 490 nm. En este ensayo, cuanto más altos sean los valores de densidad óptica (DO), mayor será la viabilidad celular. Las AgNPs se prepararon a las concentraciones indicadas usando como vehículo primero agua inyectable y después solución de buffer de fosfatos.

#### **IV.11 Ensayo para evaluar efecto toxico de los vehículos, agua inyectable vs solución buffer de fosfatos (PBS siglas en inglés) sobre *T. cruzi*.**

Se cultivaron epimastigotes ( $1 \times 10^6$  / pocillo) en una placa de 96 pocillos (Sarstedt, EE. UU.) En medio LIT suplementado (FBS al 10 %, penicilina 10,000 unidades/mL y estreptomicina 10,000  $\mu\text{g/mL}$ ) y AgNP a 0.17, 0.30, 1.2, 1.7 y 2.5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  (dosis reducidas para acercarse a niveles de efecto biológico por propuestos por Ordzhonikidze C.G. *et al. en 2009* (111). El ensayo se realizó por triplicado con los siguientes controles: a) ST (epimastigotes no tratados) y b) nifurtimox (NFMX) (400  $\mu\text{g}$  / 100  $\mu\text{L}$ ) (Lampit®, Bayer). Se preparó NFMX molido y diluido. Una tableta de la presentación comercial de NFMX (120 mg) se molió en un mortero estéril y se resuspendió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca superó el 0.3% en una solución V/V. Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones controladas (28 °C y 5 % de humedad). Después del tratamiento, se estimó la viabilidad de los parásitos y las células utilizando MTS (3- [4,5, dimetiltiazol-2-il] -5- [3-carboximetoxifenil] -2- [4-sulfofenil] -2H-tetrazolio sal) de CellTiter 96 kit® Aqueous One Solution (Promega, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad metabólica de parásitos y células sobre MTS se estimó mediante colorimetría a una longitud de onda de 490 nm. El vehículo principal de las AgNPs en los primeros experimentos hasta ahora fue agua inyectable, sin embargo, el agua provoca un choque osmótico en la membrana externa del *T. cruzi* (112), por esta razón se sustituyó el agua inyectable por una solución buffer de fosfatos, una solución ya utilizada en los cultivos de epimastigotes de *T. Cruzii*, manteniendo las mismas condiciones experimentales. Para el experimento final se aumentó 3h más el tiempo de incubación con el fin de que el MTS reaccionara completamente y no existieron sesgos por error del reactivo de medición de actividad metabólica (MTS).

#### **IV.11 Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico de los ensayos de MTS y MTT se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.0 que incluye pruebas de ANOVA con un análisis de tipo Tukey, donde se compara si había diferencia significativa de todas las columnas de datos

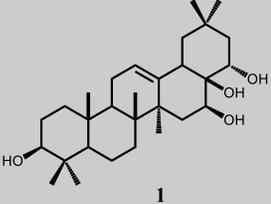
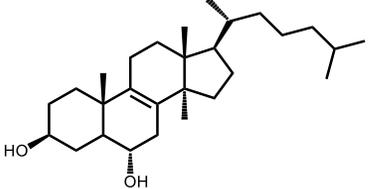
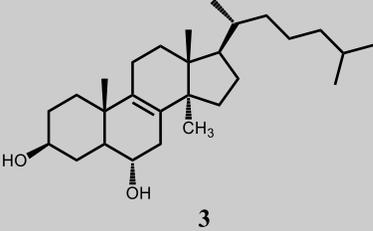
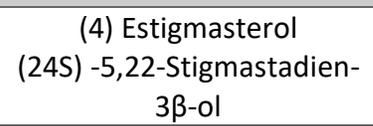
experimentales con el control positivo. Se estableció un intervalo de confianza (IC) del 95% y valor de  $P < 0.05$ . Para el tratamiento previo de los datos de todos los análisis se utilizó Microsoft Office Excel.

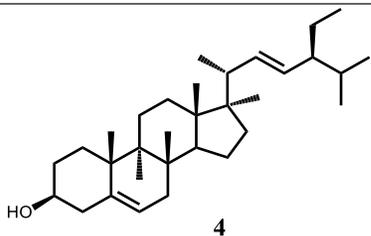
## **V. Resultados y Discusión**

### ***V.1 HPLC / MS análisis del extracto de fruta de *M. geometrizans*.***

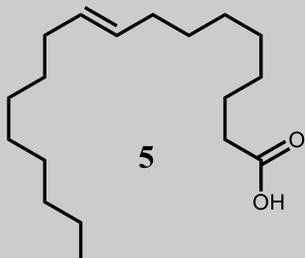
Análisis HPLC / MS del extracto de fruto de *M. geometrizans*. Partiendo de 0.1 g de extracto seco, se preparó una muestra de 200 µg/ml para análisis por duplicado de HPLC (fase inversa)/MS, el análisis de masas se realizó mediante flujo directo. De acuerdo con las condiciones descritas en la sección de metodología en el análisis, se identificaron y recolectaron los picos de mayor intensidad detectados en el cromatograma (tiempo de experimento 60 min); estas fracciones (masa > 100 ng) se analizaron por MS. La información de literatura parcial disponible sobre la caracterización química de *Myrtillocactus geometrizans* (56-59, 61), excluye el uso de patrones internos en HPLC. Los compuestos principales de la Tabla 3 se identificaron por su peso molecular característico y su relación de polaridad-tiempo de retención. Como se muestra en la tabla 3, los tiempos de retención (TR) de los compuestos 1-4 son muy próximos entre sí, entre una polaridad media-alta, lo que dificulta su separación mediante técnicas convencionales como se describe en la literatura (113). El ácido oleico es detectable en una amplia gama de TR, lo que indica que se encuentre en cantidades significativas. Las betalaínas se encuentran en valores bajos de TR según su alta polaridad, ambos son los principales compuestos para la formación de nanopartículas de plata.

Tabla 3 Masa molecular, tiempo de retención de datos (RT) y masa experimental ([M + H] + [M-H] -), masa molecular de literatura\*.

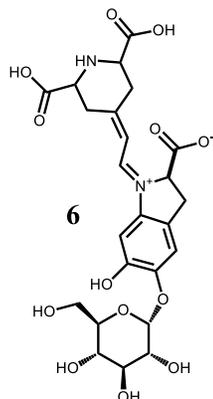
Compuesto	Masa molecular* (g/mol)	[M+ H] <sup>+</sup> (m/z) polaridad -	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) polaridad +	RT (min)
<b>(1) Chichipegenina</b> Olean-12-ene-3beta, 16beta, 22alpha, 28-tetrol 	474.7	475.2	473.4	17.8-18.43 24.6 - 25.5 37.44 - 44.14
<b>(2) Peniocerol</b> (3beta, 5alpha, 6alpha) - Cholest-8-eno-3,6-diol 	402.7	403.4	401	17.8 - 22.6 y 44.14
<b>(3) Macdougallin</b> 14-metilcolesterol-8-eno- 3,6-diol 	416.7	417.4	415.3	15.05 - 18.43 21.43 - 25.5 37.44 - 39.94
<b>(4) Estigmasterol</b> (24S) -5,22-Stigmastadien- 3β-ol 	412.7	413.3	-	24.6 y 37.4 - 38.1



(5) Ácido oleico (9z, 12z) -ácido hexadecadienoico	282.3	283.4	-	18.13 - 41.9
--	-------	-------	---	--------------



(6) betalainas (1E, 2R) -1 - [(2E) -2- (2,6- Dicarboxi-2,3-dihidro-4 (1H) -piridiniliden) etiliden] -5- (α- D-glucopiranosiloxi) -6- 2- carboxilato de hidroxio-2,3- dihidro-1H-indolio	550.5	551.2	549.1	8.4 -17.8
---	-------	-------	-------	-----------



La chichipegenina, peniocerol, macdugalina, estigmasterol y ácido oleico son compuestos químicos (tabla 3) que se han identificado previamente en los extractos polares de partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans* (57-61). En el caso de las

betalaínas estas por su función principal de coloración rojo-violeta es más abundante en el fruto del cactus que otras de sus partes aéreas.

## V.2 Monitoreo del decaimiento del extracto de *M. geometrizans* por medio de UV-Vis.

La síntesis de nanopartículas de plata se examinó utilizando un espectrofotómetro UV-vis. La absorbancia del extracto del fruto de *M. geometrizans* está en un rango de 200-450 nm, este es característico de los compuestos 1-5, fitosterol 205-254 nm (114), ácido oleico puro 230-290 nm y ácido oleico con impurezas 230-330 nm (115) en análisis UV-vis. La figura 11 muestra los espectros UV-vis de la solución acuosa del extracto con 1 ml de  $\text{AgNO}_3$  0.1 M. Las nanopartículas se forman en los primeros 30 minutos de reacción. Se obtienen tamaños más pequeños en este momento; sin embargo, si el proceso continúa, las partículas experimentarán un aumento de tamaño. Los tamaños se estabilizan a la reacción de 1 hora, sin cambios aparentes hasta las 10 horas. La resonancia de los plasmones de superficie (RSP) característica de las nanopartículas de plata (380-420 nm) está enmascarada debido al amplio rango de absorbancia del extracto de *M. geometrizans* (70, 116).

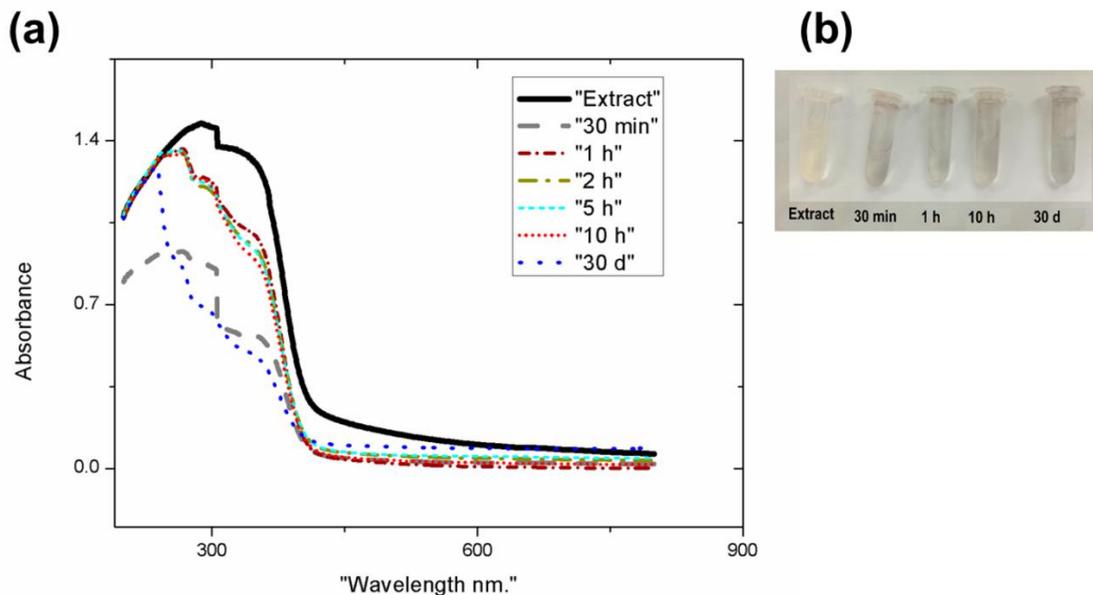


Figura 11. Resultados de UV-Vis a) análisis UV-Vis de la reacción de síntesis de Ag NPs con decaimiento del extracto de *M. geometrizans*. b) imágenes de síntesis de nanopartículas a diferentes horas de reacción.

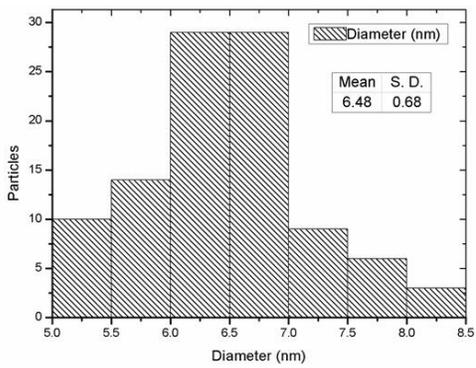
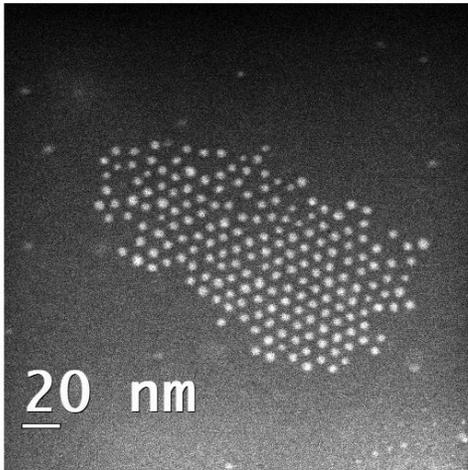
### V.3. Análisis de Microscopía electrónica de transmisión barrido (STEM).

Los experimentos de microscopía electrónica de transmisión se muestran en la figura 12. La figura 12a corresponde a la síntesis con Oleilamina (OAm)/Ácido oleico (OA) y  $\text{AgNO}_3$  0.1 M, la figura 12b corresponde al extracto de *Myrtillocactus geometrizans* con  $\text{AgNO}_3$  0.1 M. Las nanopartículas de ambos experimentos adoptaron una morfología esférica con una ligera tendencia a formar agregados. Para la síntesis con OAm/OA diámetro medio de 16.78 nm desviación estándar de 5.28 nm; para la reacción con extracto, diámetro medio de 4.72 nm y desviación estándar de  $\pm 3.92$  nm. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) de alta resolución muestran la red de nanopartículas de plata. En la figura 12, la transformada rápida de Fourier (FFT) muestra que las direcciones cristalográficas preferenciales corresponden a los planos [111] característicos de una estructura cúbica de plata centrada en la cara (FCC) (117).

La evidencia de los planos cristalográficos [111], característicos de Ag, confirma que existe una orientación preferencial en ambas síntesis, en el primer experimento se debe a la presencia de OAm/OA que favorecen estructuras [111] como se describió anteriormente, y en la reacción del extracto se debe a la presencia de los compuestos 1-6. Esto se debe a que OAm/OA tienen similitudes químicas con los componentes identificados en el extracto de *M. geometrizans*. La principal de estas similitudes son los grupos funcionales hidroxilo (-OH) y amina ( $\text{R}_1\text{-NH-R}_2$ ), ambos grupos funcionales son clave en las características de reactividad química de OAm y OA.

La estabilidad de las AgNPs obtenidas con *M. geometrizans* es de 20 días después de la síntesis, desde el día 20 hasta el 30 las AgNPs se fusionan hasta alcanzar un estado de semi - estabilidad donde las nanopartículas alcanzan un diámetro de 50-60 nm y formas irregulares, figura 13.

a)



b)

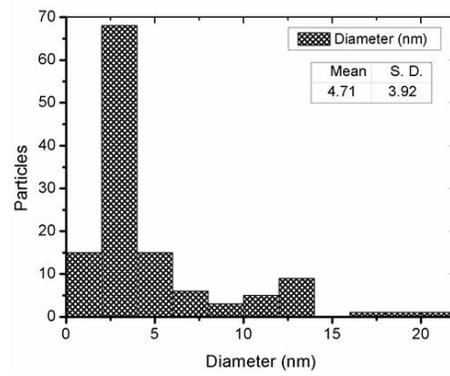
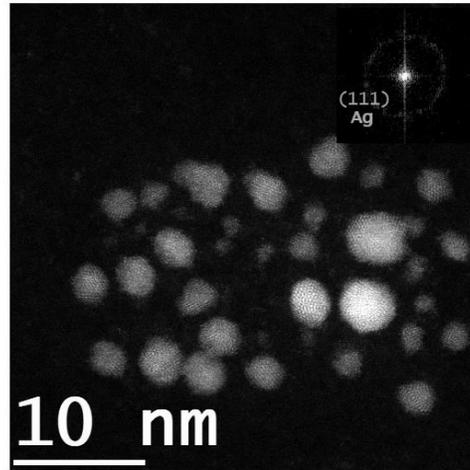


Figura 12. Micrografías de STEM e histogramas de tamaño de los AgNP sintetizados. (a) Usando OAm 40% / OA 60%, (b) Usando extracto de fruta de *M. geometrizans*.

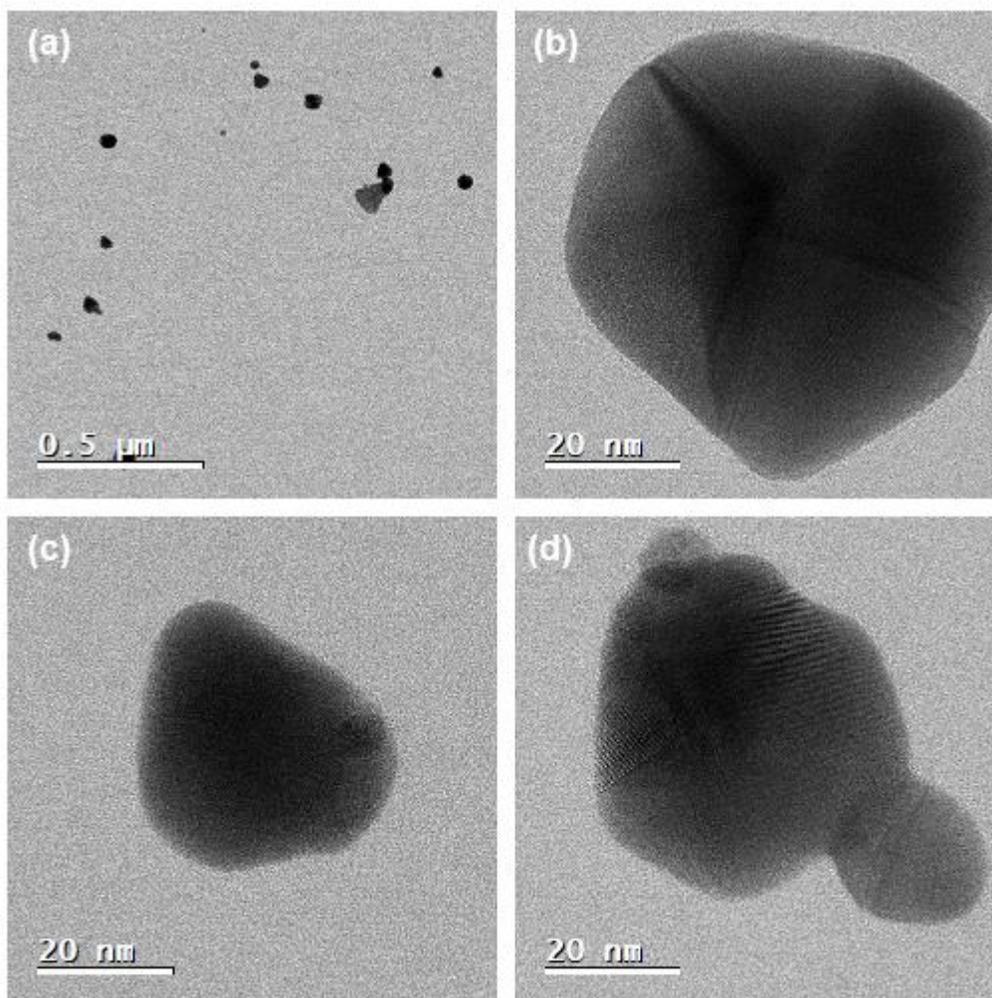


Figura 13. AgNPs de 50-60 nm después de perder estabilidad en el día 20 y alcanzando estas formas al día 30.

#### V.4. Propuesta de mecanismo para la formación de AgNPs.

Para OA y OAm, ambos se usan comúnmente en varios protocolos para la síntesis de nanopartículas de plata como agentes reductores y estabilizantes. Estos compuestos tienen pares de electrones libres en los grupos ( $-OH$ ) y amina primaria ( $R_1 - NH_2$ ) respectivamente; estos grupos funcionales pueden estabilizar nanopartículas metálicas además de ser ácidos de Lewis (118-120).

De los compuestos 1-6 (figura 2), estos compuestos tienen pares de electrones libres en los grupos ( $-OH$ ) y una amina secundaria ( $R_1 - NH - R_2$ ) en el compuesto 6; en consecuencia, son capaces de estabilizar las nanopartículas metálicas (66, 121).

El mecanismo propuesto de formación de nanopartículas de plata en síntesis con extractos de plantas se basa en la formación de grupos funcionales químicos con electrones libres y densidades de electrones (116). Estos grupos electrónicamente negativos se forman a partir de compuestos orgánicos como alcaloides, polifenoles, flavonoides, ácidos orgánicos, entre otros (122, 123). Grupos funcionales como las aminas ( $R_1 - NH - R_2$ ) y el hidróxido ( $-OH$ ) sufren la pérdida del protón ácido ( $H^+$ ) y ganan pares de electrones libres que luego ayudarán en la reducción de átomos de plata ( $Ag^+ \rightarrow Ag^0$ ) (67, 116, 123) figura 14.

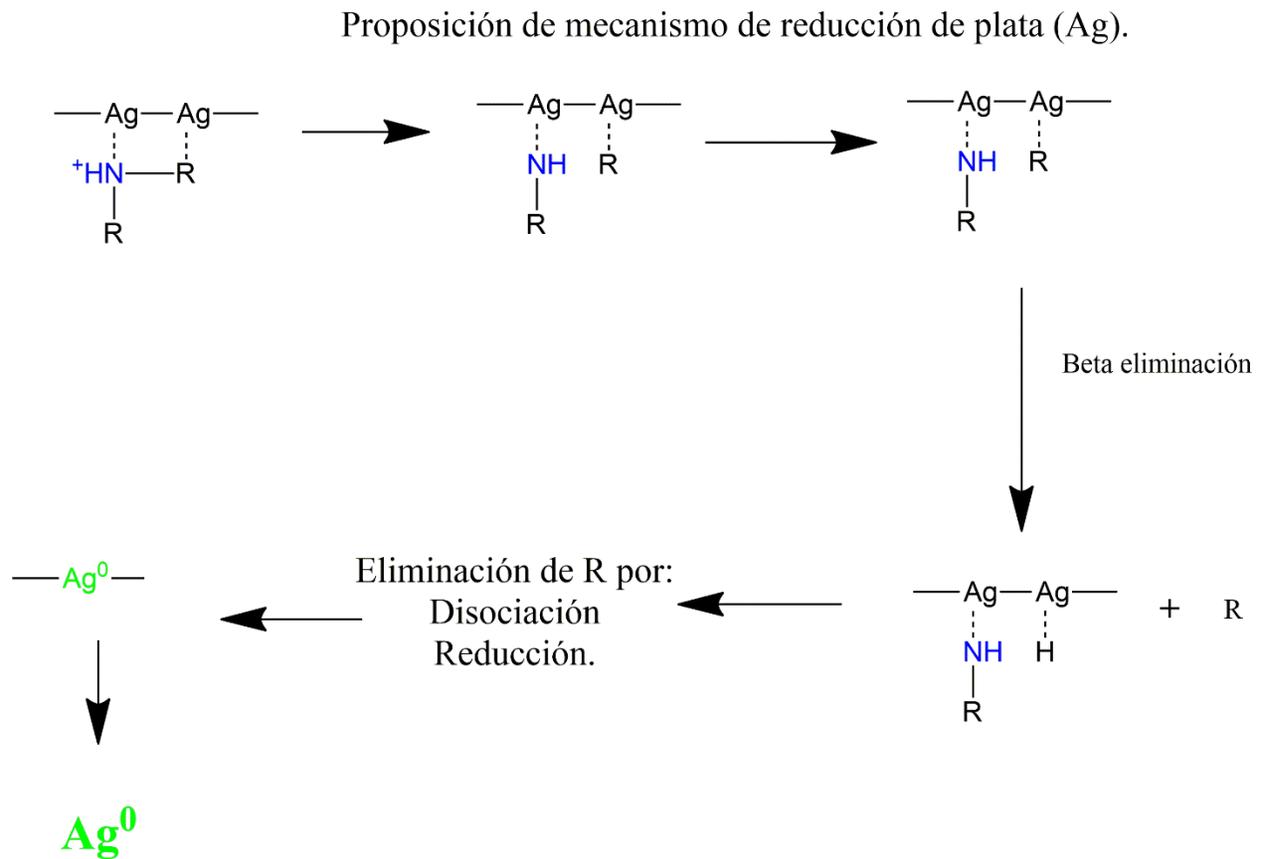


Figura 14. Esquema de propuesta de mecanismo de reducción  $Ag$  por grupos funcionales como aminas.

Los compuestos químicos 1-5 poseen el mismo grupo funcional ( $-OH$ ). En el caso de un compuesto plano como el ácido oleico, presenta este grupo funcional y favorece una orientación cristalográfica [111] en Ag. El compuesto 6 tiene una amina secundaria ( $R1 - NH - R2$ ) muy similar a la amina primaria ( $R1 - NH_2$ ) presente en OAm, la presencia de estas aminas muy similares sugiere que favorecería una orientación cristalográfica [111].

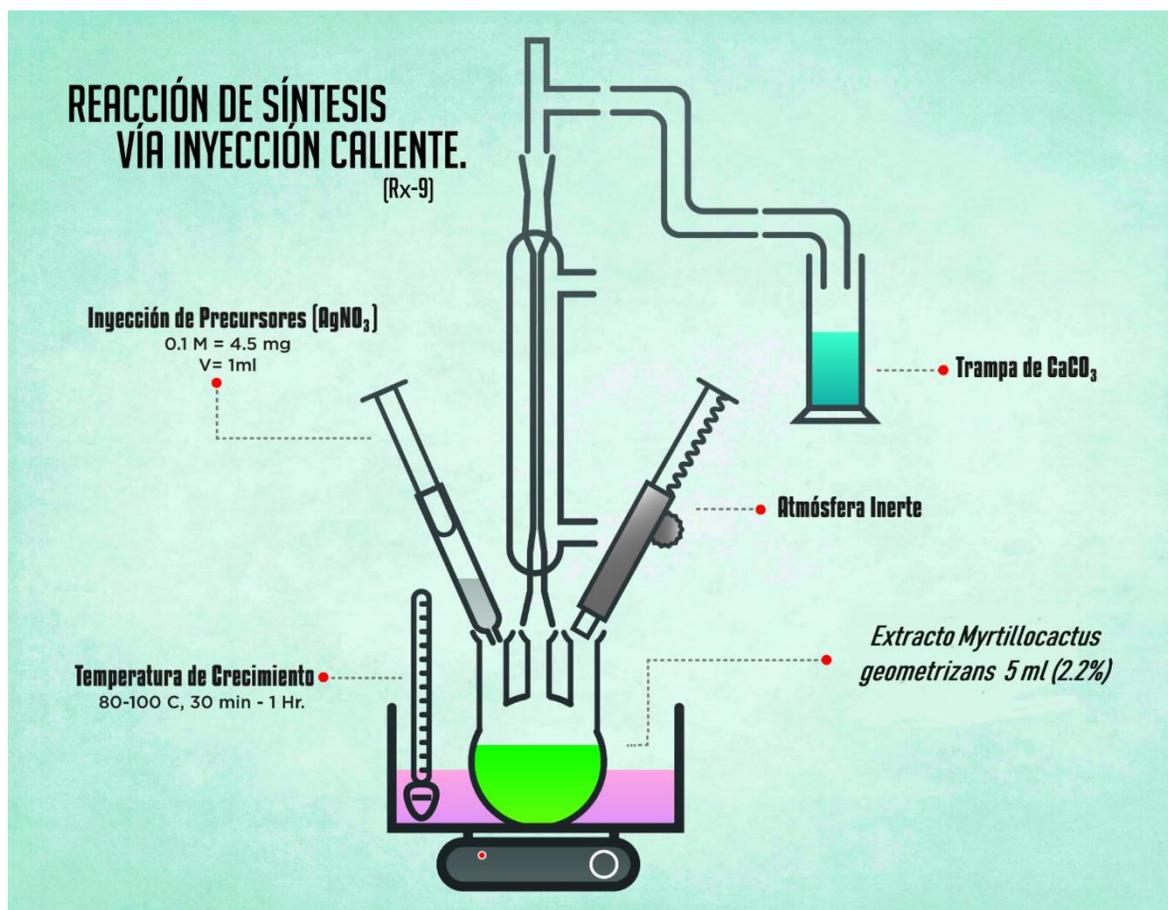


Figura 15. Esquema general de Síntesis verde con *Myrtillocactus geometrizans*.

### V.5. Cálculos teóricos de los compuestos de *Myrtillocactus geometrizans*.

El mecanismo propuesto de formación de AgNPs en síntesis con extractos de plantas se basa en la presencia de grupos funcionales químicos con electrones libres y densidades de electrones (116). Estos grupos electrónicamente negativos se forman a partir de compuestos orgánicos como alcaloides, polifenoles, flavonoides, ácidos orgánicos, entre

otros (122, 123). Grupos funcionales como las aminas (R-NH-R) y el hidróxido (-OH) sufren la pérdida del protón ácido (H +, enlace químico más largo entre O y H) y obtienen pares de electrones libres que posteriormente ayudarán en la reducción de la plata. átomos ( $Ag^+ \rightarrow Ag^0$ ) (116, 123).

La Tabla 4 muestra los compuestos identificados en el presente trabajo. El enlace químico O-H más largo se indica como el que podría ser el primer grupo funcional propenso a generar pares de electrones libres y como consecuencia incrementar la formación de nanopartículas de Ag. Esto a sugerencia del análisis *in silico* (figura 16).

Tabla 4. El valor del enlace químico mayor y más positivo para el OH, calculado *in silico*, se indica para los siguientes compuestos químicos: chichipegenina (1), peniocerol (2), macdougalina (3), estigmasterol (4), oleico ácido (5) y betalaínas (6).

Compuesto químico	Chichipegenina (1)	Peniocerol (2)	Macdougalina (3)	Estigmasterol (4)	Ácido oleico (5)	Betalainas (6)
<b>Enlace químico O-H (Å)</b>	0.9620	0.9602	0.9602	0.9603	0.9713	1.1183

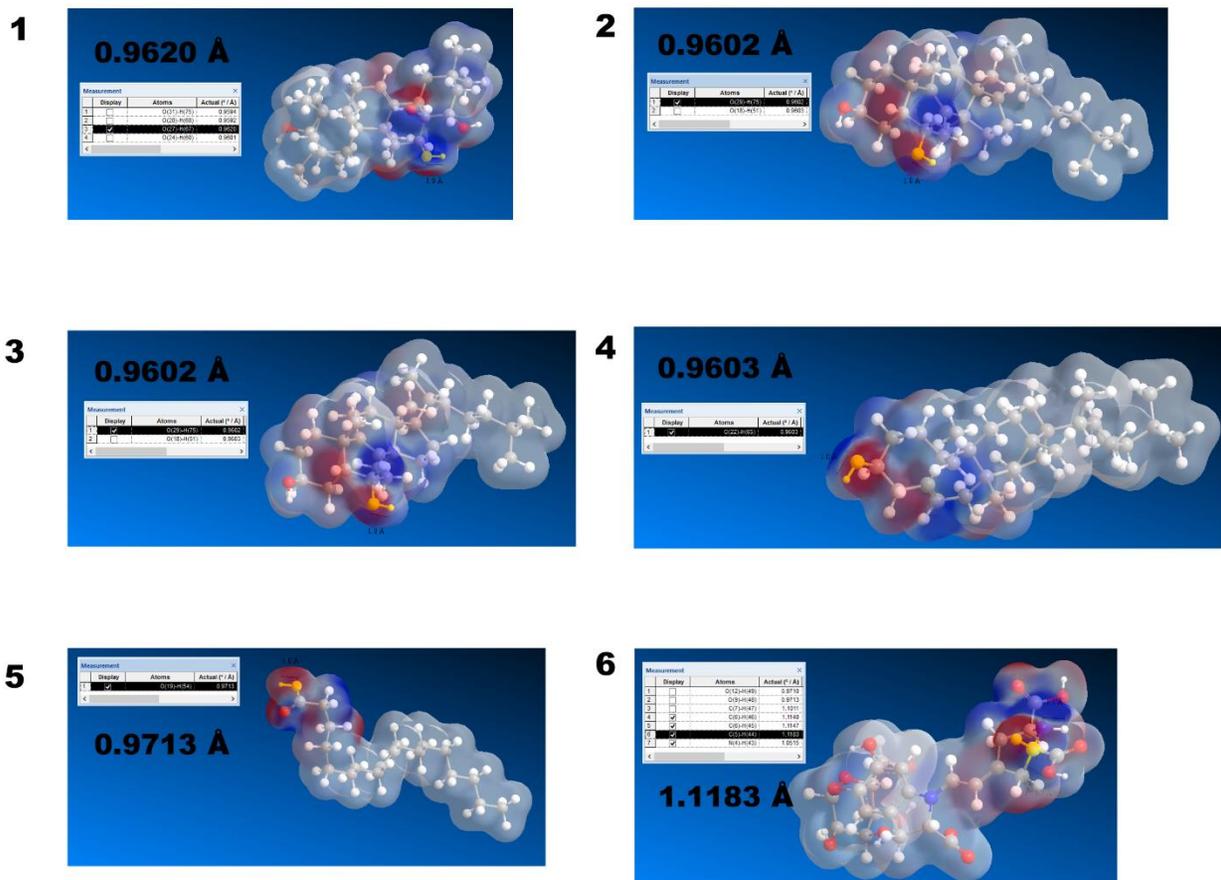


Figura 16. Se muestra el resultado final de las estructuras químicas del cálculo *in silico*, que indica el enlace químico (O-H) con mayor probabilidad de generar un ácido H<sup>+</sup>.

## V.6. Ensayo de citotoxicidad con células LL47.

Se evaluó la citotoxicidad de las AgNPs en células de fibroblastos de pulmón humano (LL47) con el apoyo de la M en C. Gabriela Carrasco Torres en el área de biología celular Cinvestav-IPN. Las células LL47 se expusieron durante un período de 72 horas con AgNPs sintetizadas con extracto de *M. geometrizans*, en concentraciones que oscilan entre 0 y 15 µg/µL. Como se ve en la figura 17, las nanopartículas no promovieron una disminución significativa en la viabilidad de LL47, excepto por la concentración más alta. La citotoxicidad de los AgNPs fue estadísticamente significativa a concentraciones iguales a 15 µg/µL (viabilidad 61 %). Estudios previos (*in vivo* e *in vitro*) muestran

evidencia donde las AgNPs recubiertos muestran daño a concentraciones de 3.3 µg/mL y 5 µg/mL (viabilidad 50 %) para AgNPs con un tamaño de 9 nm ± 6 (111, 124). Las AgNPs con tamaño de 5-35 nm presentan daño a células con concentraciones de 25 µg/mL (viabilidad 90 %) y 50 µg/mL (viabilidad 60 %) (116, 124).

Varios parámetros, como el tamaño de las nanopartículas, la forma, el grado de aglomeración, la composición química de la superficie, la carga, la concentración y el tiempo de exposición podrían influir significativamente en la toxicidad del nanomaterial (116, 125). Por tanto, existen dificultades para correlacionar la evaluación de citotoxicidad en cultivos celulares, organismos o animales, ya que los experimentos se realizan en diferentes cepas u organismos con distintas nanopartículas de plata con y sin recubrimiento (124). Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender mejor los mecanismos de citotoxicidad, así como las correlaciones entre las nanopartículas y su impacto en la salud humana y el medio ambiente.

No hay estudios toxicológicos recientes de AgNPs sobre células LL47, sin embargo, como referente de comparación de toxicidad de nanopartículas sobre células LL47 se debe revisar el estudio de *Cabral-Romero et al.* que en 2019 reportan que la toxicidad de nanopartículas lipofílicas de Bismuto (BIsBAL) empieza en 50 µM (2300 µM/µL aprox.) con un 80 % viabilidad celular de LL47 (126).

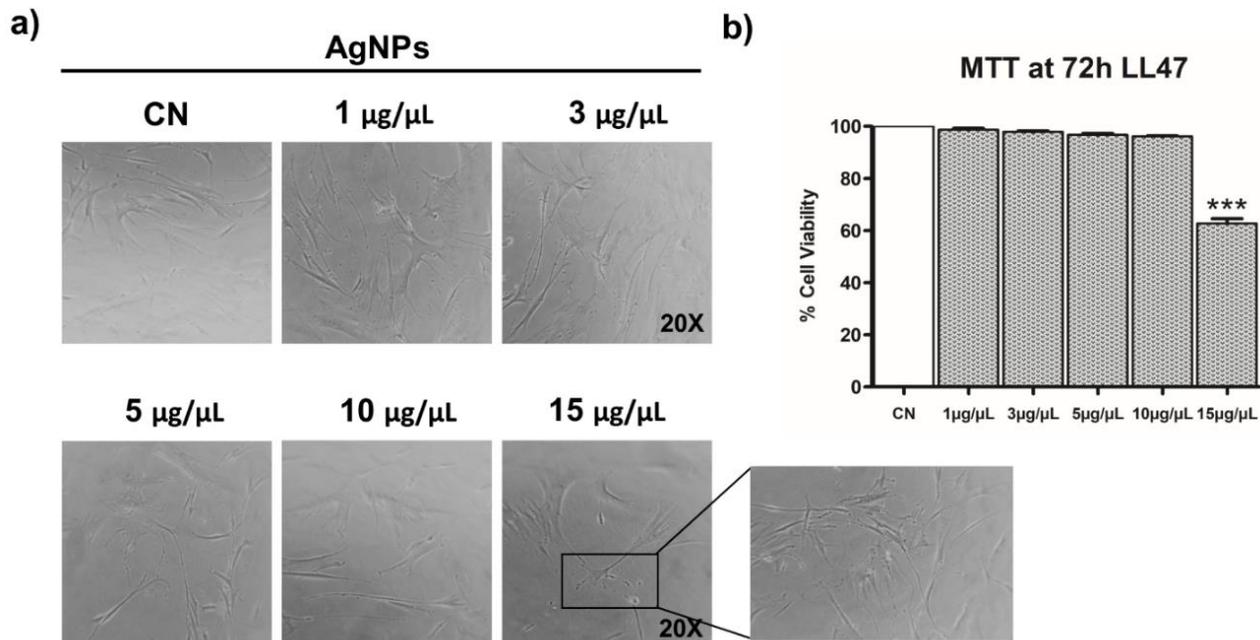


Figura 17. Viabilidad celular de LL47 con AgNPs a diferentes concentraciones (a) Sección superior fibroblastos LL47 fijos en superficie de cultivo sin AgNPs, sección inferior número menor de fibroblastos fijos con AgNPs y algunos fragmentados a medida que se incrementan dosis de AgNPs (b) Efecto de los AgNPs sobre la viabilidad de las células en el ensayo MTT.

Solo la concentración más alta utilizada mostró una disminución del 40 % en la viabilidad biológica de las células LL47, Hay que hacer énfasis en la conclusión de Tortella G. R. y colaboradores quienes en 2020 después de una revisión exhaustiva de literatura sobre toxicología de AgNPs concluyen que a pesar del gran número de estudios toxicológicos , la mayoría son ensayos clásicos de letalidad o inhibición (incluyendo el ensayo MTT de células LL47 del presente trabajo) y que para poder explicar un mecanismo toxicológico y efectos morfológicos de AgNPs fuera de debate para cada línea celular, es necesario incluir estudios de estrés oxidativo, genotoxicidad, inmunotoxicidad y neurotoxicidad donde sea necesario. Finalmente, Tortella G. R. y colaboradores sugieren un contexto de regulación para estandarizar estudios de toxicidad para nanopartículas y elucidar los efectos sobre microorganismos más allá de la explicación del daño por estrés oxidativo reportado en la literatura (127, 128). Con base en lo anterior se sugiere en perspectivas reproducir el estudio clásico toxicológico de MTT con LL47 incluyendo estudios de estrés oxidativo y micrografías de TEM con cortes de ultramicrotomo para proporcionar una

mejor descripción del daño celular por AgNPs por síntesis verde con extracto de *M. geometrizans*.

### V.7 Pruebas de viabilidad de *Trypanosoma cruzi*.

Con el fin de evaluar el efecto inhibitor de las AgNPs de *M. geometrizans* frente al protozoario *Trypanosoma cruzi*, se realizó colaboración con el departamento de Biomedicina Molecular (Cinvestav-IPN) en el laboratorio de la Dra. Rebeca Manning Cela. Agradecimientos a la apreciable colaboración de la Dra. Rebeca Manning y el Dr. José Esteban Aparicio Burgos (UAEH-Apan), a través de la cual, fue posible la adecuación del protocolo de evaluación de viabilidad de *Trypanosoma cruzi*. Las dos modificaciones principales fueron: el cambio del reactivo de ensayo de viabilidad del ensayo MTT al reactivo del ensayo MTS y la segunda modificación fue usar buffer de fosfatos (PBS) para preparar las soluciones experimentales de AgNPs, los controles positivos y negativos.

Evaluación de viabilidad de MTS: La diferencia principal entre la prueba MTT y la prueba MTS, es la sustitución de reactivo que sufre oxidación biológica (figura 18) y que posteriormente es el que se cuantifica y su presencia es directamente proporcional al número de células viables biológicamente. La diferencia del compuesto se puede apreciar en las moléculas de la figura 19.

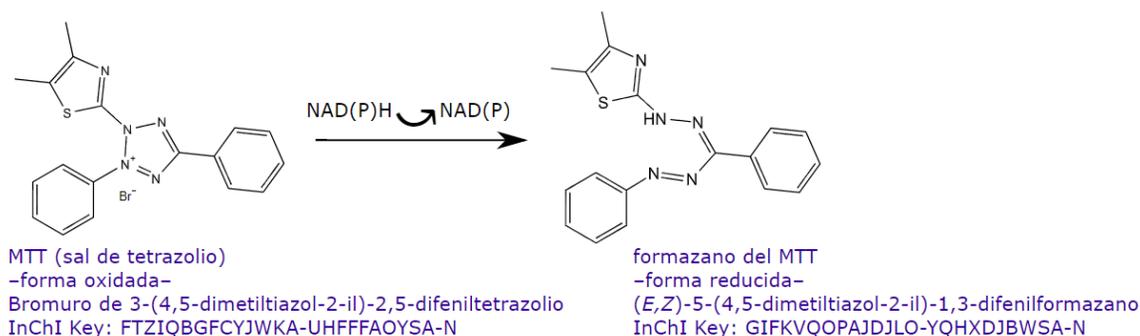


Figura 18. Reacción de reducción del formazán o formazano.

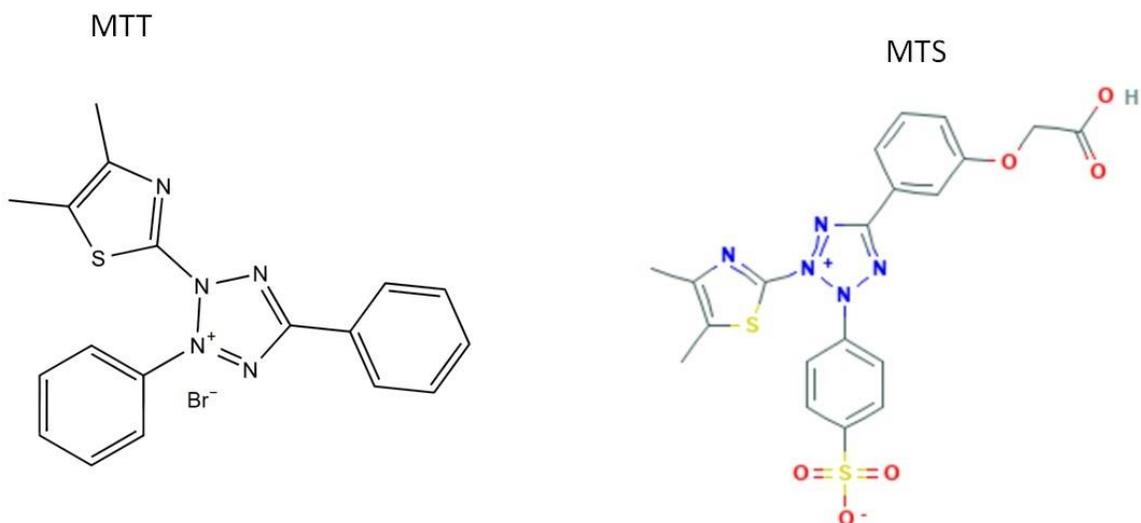
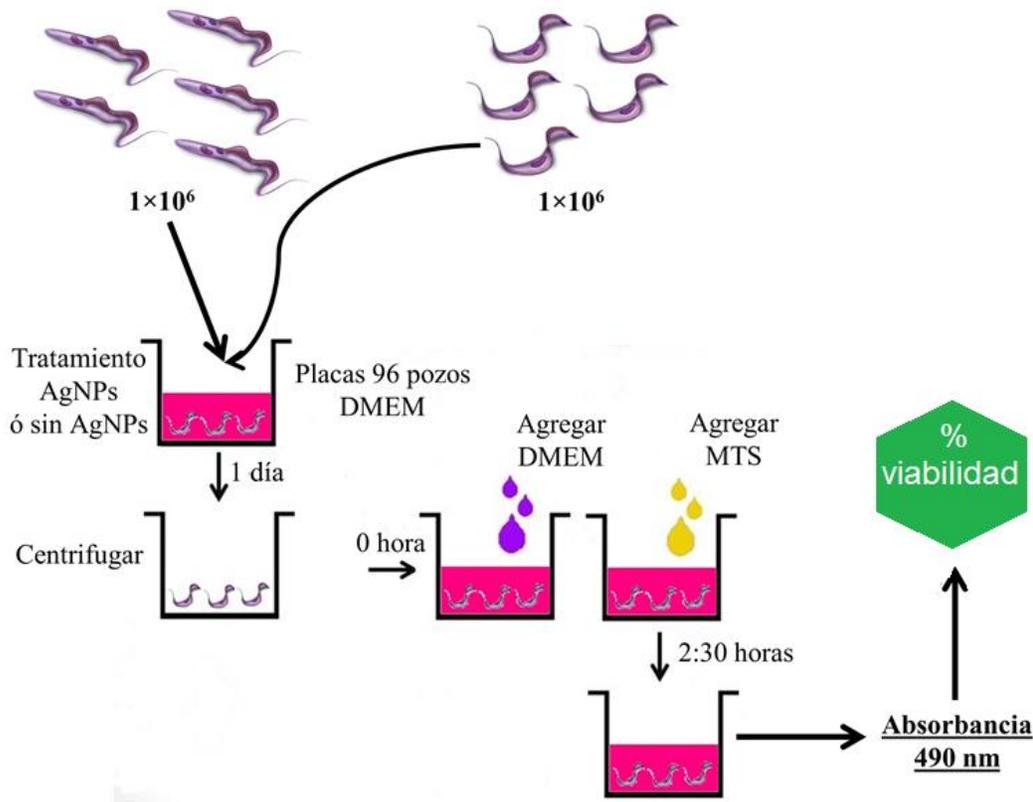


Figura 19. Reactivos que se reducen en cada técnica que permite la evaluación de viabilidad celular.

El MTS es una técnica de evaluación de viabilidad biológica que debido al cambio de reactivo principal permite disminuir el tiempo de procesamiento de muestras y minimizar el error debido al factor humano del analista, para aumentar el entendimiento de la técnica se desarrolló la figura 20.

**Ensayo MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]**



Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes.

Figura 20. Reactivos que se reducen en cada técnica de evaluación de viabilidad biológica.

Resultados de evaluación de viabilidad de MTS: *Trypanosoma cruzi* presenta 3 estados principales de desarrollo en su ciclo de vida, Amastigotes (forma intracelular en humanos), Epimastigotes (forma encontrada en vectores triatominos), tripomastigotes (forma encontrada en sangre circulante de los humanos), de las tres formas del *Trypanosoma cruzi* se seleccionó la forma de epimastigote.

Estas pruebas se realizaron según se indica en la sección de materiales y métodos y recibieron un tratamiento estadístico según lo marca los métodos. La figura 20 representa la primera prueba de MTS en *Trypanosoma cruzi* (línea CL-Brenner) sobre la forma de epimastigotes, incluye controles positivo y negativo, así como concentraciones de AgNPs de 1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g y 12  $\mu$ g (disueltas en PBS). Como se puede observar el efecto

inhibitorio empieza en concentraciones muy bajas de 1  $\mu\text{g}$ , indicando que la efectividad de las AgNPs para inhibir epimastigotes es elevada.

### MTS *Trypanosoma cruzi* (Epimastigote, CL-Brenner)

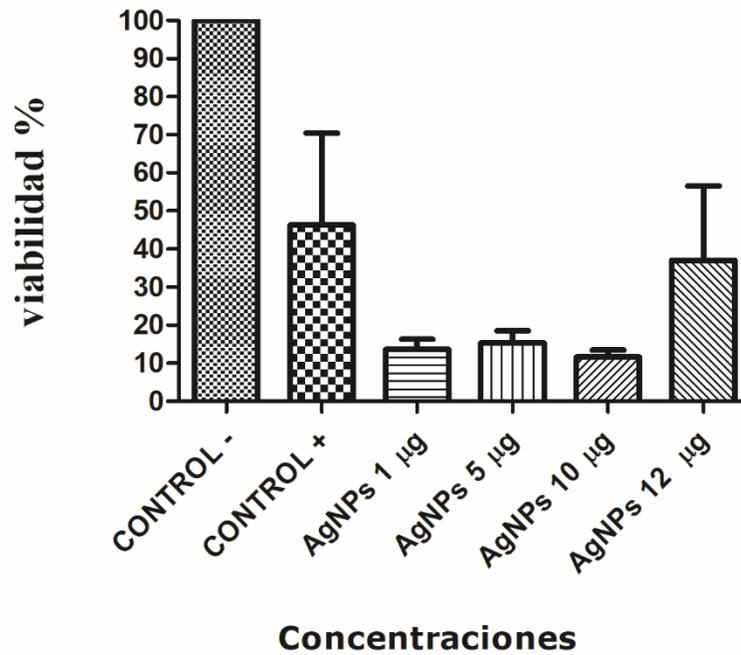


Figura 21. Gráfica viabilidad biológica del *Trypanosoma cruzi* con AgNPs en forma epimastigote.

La siguiente prueba (figura 22) se realizó sobre la forma epimastigote (forma intracelular del *t. cruzi*) de *Trypanosoma cruzi* (línea CL-Brenner), con concentraciones de 1.7  $\mu\text{g}$ , 3  $\mu\text{g}$ , 12  $\mu\text{g}$ , 17  $\mu\text{g}$  y 25  $\mu\text{g}$ , incluyendo los respectivos controles. Se puede observar un claro descenso de la viabilidad biológica en epimastigote desde la concentración más baja de 1.7  $\mu\text{g}$  y se mantiene muy similar hasta la concentración más alta de 25  $\mu\text{g}$ .

## MTS *Trypanosoma cruzi* (Epimastigote, CL-Brenner)

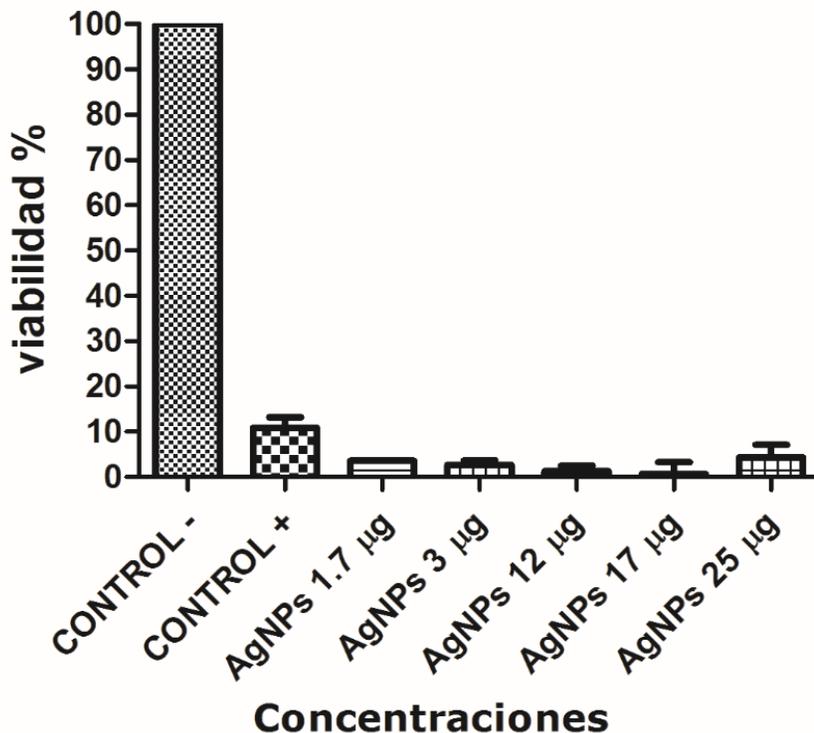


Figura 22. Gráfica viabilidad biológica del *Trypanosoma cruzi* con AgNPs en forma epimastigote.

Hay que resaltar que esta prueba con *Trypanosoma cruzi*, en forma epimastigote se realizó con las nanopartículas disueltas en agua inyectable (tratando de usar menos reactivos y economizar el proceso), lo relevante de usar agua, es debido al inconveniente que provoca, todas las formas de *Trypanosoma cruzi* sufren alteraciones osmóticas en presencia de agua (112), estas alteraciones pueden disminuir la viabilidad biológica del *T. cruzi* y crear la ilusión de un gran efecto inhibitorio de las AgNPs y en realidad este efecto inhibitorio es por la alteración osmótica causada por el agua.

Con el fin de establecer el impacto del efecto osmótico del agua y su consecuente disminución de viabilidad sobre *Trypanosoma cruzi*, se realizaron 3 experimentos más, en donde las AgNPs se administraron diluidas en solución buffer de fosfatos (PBS) y al

mismo tiempo se administró igual volumen de agua inyectable para comparar el potencial de inhibición del agua inyectable.

### MTS *Trypanosoma cruzi* (Epimastigote, CL-Brenner)

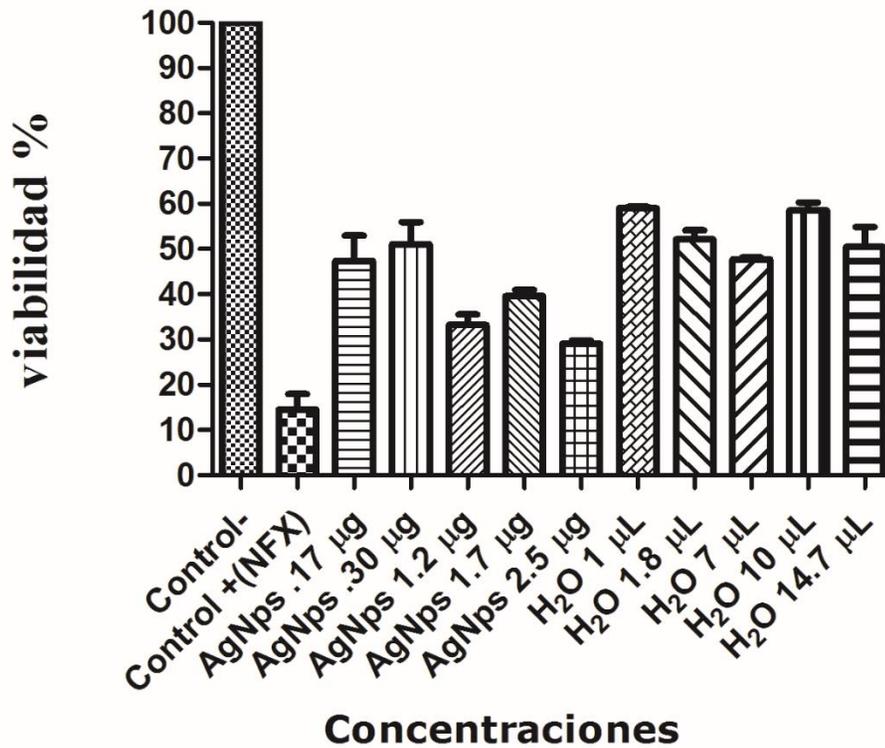


Figura 23. Gráfica viabilidad biológica del *Trypanosoma cruzi* con AgNPs (H<sub>2</sub>O), contra efecto osmótico de volumen de agua inyectable.

## MTS *Trypanosoma cruzi* (Epimastigote, CL-Brenner, PBS)

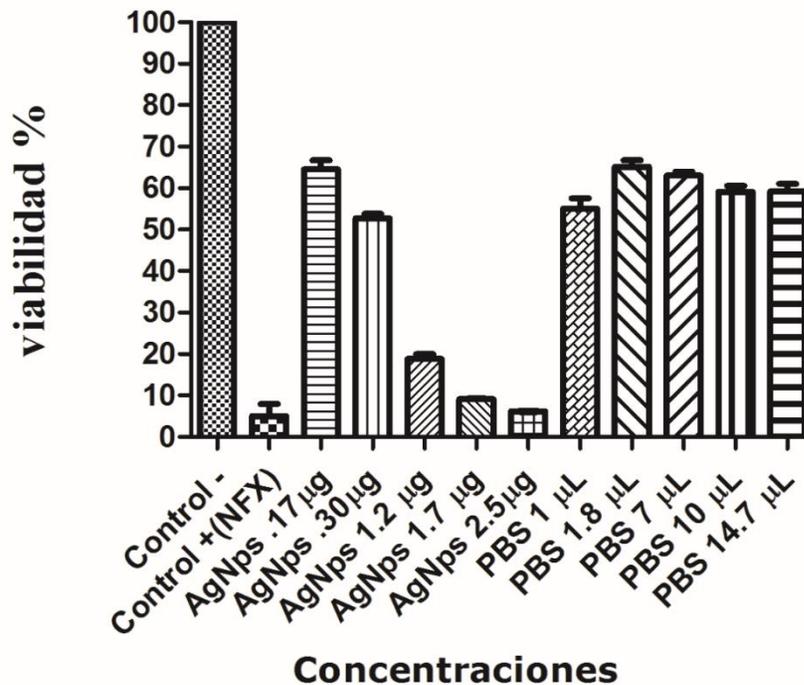


Figura 24. Gráfica viabilidad biológica del *Trypanosoma cruzi* con AgNPs (PBS), contra efecto osmótico de volumen de solución buffer de fosfatos.

Como se puede apreciar en la figura 23 vemos una disparidad en la viabilidad biológica a medida que aumenta la concentración de las AgNPs, esto indica una anomalía en el protocolo de preparación, específicamente en el vehículo (agua inyectable), también se puede apreciar como existe una cierta inhibición que tiene únicamente el agua inyectable. En la figura 24 se observa como al sustituir el vehículo por PBS la disparidad en la viabilidad biológica se corrige y da una respuesta clásica de disminución de viabilidad biológica al aumentar la concentración de AgNPs. Esto nos indica que únicamente el agua si tiene un efecto de alteración del *Trypanosoma cruzi* y como al usar un vehículo diferente (PBS) el efecto de las AgNPs se revela. El experimento de la figura 24 descarta que sea el reactivo el que no esté reaccionado correctamente y reafirma la reproducibilidad de los resultados con vehículo PBS.

### 3h- MTS *Trypanosoma cruzi* (Epimastigote, CL-Brenner, PBS)

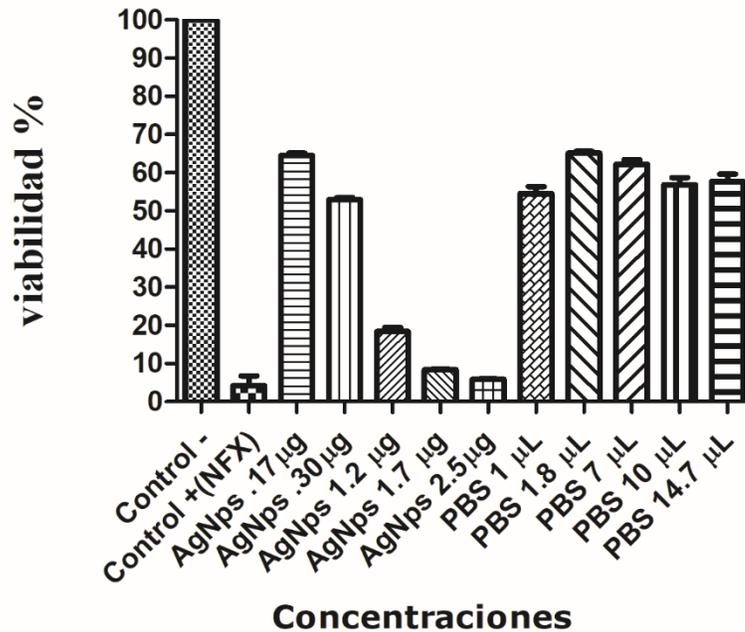


Figura 25. Gráfica viabilidad biológica del *Trypanosoma cruzi* con AgNPs (PBS), contra el efecto osmótico del volumen de la solución buffer de fosfatos, aumentando el tiempo de reacción del reactivo del MTS a 3 horas extras sobre el tiempo protocolo.

Las principales estructuras de intercambio con el exterior en el *Trypanosoma cruzi*, se denominan, bolsa flagelar y citostoma (93, 96, 97, 99, 100, 129), El camino de endocitosis completo ha sido descrito por De Souza W. *et al.* (93, 98) a través de cryo-microscopia electrónica de cortes biológicos de *Trypanosoma cruzi* y nanopartículas de oro y hierro de 10 nm. De Souza W. *et al.* elucidaron el camino de endocitosis para citostoma y bolsa flagelar (diámetro máximo de 0.3 µm), estas estructuras con alta polarización por presencia de proteínas con carbohidratos de carbono presentaron una alta unión con nanopartículas de oro y pueden observarse claramente con cryo-microscopia electrónica, con esto se puede afirmar que las nanopartículas de naturaleza metálica similar al oro tienen alta afinidad por el citostoma y bolsa flagelar. En nuestro trabajo las nanopartículas de plata con recubrimiento de extracto *M. geometrizans* tienen alta probabilidad de unirse a alguna de estas dos estructuras (citostoma y bolsa flagelar, Figura 26) y posiblemente

se internalicen como las nanopartículas de oro en el trabajo De Souza W. *et al.* (98). La diferencia central es que mientras el oro es no reactivo y químicamente estable a ataques ácidos, la plata tiene una reactividad química mayor y genera estrés oxidativo mediante la formación de iones plata ( $Ag^+$ ), estos iones plata se generan con interacción de ácidos orgánicos o grupos funcionales polares. Los iones  $Ag^+$  alteran la estructura terciaria de proteínas y generan especies reactivas de oxígeno al interior del protozario, esto es una plausible explicación para la disminución de viabilidad biológica del *Trypanosoma cruzi*.

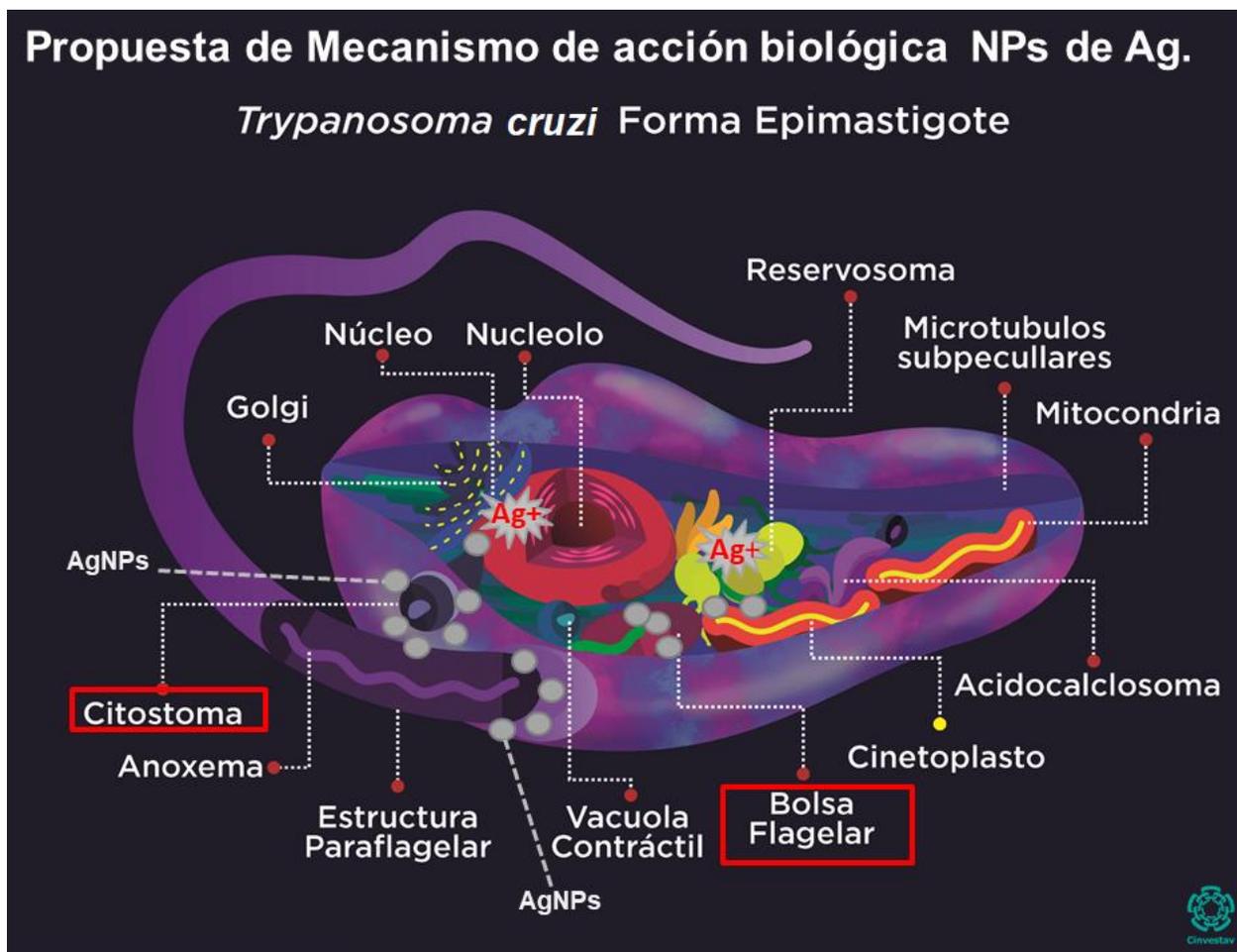


Figura 26. Propuesta del mecanismo de acción de inhibición de las AgNPs en *Trypanosoma cruzi*, unión de nanopartículas de plata al citostoma y bolsa flagelar y posterior internalización para generación de iones plata e iniciar estrés oxidativo (representado por  $Ag^+$ ).

## **VI. Conclusiones.**

Las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde con *M. geometrizans* con un diámetro promedio 4.79 nm baja dispersión en tamaño ( $\pm 3.92$  nm desviación estándar), con estabilidad de 20 días y un recubrimiento mixto de los componentes del extracto vegetal con potencial para aplicaciones biológicas debido a su toxicidad relativamente baja de 15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (viabilidad 61 %).

Las AgNPs presentan inhibición del 80 % al 95 % (concentraciones de: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de las formas epimastigote del parásito *Trypanosoma cruzi in vitro*, la internalización de las AgNPs posiblemente ocurre por la naturaleza química que comparten nanopartículas de plata y nanopartículas de oro, estas últimas utilizadas por De Souza W. *et al.*(98), estas nanopartículas de oro son internalizadas por citostoma y bolsa flagelar estructuras encargadas de endocitosis y exocitosis del *T. cruzi*, por lo cual se propone que las AgNPs tendrán el mismo comportamiento, con la diferencia que las AgNPs generan estrés oxidativo e inhibición parasitaria y las nanopartículas de oro no generan estrés oxidativo significativo.

La dosis de AgNPs que presento toxicidad en células LL47 es de 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La dosis donde empieza un efecto antiparasitario para *Trypanosoma cruzi* es de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , esto nos da un rango amplio para una probable ventana terapéutica con pruebas “*in vivo*” para realizar pruebas de dosis letal 50. Estos resultados pueden generar un avance en opciones terapéuticas tangibles. Hacen falta realizar experimentos de cryo-microscopia electrónica en muestras biológicas de *Trypanosoma cruzi* expuestos a nanopartículas de plata y confirmar su presencia en citostoma y bolsa flagelar, así como observar si existe una internalización de AgNPs y un estrés oxidativo asociado.

## **VII. Recomendaciones.**

El estudio de efecto biológico de cualquier especie vegetal siempre conlleva inconvenientes, tales como el rendimiento de los extractos obtenidos, la viabilidad de uso de los extractos, la solubilidad del extracto en el vehículo al momento de realizar las

pruebas biológicas, los posibles efectos sinérgicos del extracto, debido a la gran cantidad de compuesto químicos presentes en un extracto aún ya purificado. Se recomienda trabajar con solo con mezclas binarias de compuestos provenientes de extractos vegetales.

### VI.1 Perpectivas

Se requiere preparar y manipular muestras de *Trypanosoma cruzi* con AgNPs para microscopia electrónica y finalmente contar con imágenes de equipos TEM y SEM que permitan comprobar las interacciones biológicas de *T. cruzi* con AgNPs en citostoma y bolsa flagelar, cuidando el bajo voltaje de trabajo y la cantidad de electrones suministrada a las muestras biológicas para disminuir su alteración, con el fin de obtener resultados similares a la figura 26.

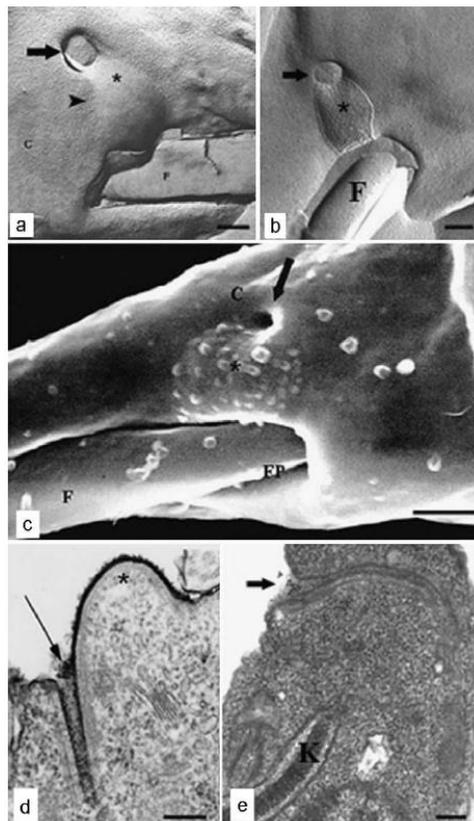


Figura 27. *T. cruzi* endocitosis: sitios de entrada - La membrana entre el citostoma y el bolsillo flagelar es un dominio especial de membrana. Réplicas de fractura por congelación (a), el dominio de la membrana que se proyecta desde el citostoma y se abre al bolsillo flagelar está casi desprovisto de partículas

intramembranas, ambos lados de la flecha. Si se voltea (b) para exponer la superficie de la celda, es el mismo dominio. Este aspecto se correlaciona con una gran concentración de gluconjugados de superficie, como ya se ha demostrado por la tinción roja de rutenio (d), que puede tener una función de receptor, según lo indicado por la unión de la transferrina (e) etiquetada en oro observada por la microscopía electrónica de transmisión. El mismo aspecto se puede observar mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo de alta resolución (c). barra de 200 nm (98).

## VIII. Referencias

1. Gomes A, Sengupta J, Datta P, Ghosh S, Gomes A. Physiological Interactions of Nanoparticles in Energy Metabolism, Immune Function and Their Biosafety: A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;16(1):92-116.
2. Makhlof ASH, Scharnweber D. *Handbook of nanoceramic and nanocomposite coatings and materials*: Butterworth-Heinemann; 2015.
3. Mulfinger L, Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam AV, Rutkowsky SA, Boritz C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*. 2007;84(2):322.
4. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of The Total Environment*. 2010;408(5):999-1006.
5. Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Morrell-Falvey JL, Gu B, Doktycz MJ. Cytotoxicity Induced by Engineered Silver Nanocrystallites Is Dependent on Surface Coatings and Cell Types. *Langmuir*. 2012;28(5):2727-35.
6. MacCormack TJ, Clark RJ, Dang MKM, Ma G, Kelly JA, Veinot JGC, et al. Inhibition of enzyme activity by nanomaterials: Potential mechanisms and implications for nanotoxicity testing. *Nanotoxicology*. 2012;6(5):514-25.
7. Wang J, Jensen UB, Jensen GV, Shipovskov S, Balakrishnan VS, Otzen D, et al. Soft Interactions at Nanoparticles Alter Protein Function and Conformation in a Size Dependent Manner. *Nano Letters*. 2011;11(11):4985-91.
8. Bilberg K, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E. In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology*. 2012;2012:9.
9. Ringwood AH, McCarthy M, Bates TC, Carroll DL. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Marine Environmental Research*. 2010;69:S49-S51.
10. Hadrup N, Sharma AK, Loeschner K. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018;98:257-67.
11. Mao B-H, Tsai J-C, Chen C-W, Yan S-J, Wang Y-J. Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*. 2016;10(8):1021-40.
12. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;11(0):55-75.
13. Bhattarai B, Zaker Y, Bigioni TP. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Challenges and opportunities. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2018;12:91-100.
14. Bastús NG, Merkoçi F, Piella J, Puentes V. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. *Chemistry of Materials*. 2014;26(9):2836-46.
15. Liu K, Liu H, Fan Q, Zhang S, Liu Z, Han L, et al. Solid to Hollow Conversion of Silver Nanocrystals by Surface-Protected Etching. *Chemistry – A European Journal*. 2018;0(ja).
16. Jorge de Souza TA, Rosa Souza LR, Franchi LP. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;171:691-700.

17. Sweeney SF, Woehrlé GH, Hutchison JE. Rapid Purification and Size Separation of Gold Nanoparticles via Diafiltration. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(10):3190-7.
18. Yang J, Lee JY, Ying JY. Phase transfer and its applications in nanotechnology. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(3):1672-96.
19. Joshi CP, Bigioni TP. Model for the Phase Transfer of Nanoparticles Using Ionic Surfactants. *Langmuir*. 2014;30(46):13837-43.
20. Kahrilas GA, Wally LM, Fredrick SJ, Hiskey M, Prieto AL, Owens JE. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Orange Peel Extract. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014;2(3):367-76.
21. Pacioni NL, Borsarelli CD, Rey V, Veglia AV. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. In: Alarcon EI, Griffith M, Udekwu KI, editors. *Silver Nanoparticle Applications: In the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 13-46.
22. Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*. 2014;139(19):4855-61.
23. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(9):767-76.
24. Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M, de Alba-Alvarado MC, Castillo-Saldaña DR, Zenteno-Galindo EA, et al. Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 2016;59(3):6-16.
25. Bern C. Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(5):456-66.
26. Khodashenas B, Ghorbani HR. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015.
27. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6(2):257-62.
28. Kouvaris P, Delimitis A, Zaspalis V, Papadopoulos D, Tsipas SA, Michailidis N. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract. *Materials Letters*. 2012;76:18-20.
29. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003;28(4):313-8.
30. Lansdown ABG. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2010;2010.
31. Hill WR, Pillsbury DM. *Argyria: the pharmacology of silver*: Williams & Wilkins Company; 1939.
32. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 2009;27(1):76-83.
33. Chernousova S, Epple M. *Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;52(6):1636-53.
34. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007;3(1):95-101.
35. Brito TK, Silva Viana RL, Gonçalves Moreno CJ, da Silva Barbosa J, Lopes de Sousa Júnior F, Campos de Medeiros MJ, et al. Synthesis of Silver Nanoparticle Employing Corn Cob Xylan as a Reducing Agent with Anti-Trypanosoma cruzi Activity. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:965-79.
36. Mathur P, Jha S, Ramteke S, Jain NK. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018;46(sup1):115-26.
37. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2012;2(1):32.
38. de Mello Donegá C, Liljeroth P, Vanmaekelbergh D. Physicochemical Evaluation of the Hot-Injection Method, a Synthesis Route for Monodisperse Nanocrystals. *Small*. 2005;1(12):1152-62.
39. Pillai ZS, Kamat PV. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108(3):945-51.
40. Kwon SG, Hyeon T. Formation Mechanisms of Uniform Nanocrystals via Hot-Injection and Heat-Up Methods. *Small*. 2011;7(19):2685-702.

41. de Mello Donegá C, Liljeroth P, Vanmaekelbergh D. Physicochemical Evaluation of the Hot-Injection Method, a Synthesis Route for Monodisperse Nanocrystals. *Small*. 2005;1(12):1152-62.
42. R. M. Curso Teórico de Farmacognosia In: UNAM, editor. México: UNAM; 2000. p. 2-5.
43. García RÁ. Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stevia pilosa* y *Stevia tomentosa*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2005.
44. Batista GRdML, Camila de Albuquerque M, Cynthia Layse Ferreira de A, Petrônio Filgueiras de A-F, José Maria B-F, Leônia M. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(4):2692-749.
45. Christopher R. McCurdy SSS. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sciences*. 2005;78:476 – 84.
46. de Sousa DP. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*. 2011;16(3):2233-52.
47. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 2005;78(5):431-41.
48. Heinrich M, Ankli A, Frei B, Weimann C, Sticher O. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Social science & medicine* (1982). 1998;47(11):1859-71.
49. Amaral JFd. Tesis de posgrado La actividad antiinflamatoria, antinociceptiva y Gastroprotector del aceite esencial *Croton sonderianus* Muell. Arg. Fortaleza, Brasil: Universidade Federal do Ceará; 2004.
50. Leonti M, Sticher O, Heinrich M. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (Mexico). *J Ethnopharmacol*. 2003;88(2-3):119-24.
51. Baños RIE. Aislamiento y cuantificación de la (+)-ivalina en el té de *Zaluzania triloba*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2010.
52. A. Namvaran Abbas Abada MHKNAGFT. Effect of *Matricaria chamomilla* Hydroalcoholic Extract on Cisplatin-induced Neuropathy in Mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2011;9(2):126–31.
53. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana México: Computo Academico UNAM; 2014 [cited 2014 22/04/2014]. Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
54. Correa-Betanzo J, Jacob JK, Perez-Perez C, Paliyath G. Effect of a sodium caseinate edible coating on berry cactus fruit (*Myrtillocactus geometrizans*) phytochemicals. *Food Research International*. 2011;44(7):1897-904.
55. Ballester Olmos JF. Los cactus y las otras plantas suculentas 1978.
56. Barrera FAG, Reynoso CR, González de Mejía E. Estabilidad de las betalaínas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) / Stability of betalains extracted from garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Science and Technology International*. 1998;4(2):115-20.
57. Djerassi C, Burstein S, Estrada H, Lemin AJ, Lippman AE, Manjarrez A, et al. Terpenoids. XXVIII.1 The Triterpene Composition of the Genus *Myrtillocactus*2. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(13):3525-8.
58. Djerassi C, Murray RDH, Villotti R. 204. The structure of the cactus sterol, peniocerol (cholest-8-ene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol). *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1965(0):1160-5.
59. Sandoval A, Manjarrez A, Leeming PR, Thomas GH, Djerassi C. Terpenoids. XXX.1 The Structure of the Cactus Triterpene Chichipegenin. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(16):4468-72.
60. Khong P, Lewis K. New triterpenoid extractives from *Lemaireocereus chichipe*. *Australian Journal of Chemistry*. 1975;28(1):165-72.
61. Céspedes CL, Salazar JR, Martínez M, Aranda E. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*. 2005;66(20):2481-93.
62. Salazar Juan R, Martínez-Vazquez M, Cespedes Carlos L, Ramírez-Apan T, Nieto-Camacho A, Rodríguez-Silverio J, et al. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichipegenin, Peniocerol, and Maccougallin Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift für Naturforschung C* 2011. p. 24.
63. Brufau G, Canela MA, Rafecas M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*. 2008;28(4):217-25.

64. Kangsamaksin T, Chaithongyot S, Wootthichairangsan C, Hanchaina R, Tangshewinsirikul C, Svasti J. Lupeol and stigmaterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *PLOS ONE*. 2017;12(12):e0189628.
65. Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F. Biological Activities of Plant Pigments Betalains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(6):937-45.
66. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16(1):14.
67. Zaheer Z, Rafiuddin. Silver nanoparticles to self-assembled films: Green synthesis and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;90:48-52.
68. Siddiqi KS, Husen A. Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017;40:10-23.
69. Husen A, Siddiqi KS. Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):229.
70. Raj S, Chand Mali S, Trivedi R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;503(4):2814-9.
71. Hiramatsu H, Osterloh FE. A Simple Large-Scale Synthesis of Nearly Monodisperse Gold and Silver Nanoparticles with Adjustable Sizes and with Exchangeable Surfactants. *Chemistry of Materials*. 2004;16(13):2509-11.
72. Razgoniaeva N, Acharya A, Sharma N, Adhikari P, Shaughnessy M, Moroz P, et al. Measuring the Time-Dependent Monomer Concentration during the Hot-Injection Synthesis of Colloidal Nanocrystals. *Chemistry of Materials*. 2015;27(17):6102-8.
73. Lucas-Gómez I, Carrasco-Torres G, Bahena-Urbe D, Santoyo-Salazar J, Fernández-Martínez E, Sánchez-Crisóstomo I, et al. Green synthesis of silver nanoparticles with phytosterols and betalain pigments as reducing agents present in cactus *Myrtillocactus geometrizans*. *MRS Advances*. 2020;5(63):3361-9.
74. Logeswari P, Silambarasan S, Abraham J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015;19(3):311-7.
75. Emmanuel R, Palanisamy S, Chen S-M, Chelladurai K, Padmavathy S, Saravanan M, et al. Antimicrobial efficacy of green synthesized drug blended silver nanoparticles against dental caries and periodontal disease causing microorganisms. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;56:374-9.
76. Latha M, Sumathi M, Manikandan R, Arumugam A, Prabhu NM. Biocatalytic and antibacterial visualization of green synthesized silver nanoparticles using *Hemidesmus indicus*. *Microbial Pathogenesis*. 2015;82:43-9.
77. Ibrahim HMM. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2015;8(3):265-75.
78. Mittal AK, Tripathy D, Choudhary A, Aili PK, Chatterjee A, Singh IP, et al. Bio-synthesis of silver nanoparticles using *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. and its therapeutic evaluation as anticancer and antimicrobial agent. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;53:120-7.
79. Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;128:276-86.
80. Sadeghi B, Rostami A, Momeni SS. Facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Pistacia atlantica* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;134:326-32.
81. Gavade NL, Kadam AN, Suwarnkar MB, Ghodake VP, Garadkar KM. Biogenic synthesis of multi-applicative silver nanoparticles by using *Ziziphus Jujuba* leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;136:953-60.
82. Ramesh PS, Kokila T, Geetha D. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;142:339-43.

83. Miri A, Sarani M, Rezazade Bazaz M, Darroudi M. Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its antibacterial properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;141:287-91.
84. Kuppurangan G, Karuppasamy B, Nagarajan K, Krishnasamy Sekar R, Viswaprakash N, Ramasamy T. Biogenic synthesis and spectroscopic characterization of silver nanoparticles using leaf extract of *Indoneesiella echioides*: in vitro assessment on antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity potential. *Applied Nanoscience*. 2016;6(7):973-82.
85. Panja S, Chaudhuri I, Khanra K, Bhattacharyya N. Biological application of green silver nanoparticle synthesized from leaf extract of *Rauvolfia serpentina* Benth. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2016;6(7):549-56.
86. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Achillea biebersteinii* Flower Extract: Apoptosis Induction in MCF-7 Cells via Caspase Activation and Regulation of Bax and Bcl-2 Gene Expression. *Molecules*. 2015;20(2):2693-706.
87. Khatami M, Mehnipor R, Poor MHS, Jouzani GS. Facile Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Descurainia sophia* and Evaluation of Their Antibacterial and Antifungal Properties. *Journal of Cluster Science*. 2016;27(5):1601-12.
88. Ahila NK, Ramkumar VS, Prakash S, Manikandan B, Ravindran J, Dhanalakshmi PK, et al. Synthesis of stable nanosilver particles (AgNPs) by the proteins of seagrass *Syringodium isoetifolium* and its biomedical properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:60-70.
89. Sinha SN, Paul D, Halder N, Sengupta D, Patra SK. Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*. 2015;5(6):703-9.
90. Patel V, Berthold D, Puranik P, Gantar M. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Biotechnology Reports*. 2015;5:112-9.
91. Kathiraven T, Sundaramanickam A, Shanmugam N, Balasubramanian T. Green synthesis of silver nanoparticles using marine algae *Caulerpa racemosa* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Applied Nanoscience*. 2015;5(4):499-504.
92. Ahmed E, Hafez A, Ismail F, Elsonbaty M, Abbas H, Eldin R. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis* and *Nostoc* sp. *Global Adv Res J Microbiol*. 2015;4:036-49.
93. Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *European Journal of Cell Biology*. 2000;79(11):858-69.
94. Teixeira ARL, Argañaraz ER, Freitas LH, Lacava ZGM, Santana JM, Luna H. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1994;305(2):197-209.
95. Salazar Schettino P, Bucio Torres M, Rojo Mdina J, Manuel Valencia Y. Manual de procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México. 2019.
96. de Souza W, Rocha GM, Miranda K, Bisch PM, Weissmuller G. Atomic Force Microscopy as a Tool for the Study of the Ultrastructure of Trypanosomatid Parasites. In: Braga PC, Ricci D, editors. *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 211-21.
97. Vidal JC, Alcantara CdL, de Souza W, Cunha-e-Silva NL. Loss of the cytosome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of Structural Biology*. 2016;196(3):319-28.
98. de Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 2009;44(2):67-124.
99. Girard-Dias W, Alcântara CL, Cunha-e-Silva N, de Souza W, Miranda K. On the ultrastructural organization of *Trypanosoma cruzi* using cryopreparation methods and electron tomography. *Histochemistry and Cell Biology*. 2012;138(6):821-31.
100. Field MC, Carrington M. The trypanosome flagellar pocket. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7:775.

101. Enfermedades CNdPPyCd. Manual de Procedimientos para la enfermedad de Chagas en México. In: Salud Sd, editor. México: Secretaria de Salud México; 2019. p. 107.
102. D.E.J. O. Aspectos básicos de farmacognosia. . Medellín. : Facultad Química Farmacológica, Universidad de Antioquia. ; 2009.
103. Castelazo FG. Determinación de los componentes químicos y evaluación de la capacidad genotóxica mediante ensayo cometa de la planta *Jatropha dioica*. Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2013.
104. Domínguez XA. Metodos de investigacion Fitoquímica. México: Ed. Limusa; 2000.
105. Robert Thornton Morrison RNB. Química Organica. 5° ed. USA: Addison-Wesley Iberoamericana; 1987. 1474 p.
106. McMurry J. Química Organica. 3° ed. México: Editorial Iberoamerica; 1994. 1274 p.
107. Harris DC. Análisis Químico cuantitativo. México1992. 619-30 p.
108. Levine IN. Química cuántica. 5° ed. Madrid: Pearson Educación; 2001.
109. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. EADock: docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins*. 2007;67(4):1010-25.
110. Aurélien Grosdidier OM. SwissDock - The online docking web server of the Swiss Institute of Bioinformatics - Home. 2014;2014.
111. Ordzhonikidze CG, Ramaiyya LK, Egorova EM, Rubanovich AV. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo. *Acta naturae*. 2009;1(3):99-101.
112. Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 2008;118(1):17-24.
113. Djerassi C, Knight JC, Wilkinson DI. The Structure of the Cactus Sterol Macdougallin (14 $\alpha$ -Methyl-[UNK]-Cholestene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -Diol)--A Novel Link in Sterol Biogenesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1963;85(6):835-.
114. Lee J, Weon JB, Yun BR, Eom MR, Ma CJ. Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in *Artemisia apiacea* by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. *Pharmacognosy magazine*. 2015;11(42):297-303.
115. Arudi RL, Sutherland MW, Bielski BH. Purification of oleic acid and linoleic acid. *Journal of Lipid Research*. 1983;24(4):485-8.
116. Rolim WR, Pelegrino MT, de Araújo Lima B, Ferraz LS, Costa FN, Bernardes JS, et al. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*. 2019;463:66-74.
117. Edington J. Typical Electron Microscope Investigations, Philips Technical Library. Monographs in Practical Electron Microscopy in Material Science, Thomson Litho Ltd. 1976.
118. Reyes-Rodríguez JL, Velázquez-Osorio A, Solorza-Feria O, Bahena-Urbe D, Roque J. Influence of the injection temperature on the size of Ni–Pt polyhedral nanoparticles synthesized by the hot-injection method. *MRS Communications*. 2017;7(4):947-52.
119. Mourdikoudis S, Liz-Marzán LM. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chemistry of Materials*. 2013;25(9):1465-76.
120. Anwar A, Abdalla SAO, Aslam Z, Shah MR, Siddiqui R, Khan NA. Oleic acid–conjugated silver nanoparticles as efficient antiamebic agent against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology Research*. 2019;118(7):2295-304.
121. Sengani M, Grumezescu AM, Rajeswari VD. Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect. *OpenNano*. 2017;2:37-46.
122. Abdelghany TM, Al-Rajhi AMH, Al Abboud MA, Alawlaqi MM, Ganash Magdah A, Helmy EAM, et al. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. *BioNanoScience*. 2018;8(1):5-16.
123. Thomas B, Vithiya BSM, Prasad TAA, Mohamed SB, Magdalane CM, Kaviyarasu K, et al. Antioxidant and Photocatalytic Activity of Aqueous Leaf Extract Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2019;19(5):2640-8.
124. de Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2012;32(11):867-79.
125. Seabra AB, Durán N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals*. 2015;5(2):934.

126. Cabral-Romero C, Solís-Soto JM, Sánchez-Pérez Y, Pineda-Aguilar N, Meester I, Pérez-Carrillo E, et al. Antitumor activity of a hydrogel loaded with lipophilic bismuth nanoparticles on cervical, prostate, and colon human cancer cells. *Anti-cancer drugs*. 2020;31(3):251-9.
127. Tortella GR, Rubilar O, Durán N, Diez MC, Martínez M, Parada J, et al. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;390:121974.
128. Seabra AB, Durán N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals*. 2015;5(2):934-75.
129. Rocha GM, Brandão BA, Mortara RA, Attias M, de Souza W, Carvalho TMU. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Journal of Structural Biology*. 2006;154(1):89-99.

## IX. Anexos



Cornell University

We gratefully acknowledge support from the Simons Foundation and member institutions.

arXiv.org > q-bio > arXiv:2012.14504

Search... All fields

Help | Advanced Search

Quantitative Biology > Biomolecules

COVID-19 e-print

**Important:** e-prints posted on arXiv are not peer-reviewed by arXiv; they should not be relied upon without context to guide clinical practice or health-related behavior and should not be reported in news media as established information without consulting multiple experts in the field.

[Submitted on 28 Dec 2020]

### Docking study for Protein Nsp-12 of SARS-CoV with Betalains and Alfa-Bisabolol

Isaac Lucas-Gómez, Abelardo López-Fernández, Brenda Karen González-Pérez, M. Rivas-Castillo Andrea, A. Valdez Calderón, Manuel A. Gayosso-Morales

The present Health Crisis tests the response of modern science and medicine to finding treatment for a new COVID-19 disease. The presentation on the world stage of antivirals such as remdesivir, obeys to the continuous investigation of biologically active molecules with multiple theoretical, computational and experimental tools. Diseases such as COVID:19 remind us that research into active ingredients for therapeutic purposes should cover all available sources, such as plants. In the present work, in silico tools, specifically docking study, were used to evaluate the binding and inhibition capacity of an antiviral such as remdesivir on the NSP-12 protein of SARS-CoV, a polymerase that is key in the replication of the SARS-COV virus. The results are then compared with a docking analysis of two natural products (Alpha-Bisabolol and betalain) with SARS-CoV protein, in order to find more candidates for COVID-19 virus replication inhibitors. In addition to increasing studies that help explain the specific mechanisms of the SARS-CoV-2 virus, remembering that we will have to live with the virus for an indefinite time from now on. Finally, natural products such as betalains may have inhibitory effects of a small order but in conjunction with other synergistic active ingredients they may increase their inhibition effect on NSP-12 protein of SARS-CoV.

Comments: 18 pages and 11 figures  
Subjects: Biomolecules (q-bio.BM)  
Cite as: arXiv:2012.14504 [q-bio.BM]  
(or arXiv:2012.14504v1 [q-bio.BM] for this version)

#### Submission history

From: Isaac Lucas-Gómez [view email]  
[v1] Mon, 28 Dec 2020 22:07:20 UTC (2,193 KB)

**Download:**

- PDF only



Current browse context: q-bio.BM  
< prev | next >  
new | recent | 2012  
Change to browse by: q-bio

References & Citation:

- NASA ADS
- Google Scholar
- Semantic Scholar

Export Bibtext Citation

Bookmark



MRS Advances © The Author(s), 2020, published on behalf of Materials  
Research Society by Cambridge University Press  
DOI: 10.1557/adv.2020.415



## Green synthesis of silver nanoparticles with phytosterols and betalain pigments as reducing agents present in cactus *Myrtillocactus geometrizans*.

Isaac Lucas-Gómez<sup>1-6\*</sup>, Gabriela Carrasco-Torres<sup>1</sup>, Daniel Bahena-Urbe<sup>1-5</sup>,  
Jaime Santoyo-Salazar<sup>2</sup>, Eduardo Fernández-Martínez<sup>3</sup>, Isabel Sánchez-  
Crisóstomo<sup>3</sup>, José. A. Pescador-Rojas<sup>4</sup>, José E. Aparicio-Burgos<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>*Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional C. P. 07360 Ciudad de México, México.*

<sup>2</sup>*Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional C. P. 07360 Ciudad de México, México.*

<sup>3</sup>*Laboratory of Medicinal Chemistry and Pharmacology. Center for Research in Biology of Reproduction, Medicine Department, Institute of Health Sciences, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Calle Dr. Eliseo Ramírez Ulloa No 400, Col. Doctores, Pachuca, Hidalgo, México.*

<sup>4</sup>*Escuela Superior de Apan. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Apan-Calpulalpan Km. 8, Col. Chimalpa, 43920 Apan, Hidalgo.*

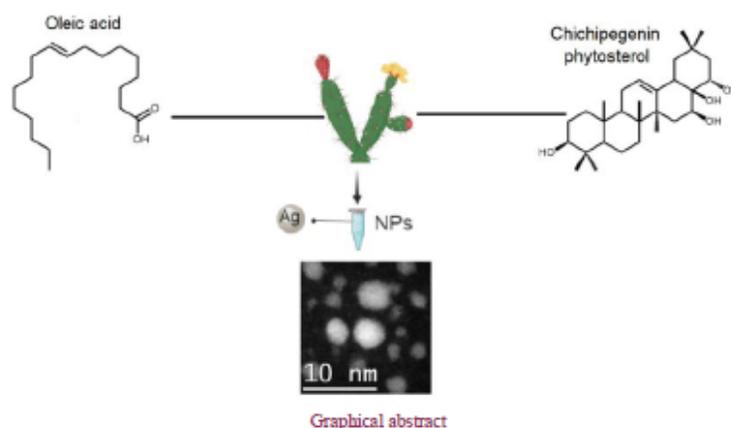
<sup>5</sup>*Laboratorio Avanzado de Nanoscopia Electrónica (LANE), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional C. P. 07360 Ciudad de México, México.*

<sup>6</sup>*Universidad Metropolitana del Valle de México (UTVAM), academia de química ambiental.*

\*corresponding author

### Abstract:

In the current work, we compared the green synthesis of silver nanoparticles (AgNP) using plant extracts, a promising methodology against the use of chemical reducers, such as oleic acid and oleylamine. The advantages of green synthesis are one-step method, economic and ecological while the advantages of classic synthesis methods are high nanoparticle performance, homogeneity in size and smaller average sizes. With this work we want to demonstrate that plant extracts with specific mixtures of chemical compounds can obtain smaller average sizes with greater homogeneity in nanoparticles compared to the use of classical synthesis. *Myrtillocactus geometrizans* was used as a polar plant extract, which was selected by the chemical components contained in the extract. Phytosterols, oleic acid and betalains contained in *Myrtillocactus geometrizans* are biomolecules responsible for the reduction and stability of AgNP below 5 nm. TEM analysis of the green synthesis of nanoparticles revealed the formation of spherical particles with an average diameter of 5 nm and with preferential crystallographic directions of the silver plane [111].



## INTRODUCTION.

Chemical synthesis with conventional methods to produce different nanostructures of Ag, focuses on adjusting the conditions/parameters of synthesis (such as temperature, precursor, and pH) to obtain the desired nanostructures. This means that chemical reducers and stabilizers influence guiding phenomena (thermodynamics, kinetics, and metal reducing-aspects) [1, 2]. Methods of chemical synthesis of nanoparticles using plant extracts have been popularized and these extracts have many chemical compounds qualified for reducing metals as well as economic and environmental advantages [3].

Oleic acid (OA) and oleylamine (OAm) has been selected as the reducer and stabilizer properly described in the literature and as a point of comparison with the plant extract that was examined [2, 4]. The plant selected for obtaining the extract was *Myrtillocactus geometrizans* (*M. geometrizans*), a native cactus from Mexico [5, 6]. The characterization was conducted to determine the major components in the cactus.

OAm / OA favor a facet growth [111], which occurs faster than the rearrangement of the atom on different seed faces, which is attributed to the system reaching equilibrium [1, 2]. In this work, the *M. geometrizans* extract generates a similar phenomenon that favors growth [111].



Figure 1. Photograph of *Myrtillocactus geometrizans*.

## MATERIALS AND METHODS.

### Reagents and chemical substances:

Silver nitrate (reactive ACS), oleic acid, oleylamine, methanol, and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tri-distilled water (18  $\Omega$ , Milli-Q) was used.

### Preparation of cranberry cactus extract (Garambullo):

The cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) was collected in Hidalgo State, México. The fruit was selected (Berries of good quality: ripe, bright, colorful, not contaminated), cleaned with water, and ground by hand to obtain a berry paste. The resulting paste was soaked with ethanol (1:1 volume/volume at 25 °C) to produce the extraction by maceration that took one day. The mixture was filtered, and ethanol was added again to the remaining paste. The ethanol extracts were collected and dried using a rotary evaporator at 70 °C under reduced pressure conditions [7-9]. The final dry extract was solubilized in water.

### Synthesis of silver nanoparticles:

The synthesis methodology used is similar to the hot-injection synthesis route, in the first experiment a mixture of 60% OA / 40% OAm by volume was used, the second

experiment used a polar extract of *Myrtillocactus geometrizans* [10, 11]. The first experiment: 5-ml of the mixture (60% OA / 40% OAm) was poured into a flask and heated to a temperature of 100 ° C. Subsequently, 1-ml of 0.1 M aqueous solution of AgNO<sub>3</sub> was added. The total reaction time was 30 min. The mixture was named reaction solution A. Second experiment: 5-ml of the polar extract diluted in water (2.2% mass/mass) was poured into a flask and heated to a temperature of 85 ° C. Subsequently, 1-ml of 0.1 M aqueous solution AgNO<sub>3</sub> solution was added. The total reaction time was 30 min. The mixture was called reaction solution B. Solid residues from both reactions were separated by centrifugation at 10,000 rpm for 12 minutes and the colloidal solution was preserved.

#### UV - visible spectroscopy (UV-vis):

Spectra were collected in a quartz cuvette with a path length of 1 cm, requiring approximately 1-ml of the solution to fill the cuvette. Spectra were collected at room temperature (25 ° C). The spectra were collected from 200 to 800 nm. The equipment used was a Shimadzu UV-1800 spectrometer.

#### High-resolution Liquid Chromatography analysis with Mass Spectrometry (HPLC/MS) of *Myrtillocactus geometrizans* extract:

HPLC was performed on a Thermo Scientific UltiMate 3000 device with a fraction collector equipped with Zorbax SB C18 column (150 x 4.6 mm, 3µm). The established measurement parameters were flow: 0.7 mL /min, column temperature: 40 ° C Sample: 200 µg / µL (3:7 methanol: Water), Autosampler temperature: 30 ° C, Injection volume: 50 µL, detection: 280 nm, MeOH / H<sub>2</sub>O 9: 1 Volume/Volume, mobile phase. The mass spectrometer was a quadrupole analyzer and linear ion trap QTRAP 3200, ABSciex with Turbo Spray source. Injection: By direct infusion, flow: 10 µL / min, a type of scan: Q1 polarity: positive and negative. Range m / z: 100-1500.

#### Scanning transmission electron microscopy (STEM):

High-resolution scanning transmission electron micrographs were obtained in a JEM-ARM200F microscope operating at a working voltage of 200 kV. The samples for electron microscopy observation were prepared from an aqueous solution. Subsequently, 40 µL of the solution was deposited on a carbon film supported on a copper grid (Cu) and allowed to evaporate at ambient conditions. All size analyzes were performed using the Gatan Microscopy Suite software version 2.01 (Gatan Inc. CA United States).

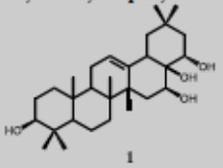
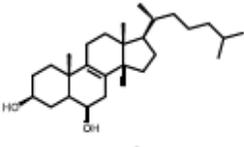
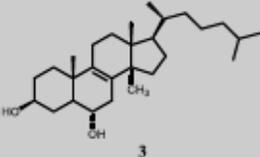
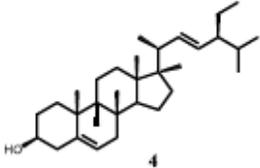
## RESULTS AND DISCUSSION.

#### HPLC / MS analysis of the fruit extract of *M. Geometrizans*:

Starting with 0.1 g of dry extract, a 200 µg / ml sample was prepared for duplicate HPLC (reverse phase) / MS analysis, the mass analysis was performed by direct flow. According to conditions described in the methodology section in the analysis, the highest intensity peaks detected in the chromatogram were identified and collected (experiment time 60 min); these fractions (mass > 100 ng) were analyzed by MS. The

partial information available on the chemical characterization of *Myrtillocactus geometrizans* [6-9, 12], excludes the use of internal standards in HPLC. The principal compounds in Table 1 were identified by their characteristic molecular weight and their polarity-retention time relationship. As shown in Table 1, the retention times (RT) of compounds 1-4 are close to each other, between a medium-high polarity, making it difficult to separate them by conventional techniques as described in the literature [13]. Oleic acid is detectable in a wide range of RT, indicating that there are significant amounts. The betalains are found in low RT values according to their high polarity.

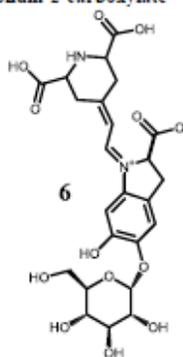
Table 1 Molecular mass, data retention time (RT) and experimental mass ( $[M+H]^+$  [ $M-H$ ] $^-$ ).

Compound	Molecular mass <sup>a</sup> (g/mol)	[M+ H] <sup>+</sup> (m/z) polarity -	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) polarity +	RT (min)
(1) chichipegenin Olean-12-ene- 3β,16β,22α,28-tetrol	474.7	475.2	473.4	17.8 - 18.43 24.6 - 25.5 37.44 - 44.14
				
(2) peniocerol (3β,5α,6α)- Cholest-8-ene-3,6-diol	402.7	403.4	401	17.8 - 22.6 y 44.14
				
(3) macdougallin 14-Methylcholest-8-ene-3,6- diol	416.7	417.4	415.3	15.0 5 - 18.43 21.43 - 25.5 37.44 - 39.94
				
(4) stigmasterol (24S)-5,22-Stigmastadien-3β- ol	412.7	413.3	-	24.6 y 37.4 -38.1
				
(5) oleic acid (9z,12z)-hexadecadienoic acid	282.3	283.4	-	18.13 - 41.9



(6) betalains 550.5 551.2 549.1 8.4 -17.8

(1E,2R)-1-[(2E)-2-(2,6-Dicarboxy-2,3-dihydro-4(1H)-pyridinyliidene)ethylidene]-5-( $\alpha$ -D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxy-2,3-dihydro-1H-indolium-2-carboxylate



\* Molecular mass reported in the literature [14-16].

The chemical mixture 1-6 favors the crystallographic orientation [111] in AgNP, which is similar to the orientation found in nanoparticles synthesized with oleic acid and oleylamine (Fig 3). Consequently, the extract has components that favor growth [111] [17], in particular, chemical 6 which has a secondary amine ( $R_1-NH-R_2$ ) similar to the primary amine ( $R_1-NH_2$ ) present in OAm [2], increasing the presence of similar amines would increase the yield of green synthesis.

#### UV-Vis monitoring of *M. Geometrizans* extract decline:

The synthesis of silver nanoparticles was examined using a UV-vis spectrophotometer. The absorbance of the extract of the fruit of *M. geometrizans* is in a range of 200-450 nm since this is the characteristic range of compounds 1-5, phytosterol 205-254 nm [18], pure oleic acid 230 -290 nm, and oleic acid with impurities 230-330 nm [19] in UV-vis.

Figure 2 shows the UV-vis spectra of the aqueous solution of the extract with 1 ml of 0.1 M AgNO<sub>3</sub>. The nanoparticles form in the first 30 minutes of reaction. Smaller sizes are obtained at this time. The resonance of surface plasmons (SP) characteristic of silver nanoparticles (380-420 nm) is marginal due to minimal performance in synthesis with plant extracts (55-90% [3] ) and a wide range of absorbance of *M. extract* residues geometrize that cover the surface of nanoparticles [17, 20].

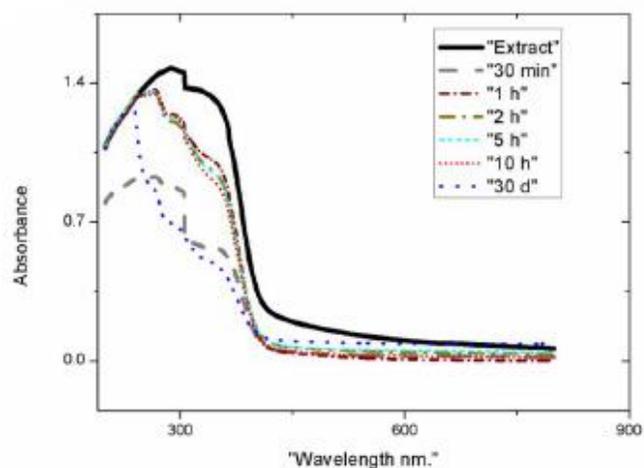


Figure 2. UV-visible synthesis spectrum using *M. geometrizans* fruit extract. UV-vis spectra were recorded from the aqueous reaction of the extract.

#### Analysis of scanning transmission electron microscopy (STEM):

Transmission electron microscopy experiments are shown in figure 3. Figure 3a) corresponds to the synthesis with OAm / OA and 0.1 M  $\text{AgNO}_3$ , figure 3b) corresponds to *M. geometrizans* extract with 0.1 M  $\text{AgNO}_3$ . The nanoparticles in both experiments adopted a semi-spherical morphology with a slight tendency to form aggregates. For the synthesis with OAm / OA average diameter of 6.33 nm; for the reaction with extract, an average diameter of 4.71 nm. Figure 3b)4, the Fast Fourier Transform (FFT) shows that the preferential crystallographic directions correspond to the planes [111] characteristic of a cubic silver face-centered structure (FCC) [21].

The evidence of the crystallographic planes [111], confirms that there is a preferential orientation in both syntheses, in the first experiment it is due to the presence of OAm / OA that favor structures [111], and in the reaction of the extract is due to the presence of compounds 5-6. This is because OAm / OA has chemical similarities with the components identified in the *M. geometrizans* extract.

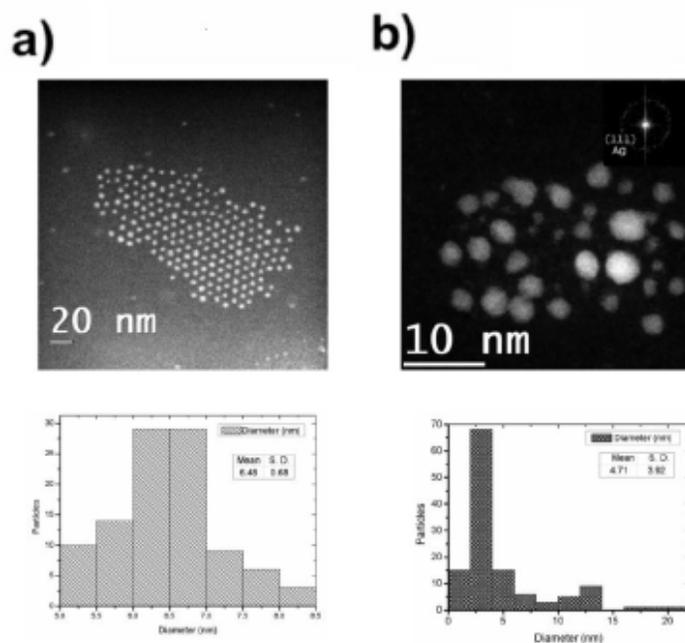


Figure 3. STEM micrograph and size histograms of the synthesized AgNPs. (a) using OAm 40% / OA 60 %, (b) using *M. geometrizans* fruit extract.

## CONCLUSIONS.

The extract of *M. geometrizans* can generate semi-spherical AgNPs with crystallographic directions [111], similar to traditional reducers, such as OA and OAm but with a smaller diameter for green synthesis AgNPs. The specific orientation [111] by OA and OAm is for a lower surface binding energy of Ag and Pt atoms with amines and a carboxylic acid, this is demonstrated with DFT calculations and experimentally [2]. By analogy, compound 6 with amine is the first cause of orientation [111] in the green synthesis.

Purification of extract compounds 5 and 6 by HPLC would increase yield and homogeneity of size for AgNPs by green synthesis, this project for future work.

## Acknowledgments:

The authors are grateful for the support provided by LaNSE CINVESTAV-IPN. The authors also acknowledge the support provided by Lorena Ramirez Reyes for technical advice for the HPLC / MS experiments in the present work.

## References

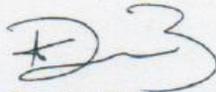
1. Amirjani, A. and D.F. Haghshenas, *Modified Finke-Watzky mechanisms for the two-step nucleation and growth of silver nanoparticles*. *Nanotechnology*, 2018. **29**(50): p. 505602.

2. Mourdikoudis, S. and L.M. Liz-Marzán, *Oleylamine in Nanoparticle Synthesis*. Chemistry of Materials, 2013. 25(9): p. 1465-1476.
3. Jorge de Souza, T.A., L.R. Rosa Souza, and L.P. Franchi, *Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019. 171: p. 691-700.
4. Kshirsagar, A.S. and P.K. Khanna, *Reaction Tailoring for Synthesis of Phase-Pure Nanocrystals of AgInSe<sub>2</sub>, Cu<sub>3</sub>SbSe<sub>3</sub> and CuSbSe<sub>2</sub>*. ChemistrySelect, 2018. 3(10): p. 2854-2866.
5. Ballester Olmos, J.F., *Los cactus y las otras plantas suculentas*. 1978.
6. Barrera, F.A.G., C.R. Reynoso, and E. González de Mejía, *Estabilidad de las betalainas extraídas del garambullo (Myrtillocactus geometrizans) / Stability of betalains extracted from garambullo (Myrtillocactus geometrizans)*. Food Science and Technology International, 1998. 4(2): p. 115-120.
7. Djerassi, C., et al., *Terpenoids. XXVIII.1 The Triterpene Composition of the Genus Myrtillocactus*. Journal of the American Chemical Society, 1957. 79(13): p. 3525-3528.
8. Djerassi, C., R.D.H. Murray, and R. Villotti, *204. The structure of the cactus sterol, peniocerol (cholest-8-ene-3 β, 6 α-diol)*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1965(0): p. 1160-1165.
9. Sandoval, A., et al., *Terpenoids. XXX.1 The Structure of the Cactus Triterpene Chichipegenin*. Journal of the American Chemical Society, 1957. 79(16): p. 4468-4472.
10. Razgoniaeva, N., et al., *Measuring the Time-Dependent Monomer Concentration during the Hot-Injection Synthesis of Colloidal Nanocrystals*. Chemistry of Materials, 2015. 27(17): p. 6102-6108.
11. Reyes-Rodríguez, J.L., et al., *Influence of the injection temperature on the size of Ni-Pt polyhedral nanoparticles synthesized by the hot-injection method*. MRS Communications, 2017. 7(4): p. 947-952.
12. Céspedes, C.L., et al., *Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from Myrtillocactus geometrizans (Cactaceae) against Spodoptera frugiperda and Tenebrio molitor*. Phytochemistry, 2005. 66(20): p. 2481-2493.
13. Djerassi, C., J.C. Knight, and D.I. Wilkinson, *The Structure of the Cactus Sterol Macdougallin (14 α-Methyl-[UNK]-Cholestene-3 β, 6 α-Diol)-A Novel Link in Sterol Biogenesis*. Journal of the American Chemical Society, 1963. 85(6): p. 835-835.
14. Information, N.C.f.B. *PubChem Compound Database; CID=612548*. 2018 [cited 2018; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/612548>].
15. Information, N.C.f.B. *PubChem Compound Database; CID=23258271*. 2018 [cited 2018; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23258271>].
16. Information, N.C.f.B. *PubChem Compound Database; CID=56841626*. 2018 [cited 2018; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/56841626>].
17. Raj, S., S. Chand Mali, and R. Trivedi, *Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Enicostemma axillare (Lam.) leaf extract*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. 503(4): p. 2814-2819.
18. Lee, J., et al., *Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in Artemisia apiacea by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector*. Pharmacogn Mag, 2015. 11(42): p. 297-303.
19. Arudi, R.L., M.W. Sutherland, and B.H. Bielski, *Purification of oleic acid and linoleic acid*. Journal of Lipid Research, 1983. 24(4): p. 485-8.
20. Rolim, W.R., et al., *Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity*. Applied Surface Science, 2019. 463: p. 66-74.
21. Edington, J., *Typical Electron Microscope Investigations*, Philips Technical Library. Monographs in Practical Electron Microscopy in Material Science, Thomson Litho Ltd, 1976.

El Comité Tutorial designado por el Programa Multidisciplinario de Nanociencias y Nanotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprueba la tesis titulada:

**“Estudio del efecto biológico de nanopartículas de plata sobre el parásito *Trypanosoma cruzi*.”**

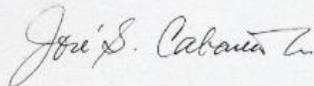
que presenta el **M. en C. Isaac Misael Lucas Gómez** para su examen final de Doctorado en Ciencias en Nanociencias y Nanotecnología, a los dieciséis días del mes de noviembre de dos mil veintiuno.



Dr. Daniel Bahena Uribe



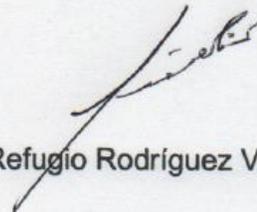
Dr. José Alfredo Pescador Rojas



Dr. José Gerardo Cabañas Moreno



Dr. Jaime Santoyo Salazar



Dra. Refugio Rodríguez Vázquez



Dr. José Esteban Aparicio Burgos